

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI  
AGRO-ALIMENTARI**

Facolta' di Agraria

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Coordinatore: Prof. Salvatore Spagna Musso

**SICUREZZA ALIMENTARE:  
METODOLOGIE IMMUNOCHEMICHE INNOVATIVE  
PER LA DETERMINAZIONE DI TOSSINE BATTERICHE  
NEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI**

Dott.ssa Carla Manzo

Dipartimento di Scienza degli Alimenti

Facoltà di Agraria

Università degli studi di Napoli "Federico II"

Tutore: Prof. Salvatore Spagna Musso

Diciottesimo ciclo 2002-2005

---

## INDICE

---

1.	INTRODUZIONE	pag.	4
1.1	Sicurezza alimentare	pag.	4
1.2	Batteri enterotossinogeni di interesse	pag.	13
2.	OBIETTIVI	pag.	25
3.	MATERIALI E METODI	pag.	26
3.1	Utilizzo delle DBs	pag.	26
3.2	Preparazione di campioni di latte e formaggi	pag.	28
3.3	Elettroforesi bidimensionale	pag.	28
3.4	Immunoseparazione con anti-SEB coated-DBs e SDS-PAGE	pag.	29
3.5	Immunoblotting	pag.	29
3.6	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) con anticorpi policlonali	pag.	30
3.7	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) con anticorpi monoclonali	pag.	31
3.8	RP-HPLC (Reversed Phase-High Liquid Chromatography)	pag.	31
3.9	ELISA delle frazioni RP-HPLC del campione A e del campione B	pag.	32
3.10	Saggio di citotossicità sulle cellule Vero	pag.	32
3.11	Preparazione surnatante E.coli	pag.	32
3.12	Cromatografia a scambio anionico	pag.	32
	RISULTATI E DISCUSSIONE	pag.	33
4.	<b>DETERMINAZIONE DI ENTEROTOSSINA B CON METODI IMMUNOCHEMICI</b>	pag.	33
4.1	Specificità di legame di due antisieri anti-SEB disponibili in commercio	pag.	33
4.2	Attendibilità dei saggi ELISA	pag.	34
4.3	Caratterizzazione del sistema DBs	pag.	35

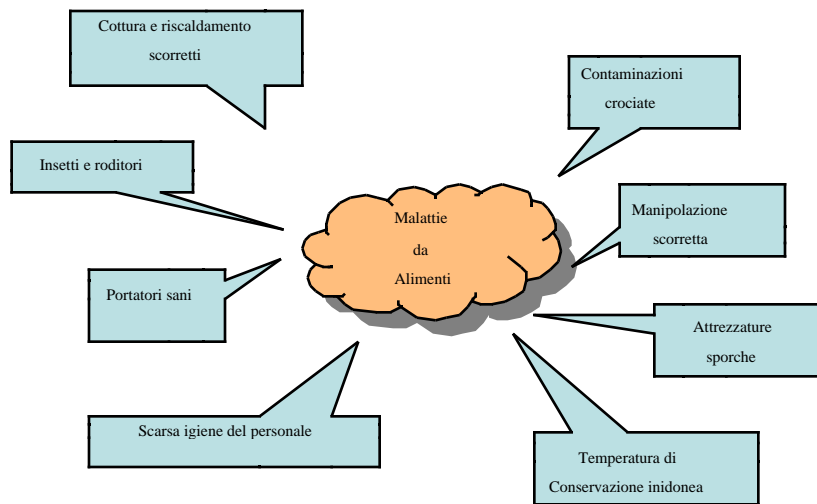
4.4	Determinazione di SEB in campioni di latte e formaggi	pag.	37
4.4.1	campioni sperimentali	pag.	37
4.4.2	campioni reali-sperimentali	pag.	38
4.4.3	campioni reali	pag.	38
4.5	Uso di un anticorpo monoclonale per la determinazione di SEB in campioni reali	pag.	39
4.6	Strategie analitiche alternative applicate allo studio di un campione reale	pag.	40
4.6.1	SDS-PAGE ed immunoblotting	pag.	40
4.6.2	RP-HPLC ed ELISA	pag.	41
<b>5.</b>	<b>DETERMINAZIONE DI ENTEROTOSSINA VT2 CON METODI IMMUNOCHEMICI</b>	pag.	42
5.1	ELISA in eccesso di anticorpo	pag.	42
5.2	Saggio di citotossicità su linea cellulare Vero	pag.	43
5.3	Inibizione della citotossicità con anticorpi monoclonali anti-VT2	pag.	44
5.4	Analisi ELISA di VTII dopo arricchimento con anti-VTII-coated DBs	pag.	45
5.5	Purificazione della tossina dal surnatante di un ceppo di <i>E.coli</i> O157:H7 VT-producente	pag.	45
5.6	Cromatografia a scambio anionico	pag.	46
5.7	Arricchimento con DBs e test ELISA	pag.	47
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	pag.	49
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag.	50

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Sicurezza alimentare

La sicurezza di un alimento è un aspetto fondamentale che concorre alla definizione della qualità totale; la qualità degli alimenti è infatti un concetto complesso che richiede lo studio di diverse caratteristiche, tanto è vero che possiamo dire che la qualità totale di un alimento sia data dalla somma di qualità parziali che possono influenzarsi a vicenda (Bender AE et al., 1995). Mentre la qualità nutrizionale, organolettica e tecnologica non condizionano la sicurezza d'uso degli alimenti, la qualità igienica, sanitaria e l'assenza di sostanze chimiche indesiderate sono fondamentali perché un alimento possa definirsi "sicuro" per il consumatore. Qualità igienica e qualità sanitaria rientrano complessivamente nel concetto di qualità microbiologica di un alimento, che è correlata alla presenza od assenza di microrganismi in grado di provocare fenomeni alterativi, all'applicazione di norme di buona pratica di fabbricazione o all'efficacia di misure di sanitizzazione oppure alla presenza o assenza di germi patogeni. E' senza dubbio l'aspetto più importante della qualità totale degli alimenti in quanto qualsiasi alimento, anche in possesso di tutte le migliori qualità, ma contaminato con un microrganismo patogeno o contenente tossine microbiche, non può essere giudicato idoneo al consumo od alla trasformazione salvo che non siano legalmente previsti trattamenti di bonifica in grado di eliminare il pericolo per il consumatore o che la legge non preveda altrimenti. Pur riconoscendo valida la necessità che i nostri alimenti non debbano contenere agenti patogeni, bisogna riconoscere che nella pratica questo non si verifica costantemente. Infatti, se osserviamo le statistiche sull'argomento (Cullor JS, 1995) è possibile evidenziare che una certa percentuale dei nostri alimenti risulta contaminata da germi patogeni ed una conferma di questa contaminazione si desume altresì dal numero abbastanza elevato di episodi tossinfettivi che annualmente si verificano in ogni parte del mondo. Non è facile garantire la qualità sanitaria dei nostri alimenti. Stando ai dati appare evidente che l'igienista può solo garantire con una certa percentuale di probabilità questa caratteristica, percentuale che può essere più o meno attendibile in funzione di un gran numero di fattori, fra i quali il microrganismo preso in considerazione, il tipo di tecnologia produttiva, le modalità di consumo dell'alimento, ecc. Quanto sopra detto mette chiaramente in luce quanto sia difficile pretendere in maniera assoluta il rischio "zero" ovvero la "qualità assoluta": troppe sono le possibilità attraverso le quali questa contaminazione può verificarsi

in ogni momento della preparazione degli alimenti. Per alcuni di essi questa contaminazione può iniziare addirittura nell'animale vivo. Molti, infatti, ritengono che le *Salmonella*, frequentemente presenti allo stato saprofitario nei nostri animali da carne, possano, in seguito a stress subiti nell'animale *in vita*, localizzarsi oltre che nei linfonodi meseraici anche in quelli muscolari. La presenza di *Salmonella* in questa ultima sede potrebbe spiegare l'alta incidenza della contaminazione da *Salmonella* nelle carni macinate (Gill CO, 2000). La presenza di germi patogeni anche a bassi livelli, cioè in numero inferiore alla dose richiesta per provocare un episodio tossinfettivo, non è un evento comunque desiderabile soprattutto quando tale contaminazione riguarda le materie prime. Se da una parte, infatti, si può ritenere che l'utilizzazione diretta di un determinato prodotto contaminato da un numero modesto di germi patogeni non provochi alcun evento morboso nell'uomo, dall'altro la sua utilizzazione per la trasformazione in un altro alimento può rappresentare la fonte di contaminazione per quest'ultimo il quale, se mal conservato o mal lavorato, può divenire nocivo, salvo che non venga utilizzata una tecnica di preparazione tale da assicurare l'inattivazione dei microrganismi patogeni. Un alimento contaminato da germi patogeni, a seconda del numero di microrganismi presenti può risultare: *pericoloso* per la salute del consumatore, nel caso in cui l'agente eziologico di malattia, pur presente, non raggiunge la dose o la concentrazione necessaria per provocare l'evento morboso se non dopo l'intervento di particolari condizioni (es. cattiva conservazione, ecc.) che permettono a questo germe di moltiplicarsi attivamente; *nocivo* per la salute del consumatore, nel caso in cui l'agente eziologico di malattia sia presente nell'alimento in una dose o concentrazione tale da provocare sicuramente, se ingerita, un evento morboso. Attualmente per la legislazione vigente nel nostro Paese, fatta eccezione per *L. monocytogenes* per la quale sono stati previsti limiti di accettabilità in particolari tipi di alimenti, come del resto in altri Paesi, la differenza tra *pericoloso* e *nocivo* è un fatto puramente accademico e teorico in quanto, nella pratica, in entrambi i casi l'alimento contaminato non può essere giudicato edibile e di conseguenza non può essere sottoposto ad un trattamento di bonifica che assicuri la completa inattivazione del germe (Devliegere F et al., 2004). Molti sono i fattori che condizionano e contribuiscono all'insorgenza di malattie da alimenti, alcuni dei quali riguardano direttamente l'uomo, mentre altri sono condizionati dall'ambiente o dalla tecnologia. Questi fattori possono essere così schematizzati:



### Fattori che influenzano le malattie da alimenti

La dose necessaria perché si verifichi un determinato evento morboso dipende anche dalla sensibilità individuale dei consumatori. Una persona sana può tollerare dosaggi notevolmente superiori rispetto ai cosiddetti soggetti a rischio per i quali, invece, la dose infettante o tossica è, a volte, notevolmente più bassa. Questi individui a rischio sono rappresentati da: bambini, anziani, ospedalizzati, persone allergiche, donne gravide, individui malnutriti, immunodepressi. Perché un alimento divenga prima pericoloso e poi nocivo per il consumatore devono verificarsi le seguenti condizioni: 1) il germe patogeno deve essere presente nell'ambiente in cui l'alimento viene prodotto o lavorato; 2) il germe deve contaminare l'alimento: se non si verifica questa contaminazione, pur perdurando il fattore di rischio, l'alimento non rappresenterà un pericolo per il consumatore; 3) i germi patogeni che pervengono sull'alimento devono trovarsi in condizioni tali da potersi moltiplicare in modo da raggiungere i dosaggi che sono ritenuti infettanti. Non c'è dubbio che l'ideale sarebbe l'assenza di ogni fattore di rischio biologico negli alimenti, ma bisogna riconoscere che ciò almeno per il momento non è possibile né realistico. Stanti così le cose, dobbiamo riconoscere che non è possibile garantire una sicurezza assoluta, cioè la completa assenza di pericoli, dei nostri alimenti. Attualmente è realistico affermare che la qualità sanitaria degli alimenti può essere garantita solo con una certa percentuale di probabilità, percentuale che può variare entro limiti più o meno ampi in funzione delle condizioni igieniche del Paese come pure del microrganismo considerato (Coleman WW, 1995).

## - Contaminazioni microbiche degli alimenti

Qualunque alimento, sia esso trasformato o meno, che l'uomo utilizza per il proprio sostentamento contiene un numero di microrganismi più o meno abbondante a causa della presenza di questi nell'ambiente (aria, acqua, suolo) e in tutti gli esseri viventi, uomo incluso. La quantità dei microrganismi presenti in un alimento al momento della produzione riveste un ruolo di fondamentale importanza, in quanto può compromettere notevolmente la qualità del prodotto finito. Data la grande distribuzione dei microrganismi nell'ambiente possiamo affermare che la contaminazione dei nostri alimenti si verifica in ogni momento della loro produzione e che comunque viene influenzata dalle condizioni igieniche dell'ambiente in cui avviene la loro produzione e preparazione (Tiecco G, 1997). Sebbene tale suddivisione è solo semplificativa in quanto molto spesso la stessa fonte di contaminazione interviene più volte nel corso della preparazione degli alimenti, le contaminazioni microbiche possono suddividersi in funzione del momento in cui vengono a verificarsi in:

- a) contaminazioni primarie: sono quelle contaminazioni che si verificano negli alimenti in fase di produzione (materie prime) ad opera dell'acqua, aria, suolo e dell'animale produttore stesso;
- b) contaminazioni secondarie: sono quelle che si verificano in fase di lavorazione e dipendono pertanto prevalentemente dall'ambiente di lavoro come pure dal personale che manipola le derrate in lavorazione;
- c) contaminazioni terziarie: sono quelle che si verificano a livello della conservazione, stoccaggio e commercializzazione del prodotto;
- d) contaminazioni quaternarie: sono quelle che si verificano in fase di consumo degli alimenti e sono particolarmente importanti nella ristorazione collettiva.

Un altro tipo di contaminazione che merita di essere ricordato è la cosiddetta “*contaminazione crociata*”, si intende con questo termine il passaggio di microrganismi da una sostanza ad un'altra per contatto tra di esse.

Possiamo dire che i prodotti finiti presentano una flora microbica che riassume la loro “*storia*” di produzione e conservazione. L'entità della contaminazione dipende fondamentalmente:

- 1) dall'igiene di produzione delle materie prime;
- 2) dal rispetto dell'igiene nel corso della lavorazione, conservazione e commercializzazione;

- 3) dalle metodiche messe in atto per ostacolare lo sviluppo microbico (Kilsby DC et al., 1981).

#### **- Produzione di alimenti igienicamente idonei**

Molte sono le metodiche proposte a tale scopo e, tra queste, possiamo ricordare sicuramente il SISTEMA HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point = analisi dei rischi e punti di controllo critici). Tale sistema può essere definito come un approccio metodico e sistematico per l'individuazione, valutazione e controllo dei rischi e pericoli specifici (microbiologici, chimici e/o fisici) che possono determinare la non sicurezza del prodotto. Attraverso il sistema HACCP è possibile identificare il pericolo potenziale ed il rischio ad esso connesso associati ad una produzione alimentare mediante lo studio di tutte le fasi del processo produttivo: dalla materia prima, alla distribuzione del prodotto finito, fino al raggiungimento del consumatore finale, attraverso l'uso proprio od improprio del prodotto. Alla base del sistema vi è, quindi, la consapevolezza che il controllo del prodotto finito non è sufficiente a garantire un adeguato livello di sicurezza e salubrità. Da alcuni anni il Consiglio delle Comunità Europee ha promulgato Direttive rivolte ai vari settori dell'industria alimentare (in particolare quello della produzione degli alimenti e bevande, della distribuzione, delle vendite al dettaglio e della ristorazione collettiva), che sono state recepite da parte del Governo Italiano e che stabiliscono l'adozione del sistema HACCP (Direttiva 93/43/CEE del Consiglio del 14 luglio 1993 sull'igiene dei prodotti alimentari). E' questo uno sviluppo importantissimo che permette di comprendere come il sistema HACCP si stia imponendo ormai come elemento indispensabile di ogni fornitura in ambito alimentare ad elevata garanzia di sicurezza e di qualità. Per molte categorie alimentari è sempre più forte l'esigenza di acquisire metodiche analitiche rapide, meglio se automatizzate che permettano di dare risposte affidabili in tempi brevi (per un eventuale ritiro di un lotto di produzione, per il controllo rapido di un ingrediente ecc.). Per altre, invece, l'impiego dei metodi microbiologici rapidi presenta difficoltà e svantaggi: in tal caso sono preferibili i metodi classici ufficiali. Quali che siano i metodi prescelti, questi devono essere affidabili e conformi alle richieste delle normative in materia di alimenti. L'hazard analysis, analisi del rischio, è la componente fondamentale del sistema. L'individuazione dei punti critici nella filiera produttiva necessita di un approccio multidisciplinare, legata com'è ad aspetti medici e veterinari, microbiologici, chimici, oltre che essenzialmente produttivi (Blackburn et al., 2002). Le procedure di sicurezza alimentare dell'UE riguardano tutta la catena di produzione degli alimenti destinati



al consumo animale e umano. L'Unione Europea fornisce una legislazione esaustiva e delinea le responsabilità di produttori e fornitori per contribuire a garantire la qualità e la sicurezza della catena alimentare. Il sistema di controllo HACCP rappresenta sicuramente un approccio razionale ed analitico per ridurre al minimo le contaminazioni microbiche, a tale scopo è necessario individuare i punti critici di controllo e stabilire particolari criteri di valutazione. In altri termini per ciascuno dei punti critici individuati è necessario stabilire degli standard di valutazione, con i relativi metodi di analisi, attraverso i quali sarà possibile stabilire se nel processo produttivo sono state rispettate o meno tutte le norme igieniche atte a garantire un prodotto finale ottimale (U.S. Department of Agriculture, 1996). Chiaramente i punti critici, i parametri e i metodi di valutazione cambiano innanzitutto in relazione all'alimento considerato e in relazione al processo produttivo. In particolar modo per latte e prodotti lattiero-caseari la Direttiva 92/46/CEE del consiglio del 16 giugno 1992 (ultima modifica Direttiva 2003/85/CEE del consigli del 29 settembre 2003) stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione di latte crudo, di latte trattato termicamente e di prodotti a base di latte. Secondo tale normativa sono considerati germi testimoni di carenza di igiene per i formaggi a base di latte crudo e trattato termicamente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, per il secondo anche per il latte in polvere e per i prodotti gelati a base di latte. Per quanto concerne i formaggi a base di latte crudo e latte sottoposto a termizzazione e i formaggi a pasta molle, ogni superamento della carica microbica ufc (unità formanti colonia/mL o g di prodotto) deve comportare la ricerca dell'eventuale presenza di ceppi di *St. aureus* enterotossigeni o di ceppi di *E. Coli* ritenuti patogeni, nonché, ove necessario, all'eventuale presenza nei prodotti di tossine stafilococciche secondo metodi da fissare in base alla procedura di cui all'art. 31 della direttiva. L'individuazione dei ceppi summenzionati e/o la presenza di enterotossine stafilococcica comportano il ritiro dal mercato di tutte le partite infette (Direttiva 2003/85/CEE, 2003).

#### **- Malattie da enterotossine batteriche**

Gli alimenti possono essere vettori di numerosi agenti patogeni per l'uomo, tra questi agenti rientrano quelli di natura biologica i quali possono essere distinti in tre grandi gruppi: virus, batteri e parassiti. Indispensabile, affinché si verifichi l'insorgenza di una forma morbosa nell'uomo, non solo la presenza dell'agente eziologico ma pure, soprattutto, l'intervento di altri fattori che ne potenziano la nocività : dose ingerita, condizioni delle difese organiche di cui l'organismo dispone (Meloni C et al., 1990). Tutti gli alimenti sono ritenuti vettori per i

vari agenti biologici anche se alcuni presentano una maggiore importanza nei confronti di un particolare agente. Particolari condizioni di temperatura, pH,  $a_w$  (water activity) fanno sì che gli alimenti possano essere il substrato elettivo per lo sviluppo, la crescita e la moltiplicazione di microrganismi. Essi possono provocare gastroenteriti acute o infiammazioni delle pareti dello stomaco o dell'intestino. Quando l'alimento si configura più come fonte di infezione, e non come semplice veicolo del patogeno, si parla di *tossinfezione alimentare*. La gastroenterite può presentare due meccanismi patogenetici: i batteri possono effettivamente provocare una infezione di origine alimentare, cioè possono inizialmente colonizzare il tratto gastrointestinale e poi moltiplicarsi al suo interno, successivamente invadere i tessuti dell'ospite o secernere *esotossine*; in alternativa, il patogeno può secernere una esotossina che contamina l'alimento che viene poi ingerito dall'ospite. Quest'ultima situazione viene talvolta riferita come una *intossicazione alimentare*, perché con l'alimento viene ingerita la tossina e non è indispensabile la presenza di batteri vivi. Dato che queste tossine alterano il funzionamento della mucosa intestinale, vengono chiamate *enterotossine*. I sintomi più comuni dell'avvelenamento da enterotossine sono la nausea, il vomito, la diarrea (Lansing et al., 2000). Pertanto i microrganismi sono in grado di provocare la malattia nell'uomo attraverso due meccanismi patogenetici distinti: infezioni e intossicazioni. Le *infezioni* sono quelle malattie sostenute da agenti biologici vivi e vitali i quali, in genere, si moltiplicano attivamente nel punto di ingresso nell'organismo dove danno origine ad un processo di infiammazione più o meno grave. Le *intossicazioni* sono quelle malattie conseguenti all'ingestione di tossine prodotte da agenti biologici i quali, tuttavia, al momento dell'ingestione possono non essere più presenti nell'alimento vettore. Esse pertanto si comportano e possono essere considerate come un qualsiasi altro contaminante chimico o veleno il quale viene trasmesso all'uomo attraverso gli alimenti. Poiché gli agenti biologici di nostro interesse vengono ingeriti con gli alimenti, è evidente che la loro prima localizzazione avverrà a livello dell'intestino. I primi sintomi saranno pertanto a livello dell'apparato gastroenterico. La gravità della sintomatologia gastrointestinale dipenderà oltre che dalla specie e dalla dose ingerita, anche dalla sede di elezione (intestinale od extraintestinale) presentata dall'agente eziologico; tale sintomatologia in alcuni casi può essere quasi completamente assente o comunque tale da passare quasi inosservata. La sintomatologia gastroenterica comunque è rappresentata da:

*vomito*: il quale è controllato sia dal sistema nervoso autonomo che agisce sulla muscolatura liscia, sia dal sistema nervoso centrale che agisce invece sulla muscolatura striata. Nell'intestino, in particolare a livello del duodeno, sono presenti numerosi recettori nervosi i quali trasmettono lo stimolo al centro del vomito situato alla base del IV ventricolo in prossimità dell'apertura del canale spinale. In genere le tossine prodotte dai microrganismi delle tossinfezioni alimentari agiscono stimolando il sistema nervoso autonomo mentre i composti chimici, responsabili degli avvelenamenti, il sistema nervoso centrale;

*diarrea*: la proliferazione dell'agente biologico a livello intestinale determina un danneggiamento della mucosa intestinale e la rottura dell'equilibrio degli elettroliti e fluidi intestinali. Se l'infezione avviene a livello del piccolo intestino, come nel caso delle salmonelle, avremo la comparsa di una diarrea acquosa mentre se avviene a livello del colon, come nel caso delle *Shigelle*, avremo una diarrea sanguinolenta (Tiecco G, 1997). Gli agenti biologici, a seconda del loro meccanismo d'azione rispetto alle cellule intestinali, possono essere distinti in due categorie:

*Agenti invasivi*: sono in grado di invadere i tessuti e di moltiplicarsi nell'interno delle cellule intestinali. Questi agenti invasivi devono essere dotati di meccanismi che ne facilitano, in un primo momento, l'invasione e successivamente la penetrazione nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale. Nello stesso tempo devono essere in grado di sopravvivere a questo nuovo microambiente e quindi di moltiplicarsi nell'interno della cellula invasa. L'esito di questa moltiplicazione è rappresentato da una lisi delle cellule epiteliali e dalla liberazione di agenti infettanti nel lume intestinale, i quali andranno a localizzarsi in altre cellule e così via. Alcuni di questi agenti, una volta localizzati a livello intestinale, producono enterotossine e citotossine le quali agiscono perturbando il sistema dei nucleotidi ciclici, mediante stimolazione della ciclasi.

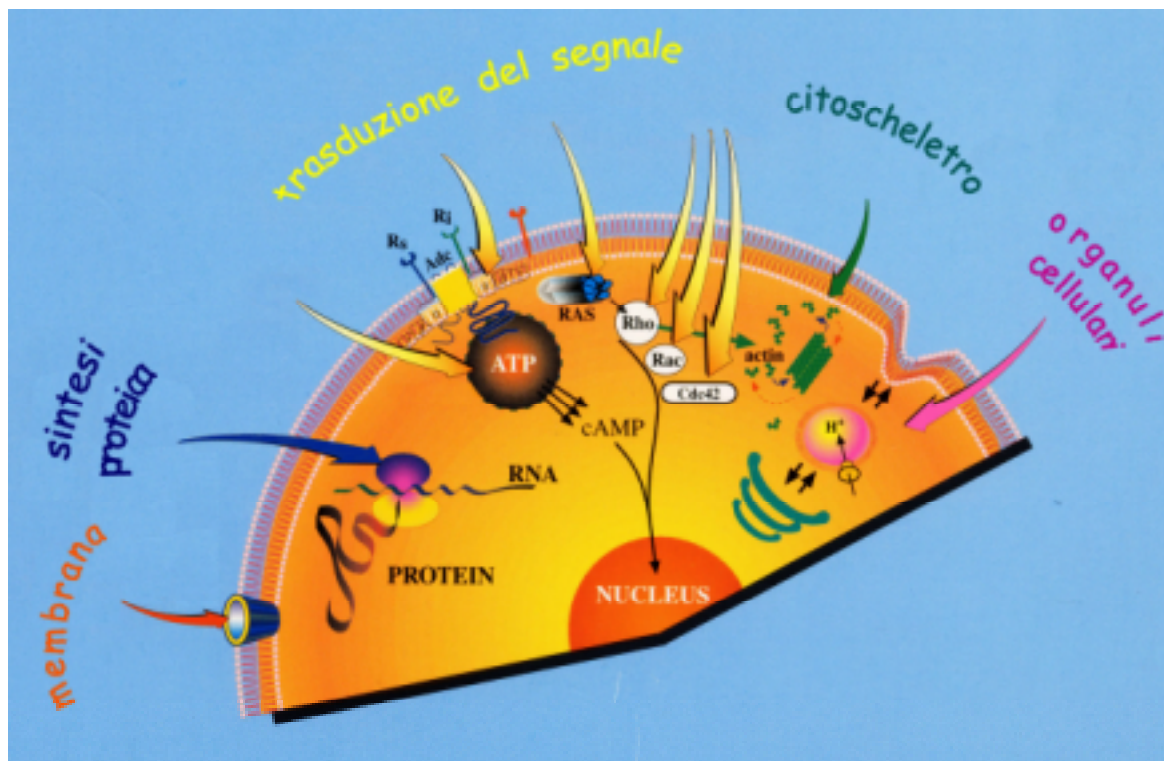
*Agenti non invasivi*: Sono agenti infettivi i quali non sono in grado di penetrare nelle cellule della mucosa intestinale ma sono in grado di sopravvivere e moltiplicarsi attivamente nel lume intestinale aderendo alla superficie delle cellule. L'aderenza di questi agenti alla superficie della cellula intestinale è dovuta alla presenza sulla superficie della cellula dell'agente patogeno di filamenti flessibili (fimbrie, pili). Questa aderenza permette all'agente di non venire allontanato dai movimenti peristaltici intestinali. L'azione patogena è dovuta alla produzione di enterotossine le quali sono le responsabili della sintomatologia

della malattia (Tarr PI et al., 2005). Si riporta di seguito una tabella delle più frequenti malattie alimentari ed i germi che le provocano.

Ministero della Sanità - Dipartimento Alimenti e Nutrizione

<b>Microrganismi patogeni responsabili di malattie di origine alimentari</b>	<b>Tempo di incubazione</b>	<b>Sintomi</b>	<b>Alimenti più a rischio</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	3 - 5 giorni	dolori addominali, diarrea maleodorante e colorata per presenza di sangue, nausea, vomito, febbre	latte crudo non pastorizzato, carni avicole poco cotte (alla brace, barbecue), acqua di fonte
<i>Clostridium botulinum</i>	14 -24 ore fino a 3 - 6 giorni	prima sintomi gastrointestinali, poi nervosi quali lo sdoppiamento della vista, difficoltà di parola, debolezza muscolare fino alla paralisi	tipo A: conserve di carne e verdure tipo B: prodotti a base di carne tipo E: prodotti ittici tipo F: conserve a base di carne e pesce
<i>E. coli</i>	8 - 16 ore	dolori addominali, diarrea	carne suina, bovina e di pollo poco cotte, latte e prodotti lattiero-caseari non pastorizzati
<i>Clostridium perfringens</i>	8 - 20 ore	diarrea violenta, dolori addominali	carni bianche e rosse cotte
<i>Listeria monocytogenes</i>	2-3 giorni sino a 3 settimane	febbre, cefalea, nausea, vomito	carni bianche e rosse, formaggi, latte crudo, cibi cotti contaminati dopo la cottura
<i>Salmonella Spp.</i>	24 - 48 ore	dolori addominali, diarrea, vomito, febbre	cibi crudi a base di carne, frutti di mare, uova, latte crudo, cibi cotti contaminati dopo la cottura
<i>Shigella Spp.</i>	2 - 7 giorni	dolori addominali, diarrea con sangue, febbre	cibi manipolati da soggetti infetti o tramite il contatto di acqua inquinata (prodotti della pesca, verdure, latte e latticini, gelati)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 - 6 ore	nausea, vomito, sudorazione, cefalea, diarrea	panna, latte, creme, gelati, altri alimenti contaminati da soggetti portatori
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1 -7 giorni	nausea, vomito, sudorazione, cefalea, diarrea, artrite reumatoide, orticaria	latte crudo, carni suine crude
<i>Bacillus cereus 1</i>	8 - 16 ore	diarrea violenta, dolori addominali	prodotti carnei, minestre vegetali, budini e salse

Quanto detto sopra dimostra che i microrganismi sono in grado di produrre una serie di sostanze in grado di scatenare reazioni patologiche nell'uomo; fra queste sicuramente le tossine coprono un ruolo di primo piano. Esse possono agire, a livello cellulare, in maniera differente: inibizione della sintesi proteica, alterazione dell'equilibrio elettrolitico o dei segnali di traduzione, produzione di anticorpi (Rappuoli R, 1997). I differenti meccanismi di azione svolti dalle tossine a livello cellulare sono sinteticamente riportati nel seguente schema:



Meccanismi di azione delle tossine batteriche esplicitati sulle cellule

## 1.2 Batteri enterotossinogeni di interesse

### *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

I microrganismi compresi nel genere *Staphylococcus* appartengono alla famiglia delle *Micrococcaceae*, suddivisa in quattro generi: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* e *Planococcus*. Sono microrganismi di forma sferica di circa 0,5-1  $\mu\text{m}$  di diametro, in colture in brodo possono presentarsi isolati, doppi, in tetradi e sono in grado di dividersi in modo caratteristico secondo piú piani formando ammassi irregolari e a grappolo. Sono Gram-positivi, immobili, generalmente privi di capsula, asporigeni e con molte specie cromogene, anaerobi facoltativi, generalmente catalasi positivi, chemorganotrofi. Gli stafilococchi sono generalmente presenti sulla cute, nelle ghiandole sebacee e nei bulbi piliferi e sulle mucose degli animali a sangue caldo. *S. aureus* è il piú importante stafilococco patogeno per l'uomo, nel quale causa foruncoli, ascessi, infezioni di ferite, polmonite, sindrome da shock tossico e intossicazione alimentare. *S. aureus* colonizza in genere le membrane nasali e la cute; viene isolato anche negli apparati gastrointestinale e urinario degli animali a sangue caldo (Lansing M Prescott, 525). La maggior parte dei ceppi è in grado di crescere in presenza di NaCl al 10% e ad una temperatura compresa tra i 18 e i 40 °C. Possono produrre esotossine, quali

tossine,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  leucocidina, tossina epidermolitica o tossina esfoliativa ed enterotossina (Martin et al., 1994). Le popolazioni naturali di tali microrganismi sono associate soprattutto alla pelle, alle ghiandole della pelle e alle mucose degli animali a sangue caldo e dell'uomo. Possono essere associati ad un'ampia varietà di prodotti animali come carne, latte e formaggio e a fonti ambientali quali suolo, sabbie, polvere, aria e acque naturali. Alcune specie sono saprofiti, altre commensali, ed altre ancora opportunistiche patogene per l'uomo e per gli animali. Gli Stafilococchi, ed in particolare *Staphylococcus aureus*, intervengono in patologia umana soprattutto come agenti eziologici di numerose infezioni della cute e delle mucose determinando, in alcuni casi, anche setticemie estremamente gravi. Alcuni biotipi appartenenti alla specie *S. aureus* sono responsabili di gravi infezioni alimentari per la capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione (Lansing M.Prescott, 2000).

#### ***-intossicazione alimentare da stafilococco***

Il riconoscimento degli stafilococchi come agenti causali di infezioni alimentari nell'uomo risale a circa due secoli fa. La prima associazione di *Staphylococcus* con l'insorgenza di malattia alimentare risale al 1884. Questo microrganismo fu trovato in un formaggio incriminato in una grossa esplosione di intossicazione alimentare. Altre intossicazioni, di grossa portata, attribuite al consumo di alimenti contaminati con gli stafilococchi sono quelle avvenute in Francia nel 1894, in Michigan nel 1907 e nelle Filippine nel 1914 (Bennett RW, 2005). Dack et al. furono in grado di dimostrare che la causa di intossicazione alimentare che si scatenò dopo il consumo di dolcetti ripieni di crema fu dovuta alla presenza di tossine prodotte da stafilococchi isolati (Bergdoll MS, 1989). Nell'ambito dei batteri patogeni per l'uomo gli stafilococchi sono certamente uno dei gruppi più importanti. Questi cocci, come sopra detto sono ospiti abituali della cute, dell'intestino e della vagina e, con gli pneumococchi e gli streptococchi, fanno parte di un gruppo di batteri invasivi, conosciuti come cocci piogeni (ovvero produttori di pus). Gli stafilococchi possono essere distinti in ceppi patogeni e relativamente non patogeni in base alla sintesi dell'enzima coagulasi. I ceppi coagulasi positivi, classificati come *S. aureus*, producono spesso un caratteristico pigmento giallo oro del tipo dei carotenoidi – da cui il nome corrente gli stafilococchi aurei – e sono la causa di gravi infezioni croniche. Il potere patogeno di tali batteri è da attribuirsi alla loro capacità di moltiplicarsi e diffondersi ampiamente nei tessuti e di produrre molte sostanze extracellulari, alcune delle quali sono esotossine, altri sono enzimi che si ritiene siano

coinvolti nella invasività stafilococcica. A uno dei due estremi dello spettro di malattie che possono essere causate nell'uomo dagli stafilococchi vi è l'intossicazione stafilococcica di origine alimentare, causata esclusivamente dalla ingestione di enterotossine preformate; dall'altro estremo vi è la batteriemia stafilococcica. La sindrome da shock tossico (TSS, toxic shock syndrome) è una malattia stafilococcica, dalle conseguenze potenzialmente gravi, che si manifesta soprattutto nelle donne che fanno uso di tamponi assorbenti vaginali durante il periodo mestruale. Tuttavia, la tossina che scatena questa particolare sindrome viene prodotta anche nell'uomo e nelle donne che non presentano mestruazioni, ed è dovuta a *S. aureus* presente in parti del corpo diverse da quelle genitali (per esempio nelle infezioni da ferite chirurgiche) (Lansing M.Prescott, 2000). L'intossicazione alimentare da stafilococco costituisce negli Stati Uniti l'intossicazione alimentare maggiormente diffusa. E' causata dall'ingestione di cibi non adeguatamente conservati o insufficientemente cotti (in particolare alimenti come prosciutti e insaccati, soprattutto salami, carni conservate, insalate di pollo, pasticcini, creme e gelati di crema) in cui *Staphylococcus aureus* si moltiplica e produce tossine. Tale microrganismo è molto resistente al calore, all'essiccamento, e alle radiazioni; è un ospite abituale delle cavità nasofaringee e della cute dell'uomo e di molte altre specie di mammiferi. Da queste fonti può facilmente contagiare alcuni alimenti in cui, in presenza di condizioni adatte per l'incubazione, produce una enterotossina termostabile; la presenza dell'enterotossina nel cibo lo rende estremamente pericoloso, anche perché esso mantiene le sue caratteristiche organolettiche non andando necessariamente incontro alla comparsa di fenomeni alterativi. Sebbene gli stafilococchi siano considerati mesofili, alcuni ceppi di *S. aureus* crescono a temperature basse, intorno ai 6-7 °C. *S. aureus* generalmente cresce a temperature comprese fra i 7 e i 47 °C, con un optimum a 35 °C. Il range di pH per la crescita è fra 4.5 e 9.3 °C, con un optimum fra i valori di pH 7.0 e 7.5 (Martin et al., 1994). Il significato della presenza di *S. aureus* nei cibi dovrebbe essere valutato attentamente perché non tutti gli stafilococchi sono enterotossinogeni. La presenza di un rilevante numero di questi batteri non è condizione necessaria e sufficiente per poter incriminare uno specifico alimento come potenziale responsabile di patogenesi alimentare. Un alimento può essere indicato come agente causale di tossinfezione alimentare solo se viene dimostrata la presenza di tossina preformata. Sicuramente la presenza di una modesta carica di stafilococchi non garantisce che l'alimento sia sicuro (Bennett, 2005). Trattamenti fisici come il calore di alimenti contaminati possono avere effetti sulla carica microbica, riducendo il numero di cellule vitali, ma le

tossine termostabili possono rimanere biologicamente attive, pertanto non possono essere esclusi i presupposti per una intossicazione alimentare (Bennett, 1992). L'ingestione di tossina preformata attraverso gli alimenti viene definita intossicazione alimentare. E' noto che il bersaglio dell'enterotossine, responsabile del riflesso del vomito, è localizzato nelle viscere addominali, dove ci sono i probabili recettori di enterotossine stafilococciche (SEs). L'intossicazione si manifesta in forma acuta con un attacco che può subentrare da 1 a 7 ore dopo l'ingestione della tossina in alimenti contaminanti (Bergdoll, 1989). I primi sintomi sono rappresentati da nausea e possibili crampi addominali, conseguenza di questi sono il vomito e la diarrea. Manifestazioni secondarie dell'intossicazione possono essere sudorazione, mal di testa, disidratazione, marcata spossatezza, crampi muscolari e abbassamento della pressione. In alcuni casi può verificarsi innalzamento o abbassamento della temperatura corporea rispetto ai valori normali e in casi estremi muco in feci e vomito (Bergdoll, 1992). Gli effetti completi delle enterotossine sull'organismo umano non sono stati ancora chiariti del tutto; grazie alla loro capacità di legarsi direttamente alle molecole del sistema maggiore di istocompatibilità le tossine stimolano la produzione di un elevato numero di cellule T e produzione e secrezione di citochine da parte delle cellule del sistema immunitario. La dose di tossina ingerita necessaria per provocare l'intossicazione non è precisamente conosciuta: informazioni derivanti da esplosioni di intossicazioni alimentari e studi epidemiologici indicano che la dose di enterotossina, ingerita attraverso gli alimenti, in grado di provocare i sintomi dell'intossicazione, può essere anche meno di 1 µg (Everson et al., 1988). Comunque in individui molto sensibili, una dose di 100 o 200 ng è già in grado di provocare la malattia (Bergdoll, 1990). Resta comunque da precisare che non sempre l'esposizione a enterotossine è la condizione necessaria e sufficiente per lo scatenarsi della tossinfezione, in alcuni casi l'individuo può venire a contatti con la tossine e produrre anticorpi senza che ciò dia luogo a manifestazioni patologiche tipiche dell'intossicazione alimentare. E' ben documentato che sieri di individui normali (che non hanno manifestato sintomatologia da intossicazione stafilococcica) contengono un alto titolo di anticorpi IgG contro le enterotossine stafilococciche, molto probabilmente da attribuire ad esposizioni ambientali (Takei et al., 1993). LeClaire e Bavari analizzarono sieri di 29 volontari sani, essi ritrovarono che tutti possedevano titoli dosabili di anticorpi contro le enterotossine SEB e SEC1 e che molti avevano titoli rilevabili anche contro SEA e TSST-1 (LeClaire et al. 2001). Poli et al.



ritrovano risultati analoghi per quanto riguarda IgG in sieri di pazienti sani contro le enterotossine A e B (Poli MA et al., 2002).

#### ***-tossine da *Staphylococcus aureus****

*Staphylococcus aureus* produce un'ampia varietà di esoproteine che potenziano la sua capacità di colonizzare e provocare disturbi ai mammiferi ospiti. La principale funzione di queste proteine potrebbe essere quella di convertire i costituenti dei tessuti dell'organismo ospite in nutrienti necessari per la crescita batterica. Fanno parte del gruppo delle esoproteine anche le tossine prodotte da alcuni ceppi: TSST-1 (toxic shock syndrome) enterotossine stafilococciche, tossine esfoliative (ETA e ETB) e leucocidine (Martin et al., 2000). Le enterotossine stafilococciche sono proteine a basso peso molecolare (MW 26000-29000 Da), che sono convenzionalmente distinte in 7 sierotipi: SEA, SEB, SEC1-3, SED, SEE (Su et al., 1997). Recentemente è stata riscontrata la sintesi anche di altre enterotossine: SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK (Orwin et al., 2001). Ciascuna di queste tossine è nota per i potenti effetti sul sistema immunitario, ma molte di queste hanno anche altri effetti biologici. La loro prima funzione *in vivo* potrebbe essere quella di inibire la risposta del sistema immunitario a *S. aureus*. Data la loro capacità di provocare febbre le enterotossine stafilococciche e la TSST-1 sono anche definite come PTSAGs (pyrogenic toxin superantigens) (Martin et al., 2000). Come molte proteine secrete da *S. aureus*, le enterotossine sono prodotte durante la fase post-esponenziale della crescita dei batteri (Otero et al., 1989). La resistenza al calore è una delle più importanti caratteristiche fisico-chimiche delle enterotossine stafilococciche, tale resistenza suggerisce la probabilità che l'attività biologica delle tossine rimanga inalterata anche in seguito ai trattamenti termici degli alimenti. Dopo l'ingestione di alimenti contaminati, le tossine passano al torrente ematico attraverso il tratto gastrointestinale causando nausea, diarrea e crampi addominali (Tortora GJ, 1995). Le enterotossine agiscono sia sul tratto gastrointestinale sia come superantigeni (Balaban et al., 2000). Sebbene queste due funzioni siano localizzate su domini separati delle proteine, c'è un'elevata correlazione fra queste attività e in molti casi a una minore attività come superantigene corrisponde un minore potere sul tratto gastrointestinale (Harris et al., 1993). I superantigeni stimolano in maniera indiscriminata milioni di linfociti helper, che hanno il compito di dirigere la risposta immunitaria. Di per sé i linfociti helper non attaccano direttamente i microrganismi, ma attraverso la produzione di citochine attivano tanto i linfociti *T killer* o citotossici, che uccidono le cellule infettate, quanto i linfociti *B*, che secernono anticorpi contro gli antigeni.

Le enterotossine si legano direttamente alle molecole MHC (maggiore complesso di istocompatibilità), senza richiedere l'assorbimento e il rimaneggiamento da parte delle cellule che presentano gli antigeni. Questo strano comportamento indica che c'è anche interazione diretta tra linfociti *T* e tossine intatte (Johnson HM et al., 1992). La variabilità genetica fra i ceppi di *S. aureus* è stata vista associata al potenziale patogeno. I geni delle tossine stafilococciche sono caratterizzati da una grande percentuale di sequenze nucleotidiche omologhe (Betley et al., 1992); tali geni sono di origine plasmidica e si trasferiscono in maniera orizzontale fra i vari ceppi (Orwin et al., 2001). In base a tale percentuale di omologia le enterotossine possono essere classificate in due principali gruppi: SEA, SED e SEE costituiscono un gruppo, mentre SEB e SECs formano un secondo gruppo con circa il 60-70% di omologia (Papageorgiou AC et al., 1998). In particolare la struttura complessiva dell' enterotossina B è simile a quella degli altri superantigeni. Essa consiste di due domini: dominio I (sequenza proteica da 30 a 120) e dominio II (sequenza proteica da 127 a 239); i due residui di cisteina 93 e 113 formano un ponte disolfuro, i residui fra le due cisteine protendono all'esterno del corpo della molecola formando un anello altamente mobile e solubile (Papageorgiou AC et al., 1998). A differenza degli altri superantigeni SEB non presenta un sito di legame per lo ione zinco, dal quale per le altre enterotossine dipende il legame al complesso MHC (Peterson K et al., 2001).

#### ***-incidenza delle enterotossine negli alimenti***

Dalla letteratura emerge una grossa variabilità di risultati rispetto alla determinazione di ceppi *S. aureus* enterotossigeni negli alimenti; questo è dovuto, probabilmente, alla differenza fra i vari tipi di alimenti analizzati, il numero di campioni, i metodi utilizzati per la rivelazione e le caratteristiche ecologiche del ceppo. Comparando i diversi dati della letteratura emerge che SEA sia la tossina maggiormente coinvolta nell'insorgenza di intossicazioni alimentari (Rasooly A et al., 1999), ma Beáta H e collaboratori mettono in evidenza nei loro studi che la più grossa percentuale di ceppi enterotossigeni isolati in campioni di alimenti hanno un genotipo SEB produttore (Beáta et al., 2002) e che grossa parte di questa percentuale riguarda formaggi ovis. L'incidenza di *S. aureus* aumenta soprattutto se si parla di formaggi ottenuti da latte non pastorizzato a causa di mastiti non manifeste (Gomez-Lucia et al., 1990). In un recente studio condotto in Italia su prodotti alimentari italiani, provenienti da diverse regioni, è stato riscontrato che su 5369 campioni di carne 146 erano positivi per la presenza di *S. aureus* e 66 di questi erano enterotossigeni. In particolare, i ceppi saggiati producevano

SEA ( 30.3%), SEB (7.6%), SEC (51.5%), SED (6.1%), SEA+SEB (1.5%). Su 3097 campioni di latte e prodotti lattiero caseari 362 contenevano ceppi di *S. aureus* e di questi 217 erano enterotossinogeni. In particolare, questi ceppi producevano SEA (26.7%), SEB (0.9%), SEC (28.1%), SEC (15.1%), SEA+SEB (1.8%), SEA+SED (26%) (Normanno G et al., 2005). Tali valutazioni sono state fatte a partire dall'arricchimento di ceppi presenti nell'alimento, seguiti da test RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) per la determinazione di tossine.

#### ***-metodi attuali per la determinazione di enterotossine stafilococciche negli alimenti***

In questi ultimi anni sono stati sviluppati una serie di metodi sensibili per la determinazione di enterotossine negli alimenti: radioimmunoassay (RIA) (Johnson et al., 1973), ELISA o EIA (Ewald, 1988; Fey et al., 1984; Freed et al., 1982) e RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) (Bankes et al., 1989); sulla base di questi metodi sono stati sviluppati una serie di kit commerciali. Attualmente il metodo ufficiale per la determinazione di enterotossine, approvato dall'AOAC e cui fare riferimento per la valutazione di nuovi metodi, è quello che prevede l'uso delle microslide (AOAC, 1990); questo metodo prevede diversi passaggi di estrazione e purificazione dalla matrice alimentare prima di allestire il test. Nella maggior parte dei casi i kit commerciali di microslide gel double diffusion prevedono il riconoscimento di più tossine insieme, infatti si parla di antisieri SET (Staphylococcal enterotoxins). I metodi ELISA sopra citati fanno uso di due anticorpi per l'allestimento di un ELISA della tipologia a sandwich (Freed et al., 1982); essi mostrano un limite di rilevabilità di 1 ng/g di alimento ed il test prevede comunque una procedura di estrazione dell'alimento. I kit commerciali TRANSIA PLATE si basano proprio sulla combinazione di anticorpi monoclonale e policlonale.

#### ***ECHERICHIA COLI O157:H7***

*E. coli* è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è mobile per ciglia peritriche od immobile; i membri di tale famiglia sono molto diffusi. *E. coli* in particolare è uno dei principali commensali del colon dell'uomo e di altri animali a sangue caldo. Alcuni ceppi di *E. coli* possono essere patogeni sia per l'uomo che per gli animali, tali ceppi sono ben conosciuti e distinti in base al loro potere virulento (Notaro JP et al., 1998). Questo microrganismo rientra in quel gruppo di batteri la cui modalità di trasmissione è a prevalente diffusione oro-fecale, per cui l'uomo e gli animali a sangue caldo costituiscono la sorgente o serbatoio di infezione del microrganismo (Meloni C, 1990). I ceppi enteropatogeni

possono distinguersi in base alla loro interazione con la mucosa intestinale, alla sintomatologia indotta nei soggetti colpiti, alle differenze sierologiche ed epidemiologiche in quattro categorie: *E. coli* enteropatogeni (EPEC), *E. coli* enteroinvasivi (EIEC), *E. coli* enterotossigeni (ETEC), *E. coli* enteroemorragici (EHEC) o *E. coli* O157:H7. Gli EPEC sono responsabili di una patologia che si manifesta con diarree, febbre, vomito e crampi addominali. Gli EIEC sono caratterizzati dalla loro capacità di penetrare la mucosa del colon dove proliferano determinandone la lisi. Gli ETEC sono in grado di produrre una o più tossine, sia termostabili sia termolabili (LT1, LT2: labile toxin). Uno di questi gruppi è caratterizzato dalla produzione di una potente citotossina che inibisce la sintesi proteica nelle cellule eucariotiche.

#### ***-infezione alimentare da E. coli O157:H7***

Come detto in precedenza le verotossine o tossina Shiga-like, prodotte da ceppi patogeni come *E. coli* O157:H7, sono state riconosciute responsabili di coliti emolitiche e sindrome uremica emolitica (HUS). La patogenesi associata a queste tossine, come del resto a ogni fattore tossico per la salute umana, prevede diversi passaggi caratterizzati da una complessa interazione fra una serie di fattori legati a *E. coli* Stx produttore (STEC) e l'ospite. Innanzitutto è necessario che l'ospite ingerisca cellule di STEC e che questa superino la barriera gastrica, raggiungano l'intestino e lo colonizzino competendo con gli altri microrganismi. Le tossine, prodotte dopo adesione all'epitelio intestinale, vengono assorbite e trasportate nel torrente sanguigno. Questo permette un trasporto delle tossine verso i recettori posti sulla superficie delle cellule target inducendo effetti locali e sistemici (Paton J et al., 1998). Tre giorni dopo l'ingestione del microrganismo il paziente sviluppa diarrea, crampi addominali, febbre e vomito. La diarrea diventa sanguinolenta due-tre giorni dopo, raramente ciò accade al primo giorno. Dopo quattro o cinque giorni la diarrea regredisce e nell'85% dei casi vi è la spontanea guarigione, solo nel 15% dei casi l'infezione può evolvere a sindrome uremica emolitica (Tarr PI et al., 2005), soprattutto nei bambini al di sotto dei 10 anni. In Italia il ceppo O157 è quello maggiormente coinvolto nella patologia emolitica uremica. In studi epidemiologici sviluppati in tre anni è stato evidenziato che 49 bambini italiani affetti da HUS il siero del 50% di questo campione presentava anticorpi contro il lipopolisaccaride (LPS) del ceppo O157 (Caprioli A et al., 1992) Ai pazienti con conclamata o sospetta enterite STEC possono essere somministrati antibiotici. Nel 1993, in seguito ad un'esplosione di tossinfezione da VT avvenuta nel Washington, furono somministrati antibiotici nella prima

fase della malattia: la terapia non fu associata ad un minore rischio di HUS. Gli antibiotici possono anche incrementare il rischio di HUS negli adulti. Il meccanismo con cui l'antibiotico induce una maggiore produzione non è ancora ben chiaro: l'aumentata presenza della tossina nell'organismo potrebbe essere attribuita al fatto che l'antibiotico, provocando la lisi cellulare, induca un maggiore rilascio di tossina; ma è anche possibile che i batteriofagi, sui quali il gene *stx* è localizzato, rispondano all'antibiotico attivando un meccanismo SOS che porta alla produzione di maggiore tossina (Kimmit P et al., 2000).

#### **-tossine da *E.coli* O157:H7**

Konowalchuk e colleghi furono i primi a descrivere le tossine prodotte da particolari sierotipi di *E. coli* e chiamarle Verotossine per i loro effetti citotossici sulle cellule Vero. Successivamente O'Brien e collaboratori scoprirono che la tossina era immunologicamente, strutturalmente e geneticamente quasi simile alla tossina prodotta da *Shigella dysenteriae* del tipo I e da qui deriva il loro nome Shiga like toxin (Acheson DWK, 1998). Pertanto questi ceppi sono sia chiamati *E.coli* Stx-producenti (STEC: Stx-producing *E. coli*) sia *E. coli* VT-producenti (VTEC: VT-producing *E. coli*). *E. coli* enteroemorragici possono produrre due tossine VT antigenicamente distinte, verotossina1 (VT1) e verotossina2 (VT2) (O'Brien et al., 1980). Il termine *E.coli* enteroemorragico (EHEC: enterohaemorrhagic *E. coli*) fu coniato in seguito a due episodi di tossinfezione alimentare di notevole portata caratterizzati da colite emorragica, feci sanguinolente e assenza o lieve presenza di febbre, avvenuti negli USA nel 1982 (Riley et al., 1983); uno dei responsabili di tale patologia è *E. coli* O157:H7. Esso prende questa nomenclatura per il fatto che esprime il 157esimo antigene somatico (O) e il settimo antigene flagellare (H). Nel 1983 Karmali e i suoi colleghi rilevarono un'associazione fra l'infezione dovuta a *E. Coli* che produce Shiga toxins (incluso *E. Coli* O157:H7) e sindrome uremica emolitica (hemolytic uremic syndrome HUS) (Karmali et al., 1983). Le Shiga toxin (Stx) o verotossine sono proteine dal peso molecolare di circa 70 kDa costituite da diverse subunità: una singola subunità catalitica di 32 kDa (A) e da più subunità di 7.7 kDa (B), quest'ultima è coinvolta nel legame della tossina a specifici recettori situati sulla cellula target dell'ospite (O'Brien et al., 1987). Studi biochimici e analisi cristallografiche hanno concluso che le Stx sono caratterizzate da cinque subunità B: un pentamero ad anello, il quale accerchia la parte C-terminale, disposta ad elica, della subunità A. Tali monomeri sono legati covalentemente tramite ponti disolfuro (Fraser ME et al., 1994). La subunità A si trasforma nella sua forma enzimaticamente attiva rompendo i ponti disolfuro con le altre

subunità e inibendo la sintesi proteica della cellula colpita; le VT sono simili ad altre tossine batteriche bifunzionali come la tossina colerica, la tossina difterica e l'esotossina A di *Pseudomonas* (Middlebrook JL et al., 1984). Molto probabilmente queste tossine sono localizzate nel periplasma della cellula batterica e vengono rilasciate nel mezzo dopo morte della cellula (Griffin et al., 1983). Studi condotti attraverso test di inibizione con anticorpi monoclonali contro la subunità B, marcata con  $^{125}\text{I}$ , hanno concluso che il recettore specifico per il legame della tossina sulla cellula eucariotica è una glicoproteina (Donohue-Rolfe A et al., 1984) ed in particolare la componente glucidica è costituita da globotriosilceramide (Gb3), che costituisce il sito di attacco specifico. Dopo riconoscimento del recettore specifico la tossina entra nella cellula ospite per endocitosi. Il meccanismo con cui dalla subunità A viene generata la forma enzimaticamente attiva non è ben conosciuto: è presumibile che ci sia una proteolisi e riduzione dei ponti disolfuro. Il frammento attivo  $A_1$  all'interno del citosol si lega al ribosoma 60S, inducendo l'inibizione della sintesi proteica e la morte della cellula (Itoh K et al., 2001). La ricina, proteina tossica di organismi vegetali, presenta lo stesso meccanismo di azione delle Shiga toxin sulle cellule eucariotiche. Data la capacità di tali proteine di entrare nella cellula, diversi studi sono stati recentemente condotti circa la possibilità di utilizzare la tossina (in forma inattiva), o parte di essa, per veicolare all'interno della cellula molecole di interesse a scopi terapeutici (Sandving K et al., 2000).

#### ***-incidenza delle verotossine negli alimenti***

*Escherichia coli* stx produttore si ritrova prevalentemente nell'intestino di numerose specie animali, dove trova l'habitat elettivo per lo sviluppo e la produzione di tossine. Numerose specie animali, che costituiscono alimento per l'uomo, possono rappresentare una sorgente di STEC: durante le fasi di macellazione e produzione della carne sono possibili contaminazioni delle parti carnee destinate al consumo con l'intestino dell'animale. La carne bovina e suina è considerata la maggiore fonte di infezione nell'uomo, soprattutto se cotta male; ma anche frutta e verdura lavate o irrigate con acque non igienicamente idonee all'uso (Caprioli A et al., 2004). E' stato condotto uno studio su campioni di carne di diversa tipologia (carne tritata, hamburger, hamburger con aggiunta di prodotti vegetali, polpette) raccolti nel nord Italia; dall'analisi PCR (Polimerase Chain Reaction) di questi campioni sono risultati positivi alla presenza di *E. coli* 24 campioni di carne tritata (16%), 13 campioni di hamburger con aggiunta di vegetali (circa 9%), fra questi solo 3 (2%) campioni sono risultati positivi alla presenza di *E. coli* O157 vt2+ (Stampi S et al., 2004). Sebbene costituiscano una percentuale

molto più bassa rispetto ai prodotti carnei, anche nel latte crudo e in prodotti lattiero-caseari provenienti da latte non pastorizzato è stata riscontrata la presenza di ceppi *E. coli*O157 (Conedera C et al., 2004).

#### ***-metodi attuali per la determinazione di verotossine negli alimenti***

Il metodo di riferimento per la determinazione di verotossine in un campione è rappresentato dal test di citotossicità su cellule Vero (cellule di rene di scimmia verde africana), chiamato anche “gold standard”. In questo metodo la presenza di verotossina in un campione viene valutata in base alla capacità di provocare la morte del 50% delle cellule (CD<sub>50</sub>) rispetto ad un riferimento (Gentry MK et al., 1980) Questo metodo, sebbene sia quello convenzionale, richiede diversi giorni di lavoro (4 giorni) per ottenere il risultato. L’isolamento di ceppi di *E. coli* aventi il sierotipo O157 da un alimento non è condizione necessaria e sufficiente per definire la tossicità dell’alimento, a causa della esistenza di ceppi di *E. coli* verocitoproduttori non-O157 e di *E. coli* O157 non verocitoproduttori. Molti studi attuali condotti su alimenti prevedono l’uso dell’analisi PCR. I risultati ottenuti nei lavori sopra citati (Caprioli A et al., 2004; Conedera C et al., 2004) fanno infatti ricorso prima ad un arricchimento del campione per amplificare la dose microbica esistente, e poi all’isolamento di *E. coli* O157 tramite test biochimici (mancata fermentazione del sorbitolo su terreni di coltura), o tramite PCR (presenza del gene vt1 e vt2). Sono disponibili in commercio vari kit basati su saggi immunochimici per la determinazione di verotossine negli alimenti:

1. VTEC-RPLA, limite di sensibilità: 1-2 ng/mL;
2. E. COLI ST EIA, limite di sensibilità: 10 ng/mL;
3. RIDASCREEN Verotoxin, sensibilità: non indicata nelle specifiche del prodotto;
4. Verotoxin, Cypress Diagnostics, sensibilità: non indicata nelle specifiche del prodotto.

La sensibilità, ove indicata, è espressa in termini di minima concentrazione di verotossina richiesta per ottenere una risposta positiva al test. Secondo le procedure indicate nelle istruzioni per l’uso dei kit, il campione sottoposto ad analisi è, in ogni caso, il soprannatante della cultura ottenuta arricchendo in condizioni selettive i batteri isolati dall’alimento. La preparazione del campione (isolamento dei batteri e loro amplificazione) richiede pertanto tempi lunghi e manipolazione di ceppi a rischio biologico potenzialmente elevato. Altri kit commerciali, come TRANSA-CARD e TRANSIA-PLATE sono utili per il riconoscimento solo delle cellule, infatti la loro sensibilità è espressa in ucf/g (1 ucf/25g di campione) e comunque richiedono 1-2 giorni di lavoro. Sono disponibili in commercio anche test ELISA:

“*E.coli* O157 antigen detection” ed “*E.coli* verotoxin”. Entrambi sono ELISA sandwich, nel primo caso l’anticorpo policlonale legato alla piastra riconosce un antigene somatico, pertanto esso dà informazioni circa la presenza dell’agente biologico; mentre nel secondo caso l’anticorpo legato alla piastra riconosce le verotossine ma si hanno solo informazioni di tipo qualitativo (presenza/assenza) della tossina (Diagnostic Automatic).

D’altra parte, non è reperibile in commercio un prodotto che consenta la determinazione delle verotossine presenti nell’alimento in maniera diretta, in cui cioè il “campione” sia l’alimento stesso o un suo estratto proteico. Un tale metodo risulterebbe più veloce e più sicuro e, in aggiunta a questo, potrebbe essere utilizzato per valutare la reale tossicità di un alimento contaminato da *E. coli* verocitotoxigeno, attraverso il diretto confronto della quantità di verotossine riscontrata nell’alimento con i dati sulla tossicità delle verotossine disponibili in letteratura. La elevata sensibilità delle cellule Vero a queste tossine fu inizialmente osservata da Konowalchuk et al. (Konowalchuk, J., J.I. Speirs, and S. Stavric Vero response to a cytotoxin *E. coli*. Infect Immun.) e il test di citotossicità su questa linea cellulare rimane pertanto il test di riferimento per la determinazione di ceppi di *E. coli* produttori VT.



## 2. OBIETTIVI

La sicurezza alimentare è un argomento di sempre crescente e rinnovato interesse, ne sono conferma le continue introduzioni di direttive e leggi in merito. Particolare attenzione è rivolta alla possibilità di ottenere metodi rapidi e sensibili per la determinazione di qualsiasi fattore di rischio per la salute umana. Scopo del lavoro è stata la messa a punto di una metodologia immunochimica per la determinazione di tossine batteriche negli alimenti, basata sulla combinazione di una immunoseparazione su fase solida con un dosaggio ELISA. Sono state scelte come modello di studio due fra le più importanti tossine batteriche in grado di scatenare, se ingerite, reazioni patologiche nell'uomo: l'enterotossina B di *Staphylococcus aureus* e l'enterotossina VT2 di *Escherichia coli* O157:H7. Le potenzialità di rivelazione della metodologia sviluppata sono state verificate nell'ambito dei prodotti lattiero-caseari.

### 3. MATERIALI E METODI

L' enterotossina B da *St.aureus* è stata fornita da Toxin Technology (Sarasota, FL, USA), gli anticorpi policlonali IgG anti-SEB, prodotti in coniglio, sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA) e Toxin Technology (Sarasota, FL, USA). Gli anticorpi monoclonali anti-SEB, prodotti in topo, sono stati forniti da Advanced Immunochemical Inc. Sono stati usati, per la determinazione di tossina in matrice latte e formaggi, i seguenti campioni: latte commerciale, latte di pecora individuale da allevamento locale, tre campioni di latte inoculati con ceppi di *St.aureus* produttori le enterotossine A e B e un campione di formaggio Grana (24 h) contaminato con ceppi di *St. aureus* (i campioni contaminati con ceppi sono stati preparati nell'ambito del progetto SIFORTI finanziato dal MIUR). L'enterotossina VT2 è stata fornita da Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA), gli anticorpi monoclonali, prodotti in topo, antiVT2A e antiVT2B da Biodesign International. La linea cellulare Vero è stata fornita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (Portici, Italia). I ceppi E. coli 43894, verocitoproduttore, e 25922, non verocitoproduttore, sono ATCC. Sono state usate sferule magnetiche di polistirene rivestite da poliuretano (DBs M-280 Tosylactivated, Dynal, Norway) in sospensione in una soluzione di tampone fosfato contenente 0.1% BSA e 0.02% NaN<sub>3</sub> alla densità di 2x10<sup>9</sup>/mL (circa 30 mg/mL). Le caratteristiche fisiche delle DBs (DBs) sono le seguenti:

diametro 2.8 µm +/- 0.2 µm;

superficie 4-8 m<sup>2</sup>/g;

capacità di legame 50 µmol/g;

densità (1.3 g/cm<sup>3</sup>).

#### 3.1 Utilizzo delle DBs

Per rimuovere la sodio azide, prima dell'uso, le DBs sono state lavate due volte con il tampone A (0.1 M Na-phosphate pH 7.4, preparato sciogliendo in acqua distillata 2.62 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O e 14.42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O e portando il volume ad 1 litro). Per raccogliere le sferule durante l'allontanamento del surnatante ed i lavaggi a temperatura ambiente è stato usato un concentratore di particelle magnetiche (Dynal MPC, Norway).

*-lavaggio delle DBs*

Le DBs sono state risospese e agitate su Vortex per circa 1 minuto. Aliquote di 100  $\mu$ L di questa sospensione, versate in un tubo, sono state sottoposte all'azione del campo magnetico del concentratore per 4 minuti. Il surnatante è stato allontanato e le DBs sono state risospese in 400  $\mu$ L di tampone A e la soluzione agitata su Vortex per 1 minuto.

*-legame dell'anticorpo alle DBs (Coating)*

Dopo la procedura di lavaggio precedentemente descritta, l'antisiero (anti-SEB, anti VT2) è stato diluito nel tampone A (1:10 v/v). La concentrazione ottimale di antisiero, tenendo conto delle indicazioni della casa produttrice, è di 3  $\mu$ g di ligando/  $10^7$  DBs (circa 20  $\mu$ g/mg), ma le quantità vanno valutate a seconda delle condizioni sperimentali.

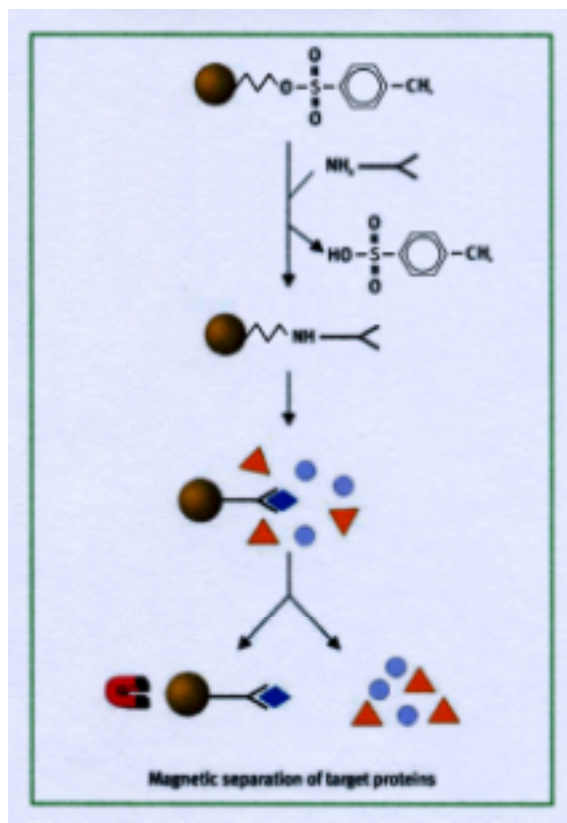
L'antisiero è stato aggiunto alla sospensione delle DBs e agitato su Vortex per circa 1 minuto. La soluzione finale è messa in incubazione a 37 °C per 24 ore in agitazione. Dopo l'incubazione il tubo contenente la soluzione è stato posto in DMC per 4 minuti ed il surnatante è stato allontanato. Le DBs così condizionate (coated-DBs) sono state lavate quattro volte: due volte con il tampone C (tampone salino, PBS, pH 7.4 con 0.1% p/v BSA, preparato sciogliendo 0.88 g di NaCl e 0.8 g BSA in 0.01 M di sodio-fosfato pH 7.4 e portando il volume a 100 mL) per 5 minuti a 4 °C, una con il tampone D (0.2 M Tris pH 8.5 con 0.1 % (p/v) BSA, preparato sciogliendo 2.24 g di Tris in acqua distillata, aggiustando il pH a 8.5 con 1 M HCl e portando il volume a 100 mL) per 4 ore a 37 °C ed un'ultima volta con il tampone C per 5 minuti a 4 °C. In tale tampone le DBs così trattate sono state conservate a 4°C.

*-Uso delle DBs condizionate (coated-DBs): legame all'antigene*

La sospensione, a titolo noto di DBs legate all'anticorpo, è stata agitata su Vortex per 1 minuto. È stato prelevato un volume tale da contenere  $2 \times 10^8$  sferule e immesso in un tubo, poi sottoposto al Dynal MPC per 4 minuti. Il surnatante è stato allontanato e le sferule sono state rimosse dal Dynal MPC e risospese in 400  $\mu$ L del tampone C contenente l'enterotossina stafilococcica B (SEB). La soluzione è stata tenuta in incubazione a 37 °C per 1 ora in agitazione. Dopo l'incubazione la soluzione è stata sottoposta per 4 minuti all'azione dell'MPC e il surnatante è stato allontanato.

Le sferule, legate al complesso antigene-anticorpo, sono state lavate 4 volte con il tampone C (400  $\mu$ L). Dopo la procedura di lavaggio ed essiccazione le sferule sono state risospese in una soluzione 50 mM di glicina a pH 2.5 in rapporto 1:1 v/v e la soluzione agitata per 1 minuto e poi posta nell'MPC. Il surnatante è stato raccolto e utilizzato per le analisi, mentre le DBs,

risospese in 400  $\mu$ L di tampone C, sono state conservate per essere riutilizzate. I passaggi per l'utilizzo delle DBs sono illustrati nel seguente schema:



### 3.2 Preparazione di campioni di latte e formaggi

La contaminazione di campioni di latte commerciale e di pecora individuale è stata ottenuta aggiungendo quantità differenti di tossina SEB (Toxin Technology) a 10 mL di latte. Le sieroproteine sono state separate secondo Aschaffenburg e Drewry (1959) e concentrate 100 volte. Dagli stessi campioni di latte commerciale e di pecora sono state separate e concentrate con membrane Millipore (cut-off 10 kDa) le sieroproteine utilizzate come controllo negativo. Per i campioni di formaggio contaminato con ceppi di *St. aureus* è stata analizzata la frazione proteica solubile a pH 4.6.

### 3.3 Elettroforesi bidimensionale

Questa analisi è stata condotta secondo il metodo descritto da O' Farrell et al (1975). La prima dimensione, una focalizzazione isoelettrica, è stata fatta con apparecchio Ettan IPGphor (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), mentre la seconda dimensione SDS-PAGE è stata condotta usando il Sistema Miniprotean (BioRad, Hercules, CA). 4  $\mu$ g di tossina SEB (Toxin Technology) è stata diluita nella soluzione di reidratazione (8 M urea, 2%

Chaps, 100 mM DTT, 0.5% v/v IPG Buffer pH 3-10, 0.002% blu di bromofenolo) fino ad un volume finale di 125  $\mu$ L e applicata per la fase di reidratazione (in accordo con le istruzioni d'uso del sistema) su IPGStrip 7 cm, pH 3-10 per 12 h; dopo le proteine sono state sottoposte a focalizzazione isoelettrica a 10000 V/h e ad un massimo di voltaggio di 5000 V. Dopo IEF, le proteine sono state denaturate (riduzione-alchilazione) per immersione delle strip in soluzione di equilibratura (6 M urea, 2% SDS, 30% glicerolo, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8) contenente 0.135 M iodoacetamide per 5 minuti. Le IPGstrips sono state caricate sulla parte superiore del gel SDS-PAGE (7 cm  $\times$  10 cm, 12% w/v polyacrylamide) e saldate al gel con una soluzione allo 0.5 % di agarosio. L'SDS-PAGE prevede un primo gel di poliacrilammide detto gel di avvio o "stacking gel", a pori larghi, ed un secondo gel di corsa o "running gel", in cui la migrazione avviene in funzione della massa delle particelle. La seconda dimensione SDS-PAGE è stata condotta usando Tris-glycine-SDS buffer system (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine and 0.1% SDS) a 15 mA/gel, finché il fronte non ha raggiunto il margine inferiore del gel.

### **3.4 Immunoseparazione con anti-SEB coated-DBs e SDS-PAGE**

La frazione solubile a pH 4.6 di un latte individuale di pecora (1 mL) è stata incubata con 50  $\mu$ L di antiSEB coated-DBs ed eluita secondo la procedura descritta per l'utilizzo delle DBs. La stessa preparazione di DBs è stata rigenerata con lavaggi con tampone B e incubata con lo stesso campione di sieroproteine, e successivamente è stata condotta l'eluizione. Il passaggio incubazione-eluzione è stato ripetuto 5 volte. I volumi eluiti ad ogni passaggio sono stati riuniti e il volume finale diluito 1:1 con tampone AmBic 50 mM pH 8.5. Il campione è stato portato a secco e sciolto in tampone Fullington SDS-PAGE. Sono stati caricati due gel SDS-PAGE nelle medesime condizioni: 10  $\mu$ L del campione, 4  $\mu$ g di tossina SEB standard (Toxin Technology) e il riferimento dei pesi molecolari (Broad Range Prestained, BioRad). Un gel è stato utilizzato per immunoblotting e l'altro colorato con Coomassie Brilliant Blue (metanolo 50%, acido acetico 7%, 0.5 g/1L di soluzione di Coomassie Brilliant Blue R-250).

### **3.5 Immunoblotting**

I reattivi utilizzati sono: tampone PBS (1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8.0 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 136 mM NaCl; 2.7 mM KCl pH 7.4), tampone di lavaggio e soluzione saturante la membrana "blocking solution" (siero equino al 10% v/v in PBS), tampone di sviluppo (0.5 mg/mL di diamminobenzidina in Tris-HCl 10 mM pH 7.5 e  $\text{NiCl}_2$  0.6 mg/mL). Dopo l'elettroforesi, le

proteine sono state elettricamente trasferite dal gel alla membrana di nitrocellulosa con una porosità di 0.45  $\mu\text{m}$  (Towbin et al., 1979). Dopo trasferimento, la membrana è stata posta in “blocking solution” (siero equino al 10% v/v in PBS) L’immunorivelazione è stata condotta usando antisiero di coniglio (rabbit) anti-SEB (Toxin Technology) come anticorpo primario in diluizione 1:1600. Dopo 1 h di incubazione e lavaggio con la stessa soluzione di “blocking” è stato aggiunto antisiero IgG policlonale anti-rabbit, prodotto in capra, coniugato alla perossidasi (Bio-Rad, Hercules, CA) come secondo reagente diluito 1:2000. Dopo 1 h di incubazione, la membrana è stata immersa in tampone di lavaggio, poi in PBS ed infine nella soluzione per lo sviluppo della reazione colorimetrica. Questa fase è stata realizzata aggiungendo perossido di idrogeno (30%) in soluzione di sviluppo in rapporto 1:250.

### **3.6 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) con anticorpi policlonali**

Il saggio utilizzato appartiene alla tipologia “saggio a cattura di anticorpo”. L’antigene viene legato al supporto solido e dopo si aggiunge l’anticorpo. E’ stata preparata una soluzione stock di tossina (200 ng/mL) in 50 mM AmBic pH 8.5. Ad ogni pozzetto della piastra microtiter (Falcon, cod. 3911) sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di diluizioni scalari fatte in AmBic da soluzione stock di SEB (1:4<sup>n</sup>, n=8) e incubate overnight a 4°C per l’adsorbimento al supporto solido. Ogni diluizione di standard e di campione è stata saggiata almeno in duplicato. I pozzetti sono stati lavati due volte con PBS e dopo riempiti con soluzione saturante (10% v/v siero equino inattivato al calore in PBS: blocking buffer) in modo da bloccare i rimanenti siti di legame alle proteine rimasti liberi. Dopo 1 hr a 37°C le piastre sono state vuotate e 100  $\mu\text{L}$  di soluzione antisiero anti-SEB (1:1600 v/v in blocking solution) prodotti in coniglio sono stati incubati in ogni pozzetto per 1 hr a 37 °C in atmosfera umida. La diluizione ottimale di antisiero è stata determinata in esperimenti preliminari come quella che ha dato un valore di bianco (ottenuto usando solo tampone al posto dell’antigene) al di sotto del 10 % del segnale massimo. Al termine dell’incubazione in eccesso di anticorpo, il materiale non legato è stato rimosso lavando cinque volte con PBS. Dopo sono state aggiunte aliquote di 100  $\mu\text{L}$  di anticorpo goat anti-rabbit IgG coniugato con perossidasi (BioRad) per la rivelazione dell’anticorpo sviluppato in coniglio legato alle pareti del pozzetto. Dopo 1 hr di incubazione a 37°C in atmosfera umida e cinque lavaggi con PBS, sono stati caricati 100  $\mu\text{L}$  di una soluzione di tetramethylbenzidine (Sigma) 0.1 mg/mL in 0.050 M buffer citrato-fosfato, DMSO 10% v/v pH 5.0 contenente 0.01% (v/v) perossido di idrogeno in ciascuna

pozzetto della piastra microtiter. Dopo 10-15 minuti a temperatura ambiente la reazione è stata bloccata aggiungendo 100 µL di soluzione 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'assorbanza è stata misurata automaticamente a 450 nm con un lettore Microplate modello 450 (BioRad). Legami non specifici dell'anticorpo alla piastra sono stati determinati in almeno tre pozzetti nei quali sono stati caricati 100 µL di AmBic invece della soluzione di antigene e il valore medio è stato sottratto dal segnale ottenuto.

### **3.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) con anticorpi monoclonali**

Anche in questo caso è stato messo a punto un saggio a cattura di anticorpo e le condizioni ottimali sono state stabilite con preliminari esperimenti. Il saggio prevede gli stessi passaggi dell'ELISA con anticorpi policlonali, le differenze sostanziali sono nella concentrazione di tossina utilizzata per preparare le diluizioni per la curva standard e negli anticorpi del sistema di rivelazione. Da una soluzione stock di tossina di 4 µg/mL sono state preparate e caricate le diluizioni scalari nelle stesse modalità descritte sopra e l'antisiero monoclonale, prodotto in topo, è stato utilizzato nella diluizione 1:200. Il secondo anticorpo è un goat anti-mouse coniugato alla perossidasi utilizzato nella diluizione 1:2000.

### **3.8 RP-HPLC (Reversed Phase-High Liquid Chromatography)**

Il frazionamento delle proteine di interesse è stato ottenuto mediante RP-HPLC. L'apparecchiatura utilizzata è stata fornita dalla Kontron Instruments (Milano) ed è costituita da due pompe modello 420, un iniettore automatico (con loop da 100 µL) ed un Data System 450 per la programmazione e l'elaborazione dei dati. La colonna cromatografia impiegata è una Vydac C4 (214 TP, 1 x 25 cm). I solventi utilizzati sono:

A: acqua bidistillata + TFA 0.1%

B: acetonitrile + TFA 0.07%

Il campione di sieroproteine di pecora è stato preparato alla concentrazione di 1.5 mg/mL; il campione di tossina B (preparazione commerciale) è stato preparato alla concentrazione di 100 µg/mL in acqua. Il frazionamento dei campioni è stato ottenuto applicando un gradiente lineare dal 45% all'85% del solvente B in 50 minuti, ad un flusso di 2 mL/min. Le frazioni eluite sono state raccolte con raccogliatore automatico (BioRad) con frequenza di 1 frazione/min. Il volume totale delle singole frazioni è stato portato a secco con centrifuga essiccante per il saggio ELISA.

### **3.9 ELISA delle frazioni RP-HPLC del campione A e del campione B**

Ogni singola frazione portata a secco è stata ridisciolta con 150 µL di tampone AmBic 50 mM pH 8.5 e caricati 100 µL in ogni pozzetto. Le condizioni dello standard e dell'anticorpo sono le stesse di quelle riportate nella sezione "ELISA con anticorpi policlonali".

### **3.10 Saggio di citotossicità sulle cellule Vero**

Il test biologico è stato allestito secondo le condizioni descritte da Gentry MK et al. (1980). Le cellule sono state incubate nei pozzetti di una piastra microtiter (Falcon) in concentrazione  $10^4$  cellule /pozzetto e tenute in incubazione 24 h a 37 °C. Dopo incubazione è stata preparata una soluzione di tossina VT2 (Sigma) 20 ng/mL in mezzo DMEM (BioScience-Cambrex) e da questa sono state allestite diluizioni seriali ( $1:5^n$ ,  $n=8$ ) e caricati 200 µL/pozzetto in duplicato da ciascuna diluizione. Dopo 48 h di incubazione a 37 °C, il mezzo è stato allontanato e lavata la piastra con PBS, le cellule vitali aderite alla piastra sono state fissate in 10 % di formalina (200 µL) per 15 minuti a temperatura ambiente, poi colorate con Crystal Violet . L'assorbanza è stata misurata a 600 nm con un lettore Microplate modello 450 (BioRad).

### **3.11 Preparazione surnatante E.coli**

E. coli 43894 è stato inoculato in 500 mL C di mezzo di coltura LB e incubato 48 h a 37 °C. Le cellule sono state allontanate come pellet per centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti. E' stato concentrato il volume di 40 mL di surnatante fino a 5 mL con PEG (polietilenglicole) e dializzato contro tampone AmBic 50 mM pH 8.5.

### **3.12 Cromatografia a scambio anionico**

Le proteine contenute nel surnatante 43894 sono state frazionate tramite cromatografia a scambio anionico. 1 mL del campione di surnatante di *E.coli* è stato iniettato in una colonna contenente 20 mL di resina Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Sweden). E' stata utilizzata la procedura analitica descritta da MacLeod et al (1990). La cromatografia è stata condotta a temperatura ambiente ad un flusso di 1 mL/min, con un gradiente lineare di NaCl da 0 a 0.5 M. L'eluizione delle proteine è stata seguita registrando l'assorbanza a 280 nm. Le frazioni sono state raccolte con una frequenza di 1 frazione/2minuti.



## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4. DETERMINAZIONE DI ENTEROTOSSINA B CON METODI IMMUNOCHEMICI**

Nella determinazione della enterotossina B in matrici alimentari con metodi immunochemici (ELISA) spesso è emerso il problema dei falsi positivi, generalmente attribuiti a possibili cross-reazioni (Rasooly A et al., 1998), ma anche di falsi negativi (Anderson JE et al., 1986). Pertanto, nello sviluppare una nuova metodica immunochemica, è opportuno verificare l' idoneità dei reattivi ed individuare procedure analitiche atte a garantire il controllo di ogni singolo step della metodica in allestimento.

#### **4.1 Specificità di legame di due antisieri anti-SEB disponibili in commercio**

La quantificazione e rivelazione di tossine batteriche mediante metodi immunochemici richiede un'alta specificità della preparazione di anticorpi usata come reagente. A tale scopo è stata preliminarmente confrontata la specificità di legame di due antisieri anti-SEB disponibili in commercio. Una preparazione commerciale di tossina è stata separata per elettroforesi bidimensionale, trasferita su gel di nitrocellulosa e incubata in parallelo con anticorpi policlonali forniti da Sigma (Fig. 1A) e da Toxin Technology (Fig. 1B). Entrambe le preparazioni di anticorpi hanno reagito con diversi spot proteici a differente punto isoelettrico ma con un peso molecolare apparente di 28 kDa, confermando quanto già previamente osservato analizzando il campione di tossina mediante SDS-PAGE monodimensionale (risultati non mostrati). In aggiunta a questa serie di spot avente peso molecolare apparente di 28 kDa, l'antisiero fornito da Sigma riconosce un gruppo di spot a differente peso molecolare, dimostrando una minore specificità di quello fornito da Toxin Technology. Sulla base di questi risultati si è scelto di utilizzare questa ultima preparazione di anticorpi per il lavoro successivo. È opportuno sottolineare che gli anticorpi forniti da Sigma hanno evidenziato la presenza di altre specie proteiche con peso molecolare diverso da 28 kDa nella preparazione di tossina utilizzata. Nonostante ciò, tale preparazione di tossina è stata utilizzata come preparazione di riferimento dell'antigene nel corso del presente lavoro, essendo stata scelta a sua volta per il minor contenuto di contaminanti tra differenti

preparazioni commerciali messe a confronto in esperimenti preliminari (risultati non mostrati).

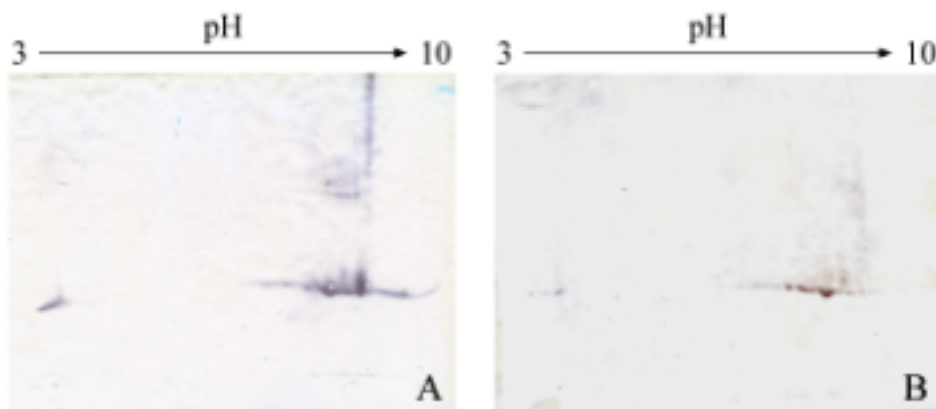


Fig. 1 Immunorivelazione di tossina SEB separata mediante elettroforesi bidimensionale con due differenti anticorpi policlonali anti-SEB

#### 4.2 Attendibilità dei saggi ELISA

E' stato messo a punto un test ELISA in eccesso di anticorpo per un'accurata e sensibile rivelazione di SEB. La variabilità tra i differenti test ELISA è stata valutata saggiando la stessa soluzione di tossina SEB standard in nove differenti esperimenti eseguiti in giorni differenti. In ogni esperimento la tossina è stata saggiata ad otto differenti concentrazioni ed il valore relativo a ciascuna concentrazione in ciascun esperimento è la media aritmetica di duplicati cui è stato sottratto il valore medio del bianco ottenuto in quel particolare esperimento. I valori così ottenuti, espressi in % del segnale massimo ottenuto in ogni singolo esperimento, e le relative deviazioni standard sono stati usati per la costruzione della "curva standard" riportata in Figura 2.

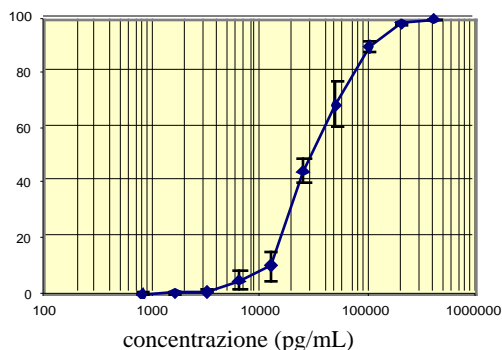


Fig. 2 Curva di risposta ELISA della tossina SEB

La concentrazione cui corrisponde la metà del segnale ELISA massimo (i.e.  $\text{concn}_{A_{\text{max}/2}}$ ), corrispondente a 30 ng/mL, ed il corrispondente intervallo di variabilità intorno a questo valore, individuato utilizzando la sua deviazione standard, sono stati considerati per la valutazione dell'attendibilità di ogni saggio ELISA successivo, nel senso che sono stati presi in considerazione i risultati dei saggi in cui il valore della  $\text{concn}_{A_{\text{max}/2}}$  ottenuto dall'analisi dello standard di tossina era incluso all'interno di detto intervallo.

### 4.3 Caratterizzazione del sistema DBs

La definizione delle condizioni sperimentali più idonee per la separazione immunomagnetica di SEB mediante DBs utilizzando la preparazione di anticorpi selezionata è stata ottenuta esaminando singolarmente ciascuno dei seguenti parametri:

#### *- capacità di legame delle DBs*

Come suggerito dalla ditta produttrice delle DBs, la quantità ottimale di anticorpo da utilizzare per il “coating” va determinata in ogni singolo caso. La capacità di legame delle DBs è stata valutata comparando la quantità di SEB eluita a partire dalla stessa quantità di DBs (50  $\mu\text{L}$ ), ma incubando con differenti quantità di anticorpo. Tre aliquote di DBs sono state condizionate, secondo la procedura del “coating” descritta nella sezione Materiali e Metodi, con tre differenti quantità di anticorpo: 6, 30 e 150  $\mu\text{g}$ . Le aliquote di DBs, dopo il “coating” con gli anticorpi, sono state incubate con la stessa quantità di SEB (36 pmol). La quantità di SEB eluita dalle tre differenti aliquote di DBs è stata determinata tramite ELISA e i risultati sono riportati in Fig. 3 A. La capacità delle DBs di legare SEB aumenta quando sono utilizzate quantità crescenti di anticorpo. Comunque, una quantità di 30  $\mu\text{g}$  di anticorpo è in grado di impegnare il 75 % dei gruppi tosil-attivati presenti in 50  $\mu\text{L}$  di sospensione di DBs e, pertanto, utilizzando una quantità superiore a 30  $\mu\text{g}$  di anticorpo, si riscontra un effetto di saturazione.

#### *- capacità di legame della tossina agli anticorpi legati alle DBs*

Al fine di valutare la capacità di legame delle DBs legate agli anticorpi, nei confronti della tossina, differenti quantità di SEB (2, 20 e 200 pmol) sono state aggiunte ad una data quantità di DBs (50  $\mu\text{L}$ ), cui sono stati legati 30  $\mu\text{g}$  di anticorpo policlonale. La separazione immunomagnetica e l'eluizione sono state condotte secondo le modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi. Le differenti quantità di SEB eluite sono state calcolate tramite test ELISA e sono mostrate in Fig. 3 B. I risultati indicano che la saturazione dei siti di legame delle DBs viene raggiunta quando si utilizzano 200 pmol di SEB. In corrispondenza

di questi risultati, la resa di legame (SEB eluita / SEB caricata) varia, rispetto alla quantità di SEB caricata, come mostrato in Fig. 3 C, dove si evidenzia che, anche nella situazione più favorevole, la resa non supera comunque il 10%. Questo limite è probabilmente dovuto in gran parte al fatto che la preparazione di anticorpi policlonali utilizzata, pur arricchita in anticorpi anti-SEB, contiene altre specie proteiche che competono con gli anticorpi anti-SEB nel legame ai gruppi tosil-attivati delle DBs. In aggiunta, è anche ipotizzabile che lo stesso ancoraggio alle DBs comprometta la capacità degli anticorpi anti-SEB di legare l'antigene.

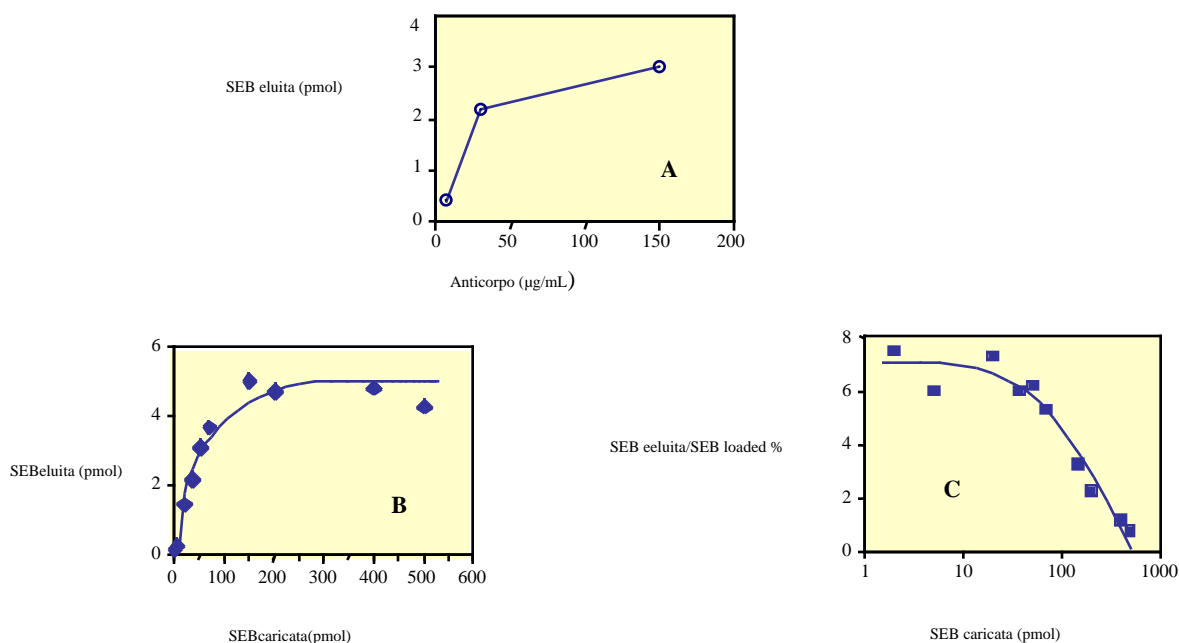


Fig. 3 Capacità di legame delle coated-DBs: (A) Recupero di SEB valutato utilizzando coated-DBs con differenti quantità di anticorpo; (B) recupero di SEB valutato utilizzando la stessa quantità di coated-DBs e differenti quantità di tossina; (C) resa di eluizione di SEB calcolata usando i dati del pannello B

#### - riutilizzo delle coated-DBs

Secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, le coated-DBs potrebbero essere riutilizzate diverse volte (24-32 volte) nei casi in cui le condizioni sperimentali utilizzate per l'eluizione dell'antigene non sono drastiche. Tale possibilità è stata valutata incubando una sospensione di 50 µL di coated-DBs con una quantità saturante di SEB ed eluendo per quattro volte di seguito. La quantità di SEB recuperata nelle quattro eluizioni successive, determinata

tramite ELISA, è mostrata in Fig. 4. In accordo con i precedenti risultati, una quantità di 5 pmol è stata determinata nella prima eluizione, ma nella seconda eluizione è ancora possibile rilevare una quantità pari al 14% della quantità iniziale di SEB, mentre una quantità trascurabile è stata ritrovata nei due step di eluizione successivi. Nelle nostre condizioni sperimentali, quindi, le coated-DBs trattengono una significativa quantità di SEB dopo la prima eluizione, che potrebbe essere rilasciata nel corso di successive eluizioni. In conclusione, è opportuno non riutilizzare preparazioni di coated-DBs, al fine di ottenere determinazioni sempre accurate e affidabili di SEB nei campioni. A tale scopo verranno utilizzate, negli esperimenti successivi, sospensioni di 10  $\mu$ L di coated-DBs in modo da destinarle all'uso di un solo esperimento.

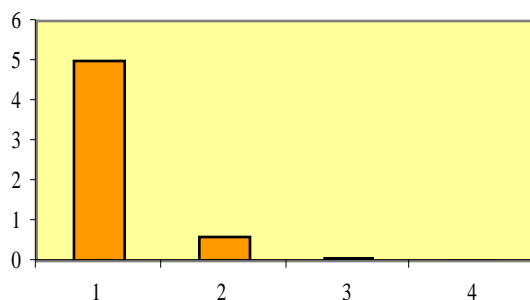


Fig. 4 Recupero di SEB da coated-DBs dopo quattro successivi passaggi di eluizione

#### 4.4 Determinazione di SEB in campioni di latte e formaggi

##### 4.4.1 campioni sperimentali

Quantità note della tossina standard sono state aggiunte a due campioni di latte acquistati dal commercio (A e B) e ad un latte individuale di pecora proveniente da un allevamento locale. Tali campioni sono stati utilizzati come sistema di controllo per il dosaggio di SEB nella matrice "latte". La frazione proteica idrosolubile dei campioni contenente la tossina è stata incubata con DBs legate ad anti-SEB e la quantità di tossina, dopo eluizione dalle DBs, è stata determinata mediante saggi ELISA. I risultati ottenuti sono illustrati nella Tabella 1, dove sono riportate le quantità di tossina aggiunte nel campione e quelle dosate con ELISA. Da come si può osservare al resa dell'esperimento risulta più alta (circa il 22 %) rispetto a quella calcolata nella sezione 4.1.3, tale miglioramento potrebbe essere attribuito all'utilizzo di un volume ridotto di coated-DBs (10 $\mu$ L): queste particelle magnetiche tendono facilmente

a compattarsi, infatti è necessaria una adeguata agitazione durante le fasi di incubazione, pertanto, a parità di volume incubato, 10 µL tendono a disperdersi di più rispetto a 50 µL e a rendere l'anticorpo più disponibile.

Campioni sperimentali	SEB caricata (ng/mL)	SEB dosata (ng/mL)
A	20.0	4.5
B	14.8	4.5
C	14.8	4.6

Tab. 1 Dosaggio di SEB in campioni sperimentali (A,B: latte commerciale; C: latte di pecora)

#### 4.4.2 campioni reali-sperimentali

Sono stati analizzati campioni di latte preparati nell'ambito del progetto SIFORTI e, più precisamente, due campioni di latte in cui è stato inoculato un mix di ceppi di *S.aureus* produttori delle enterotossine A, B (campioni L1,L2), un campione di latte, anch'esso inoculato con lo stesso mix di ceppi e il cui prelievo è stato fatto in caldaia (L3) e due campioni di Grana (24 ore) nel cui latte di partenza è stato inoculato un ceppo di *S.aureus* (L4 e L5). Tutti i campioni dopo arricchimento con coated-DBs, sono risultati positivi al dosaggio ELISA della tossina e i valori sono riportati nella Tabella 2. Secondo le caratteristiche di produzione tutti i campioni sono stati inoculati con ceppi di *S.aureus* enterotossici, pertanto i risultati ottenuti sono coerenti con un risultato positivo atteso.

campioni reali-sperimentali	SEB dosata
L1	6.0 ng/mL
L2	3.0 ng/mL
L3	12.5 ng/mL
L4	7.5 ng/g
L5	7.0 ng/g

Tab. 2 Tossina dosata tramite saggio ELISA in campioni inoculati con mix di ceppi *S.aureus* A e B (L1,L2:latte; L3: latte prelevato in caldaia ; L4, L5:formaggio Grana)

#### 4.4.3 campioni reali

Sono stati considerati campioni reali i campioni di latte commerciale e quello di pecora usati nella preparazione di campioni sperimentali prima descritti, cui era stata aggiunta la tossina.

Contrariamente alle attese, tali campioni sono risultati positivi al test ELISA rispetto alla presenza di enterotossina B ed i risultati sono riportati in Tabella 3.

Campioni reali	SEB dosata (ng/mL)
A1	3.17
C1	1.32
D1	0.75

Tab. 3 Dosaggio della tossina in campioni reali tramite saggio ELISA (A1, D1: latte commerciale; C1 latte ovino)

#### 4.5 Uso di un anticorpo monoclonale per la determinazione di SEB in campioni reali

Allo scopo di esaminare le cause per le quali è stata riscontrata la presenza di SEB in campioni commerciali di latte che, in teoria, dovrebbero essere esenti da tossine, è stata valutata prima di tutto la possibilità che la matrice latte potesse contenere una o più specie proteiche riconosciute da anticorpi contenuti nella preparazione commerciale di anti-SEB utilizzata sia nella preparazione di coated-Dbs che nei saggi ELISA. La procedura di separazione immunomagnetica di SEB già sviluppata è stata modificata sostituendo agli anticorpi policlonali anti-SEB una preparazione commerciale di anticorpi monoclonali ed è stato messo a punto un test ELISA con lo stesso anticorpo monoclonale. Sono stati analizzati nelle nuove condizioni sperimentali un campione di latte commerciale e uno di pecora (rispettivamente D ed E) e gli stessi campioni dopo aggiunta di tossina (D1 ed E1) insieme ad un campione reale sperimentale precedentemente analizzato utilizzando la preparazione di anticorpi policlonali (L3). I risultati sono riportati nella tabella 4 e confermano complessivamente quelli già ottenuti nelle condizioni sperimentali già utilizzate, nonostante il ricorso all'anticorpo monoclonale, ritenuto generalmente un reagente decisamente più specifico di una preparazione di anticorpi policlonali. Rimane da chiarire se la positività riscontrata nei campioni reali analizzati è dovuta alla effettiva presenza di SEB o se è da attribuire alla presenza di specie proteiche della matrice dell'alimento, riconosciute sia dagli anticorpi policlonali che dal monoclonale.

campioni	SEB dosata (ng/mL)
D	11.00
E	11.84
D1	8.82
E1	12.5
L3	16.22

Tab. 4 Tossina dosata con saggio ELISA in campioni sperimentali con 20 ng/mL di SEB aggiunta (D,E), campioni riferimento reali (D1, E1), campioni reali-sperimentali (L3)

#### 4.6 Strategie analitiche alternative applicate allo studio di un campione reale

Allo scopo di identificare la specie reattiva agli anticorpi anti-SEB presente nei campioni reali, nei quali non era stata fatta alcuna aggiunta di tossina, si è fatto ricorso a due differenti procedure per l'analisi delle proteine, la prima basata sulla combinazione antigenicità-peso molecolare (SDS-PAGE ed immunoblotting, § 4.4.1), la seconda sulla combinazione antigenicità-proprietà idrofobiche (RP-HPLC ed ELISA, § 4.4.2). Come campione di studio è stato scelto D1, un latte di pecora risultato positivo nelle precedenti analisi, basate sulle sole proprietà antigeniche.

##### 4.6.1 SDS-PAGE ed immunoblotting

La componente reattiva agli anticorpi policlonali anti-SEB contenuta nel latte di pecora D1 è stata separata dalle sieroproteine del latte di pecora D1 applicando il protocollo di eluizione da anti-SEB coated DBs descritto nella sezione Materiali e Metodi. Il campione ottenuto è stato analizzato mediante SDS-PAGE ed il profilo elettroforetico è stato trasferito su nitrocellulosa e immunocolorato con anticorpi policlonali anti-SEB. In parallelo un campione di SEB standard è stato analizzato nelle stesse condizioni. I risultati sono riportati in Fig. 5, dove il profilo 1 si riferisce allo standard di tossina B, mentre il profilo 2 è relativo al campione ottenuto dal latte D1 dopo eluizione da DBs. Dal confronto dei due profili si può concludere che la specie riconosciuta dagli anticorpi policlonali nel campione di latte D1 ha lo stesso peso molecolare di SEB.



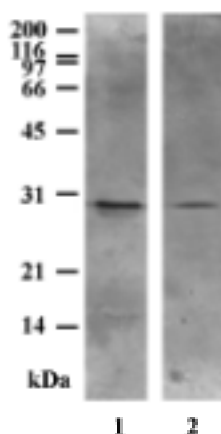


Fig. 5 Immunoblotting con antisiero anti-SEB di tossina SEB (profilo 1) e del campione di sieroproteine da latte di pecora D1 (profilo 2)

#### 4.6.2 RP-HPLC ed ELISA

Una soluzione contenente 1.5 mg/mL di sieroproteine di latte di pecora (campione D1) è stata separata utilizzando una cromatografia a fase inversa con un gradiente dal 45 all'85% di acetonitrile in 50 minuti. L'eluato è stato raccolto in frazioni della durata di 1 minuto, che successivamente sono state portate a secco e saggate mediante ELISA utilizzando gli anticorpi policlonali anti-SEB. L'assorbanza dell'eluato a 220 nm (in nero) è stata riportata in Fig. 6 insieme al segnale ELISA ottenuto da ogni frazione (in rosso). La componente proteica del campione D1 reattiva agli anticorpi è stata eluita nelle frazioni 38 e 39, in corrispondenza delle quali però non è stata registrata alcuna variazione dell'assorbanza a 220 nm rispetto al segnale di fondo. Nelle stesse condizioni è stata analizzata una soluzione contenente 100 µg/mL di tossina B standard e l'eluato è stato raccolto e saggiato con le stesse modalità (Fig. 7). Nel profilo cromatografico relativo all'assorbanza a 220 nm (in nero) è stato rilevato un picco maggioritario ad un tempo di ritenzione di 39 minuti ed in corrispondenza della frazione 39 è stato anche registrato il segnale ELISA massimo (profilo cromatografico in rosso). Confrontando i risultati riportati in Fig. 6 e Fig. 7, relativi all'analisi delle sieroproteine dal latte di pecora D1 e del campione di SEB, si può concludere che nel latte D1 è presente, in quantità non rilevabili tramite assorbanza a 220 nm, una specie proteica riconosciuta dagli anticorpi anti-SEB e con le stesse proprietà idrofobiche di SEB.

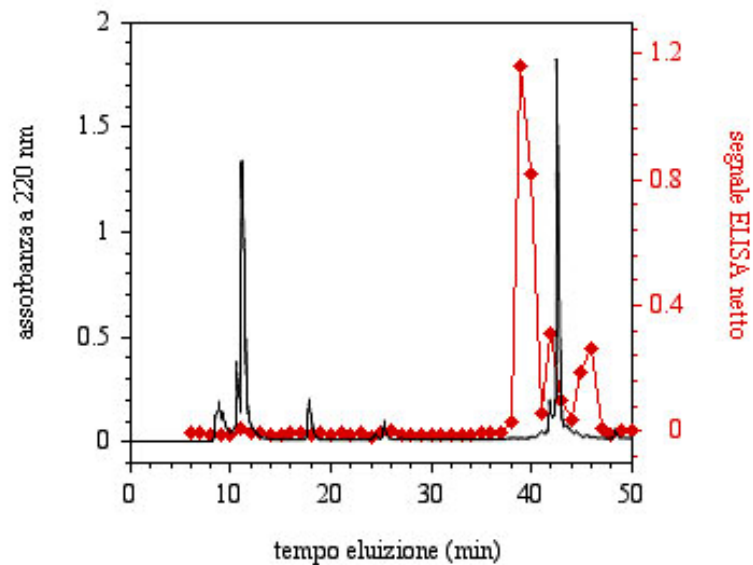


Fig. 6 Cromatografia RP-HPLC di sieroproteine pecora  
in nero:assorbanza a 220 nm; in rosso: segnale ELISA delle frazioni

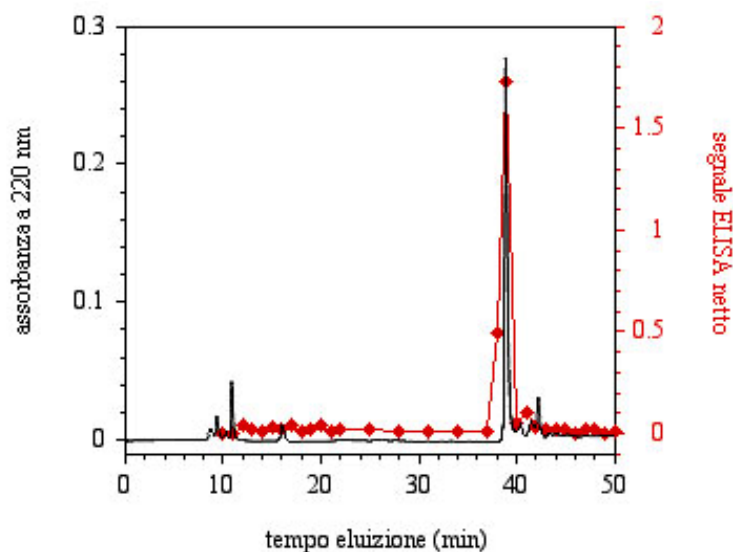


Fig. 7 Cromatografia RP-HPLC di tossina SEB  
in nero:assorbanza a 220 nm, in rosso: segnale ELISA delle frazioni

## 5. DETERMINAZIONE DI ENTEROTOSSINA VT2 CON METODI IMMUNOCHEMICI

### 5.1 ELISA in eccesso di anticorpo

Allo scopo di allestire una metodica analoga a quella sviluppata per la determinazione di SEB anche per la determinazione della verotossina VT2 è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale contro la subunità B per la messa a punto di un saggio ELISA. Anche utilizzando alte concentrazioni di una preparazione commerciale di VT2 (4  $\mu\text{g/mL}$ ) è stato ottenuto un

segnale ELISA molto basso (0.3 O.D. contro un bianco 0.05 O.D.). Questo può essere dovuto ad una bassa affinità dell'anticorpo oppure all'uso di un antigene non sufficientemente puro.

## **5.2 Saggio di citotossicità su linea cellulare Vero**

In primo luogo è stata controllata l'attività biologica dell'antigene commerciale. A questo scopo è stato utilizzato il metodo di riferimento "gold standard" per la conferma della presenza di verotossine o shiga toxins in un campione, basato sull'attività citotossica esercitata dalle verotossine su cellule Vero. Il campione commerciale di VT2 in questo test ha mostrato un'attività citotossica correlata alla quantità utilizzata. Allo scopo di valutare la ripetibilità del saggio lo stesso test è stato ripetuto 10 volte. In ogni esperimento la tossina è stata saggiata ad otto differenti concentrazioni ed il valore relativo a ciascuna concentrazione in ciascun esperimento è la media aritmetica di duplicati cui è stato sottratto il valore medio del bianco ottenuto in quel particolare esperimento. I valori così ottenuti e le relative deviazioni standard sono stati usati per la costruzione della curva di riferimento riportata in Fig. 8. la concentrazione della tossina alla quale è stata ottenuta la sopravvivenza del 50% delle cellule, corrispondente a 30 pg/mL, ed il corrispondente intervallo di variabilità intorno a questo valore, individuato utilizzando la sua deviazione standard, sono stati considerati per la valutazione dell'attendibilità di ogni saggio biologico successivo, nel senso che sono stati presi in considerazione i risultati dei saggi in cui il valore della concentrazione dello standard di tossina alla quale è stato ottenuto il 50% di sopravvivenza cellulare era incluso all'interno di detto intervallo. Il test, inoltre, risulta essere molto sensibile e ripetibile mentre il suo limite è rappresentato dai lunghi tempi richiesti per l'analisi: la colorazione con Crystal Violet delle cellule sopravvissute viene effettuata dopo 24 h necessarie per l'adesione delle cellule alla piastra multiwell e 48 h per l'incubazione delle cellule con la tossina. I dati riportati in letteratura fanno riferimento a questo test per avere informazioni di tipo qualitativo (presenza/assenza della tossina); nel corso di questo lavoro abbiamo verificato la possibilità di utilizzare questo test biologico anche per determinazioni quantitative.

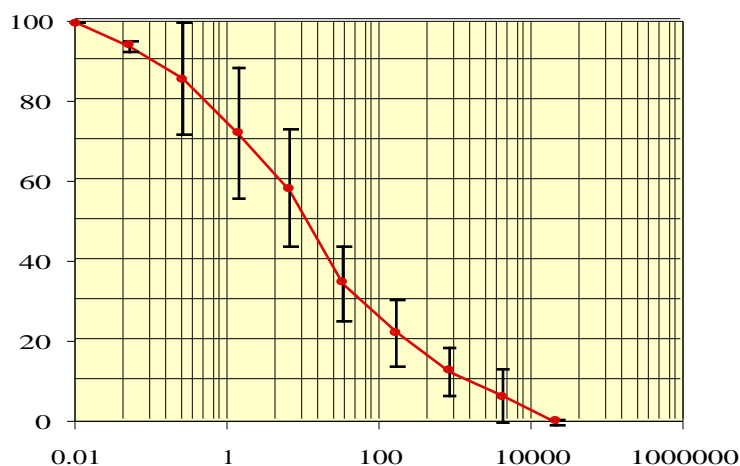


Fig. 8 Curva di riferimento test biologico: in ascisse la concentrazione della tossina in pg/mL e in ordinata sopravvivenza delle cellule

### 5.3 Inibizione della citotossicità con anticorpi monoclonali anti-VT2

Allo scopo di confermare che l'attività citotossica espressa dalla preparazione commerciale di VTII è ascrivibile alla presenza di VTII è stata valutata l'inibizione esercitata da anticorpi monoclonali anti VT2A e anti VT2B sulla citotossicità della preparazione. E' stato allestito un saggio biologico in cui gli anticorpi sono stati testati a differenti diluizioni singolarmente e in miscela fra loro, in presenza della stessa quantità di tossina. Ad un maggiore segnale O.D., indice di una più alta sopravvivenza cellulare, corrisponde un maggiore potere inibitorio degli anticorpi. L'anticorpo monoclonale contro la subunità 2B ha mostrato un maggiore potere inibitorio nei confronti dell'attività citotossica della tossina, ed è pertanto certamente in grado di legare la tossina per cui è stato scelto per gli esperimenti successivi. In Tab. 5 sono riportati i valori percentuali delle cellule sopravvissute dopo test di inibizione con gli anticorpi, confrontati con quello ottenuto in assenza di anticorpi a parità di tossina incubata con le cellule.

Anticorpo	Diluizione	% sopravvivenza cellule
-----	-----	28.0
A2	1:1000	33.0
B2	1:1000	60.4
A2+B2	1:1000	58.7

Tab. 5 Percentuale di cellule sopravvissute dopo incubazione con la sola tossina (riga 1) o con la tossina insieme agli anticorpi come indicato

#### **5.4 Analisi ELISA di VTII dopo arricchimento con anti-VTII-coated DBs**

I saggi biologici descritti in precedenza hanno fornito importantissime informazioni: la tossina VT2 è reattiva contro le cellule Vero in quantità dell'ordine dei pg, è possibile ottenere una curva standard riproducibile e l'anticorpo contro la subunità B reagisce specificamente con la tossina riducendo la sua azione citotossica contro le cellule Vero. Questi risultati, mentre hanno confermato la presenza di VT2 nella preparazione commerciale, non hanno dato alcuna informazione sul grado di purezza della tossina, fattore determinante per lo sviluppo di saggi ELISA sensibili. E' stata preparata una sospensione di 10 µL di coated-DBs con l'anticorpo anti VT2B nelle stesse condizioni utilizzate per la separazione immunomagnetica di SEB. Tale preparazione è stata incubata con 170 ng della preparazione commerciale di tossina VT2. La tossina eluita da DBs ed il campione commerciale sono stati saggiati in un test ELISA a partire da una concentrazione di 4 µg/mL. Il segnale ELISA del campione di tossina eluita era circa 5 volte superiore a quello ottenuto dal campione di tossina tal quale, benché quest'ultima è stata utilizzata a concentrazioni 10 volte superiori. In conclusione, la preparazione commerciale di tossina dovrebbe essere sottoposta a purificazione per essere utilizzata come standard per i saggi ELISA. L'immunoseparazione con DBs ha permesso in un solo step una efficace purificazione del campione. Il lavoro successivo è stato rivolto alla produzione di tossina purificata da usare come standard nei saggi ELISA partendo da surnatanti di colture di E.coli VT-producenti e utilizzando la separazione immunomagnetica come tappa di purificazione.

#### **5.5 Purificazione della tossina dal surnatante di un ceppo di *E.coli* O157:H7 VT-producente**

Per la preparazione di VT2 è stato utilizzato il surnatante di un ceppo di E.coli verocitoproduttore (ATCC 43894). In via preliminare il surnatante ottenuto da una coltura di 24 h è stato saggiato nel test di citotossicità e la sua attività è stata confrontata con quello di un ceppo di E.coli non verocitoproduttore (ATCC 25922). Dalla curva standard, ottenuta a partire da 20 ng/mL, nel surnatante del ceppo 43894 è stata dosata una quantità di tossina pari a 33.4 ng/mL mentre quello del ceppo 25922 di controllo ha dato esito negativo. In Fig. 9 è riportata la curva della sopravvivenza delle cellule Vero, espressa come assorbanza del Crystal Violet, in funzione della diluizione dei surnatanti dei due ceppi. Il valore della concentrazione di tossina presente nel surnatante del ceppo ATCC 43894 ovviamente va

considerato in termini relativi, in quanto è stato determinato utilizzando il valore di concentrazione dello standard indicato dalla ditta produttrice.

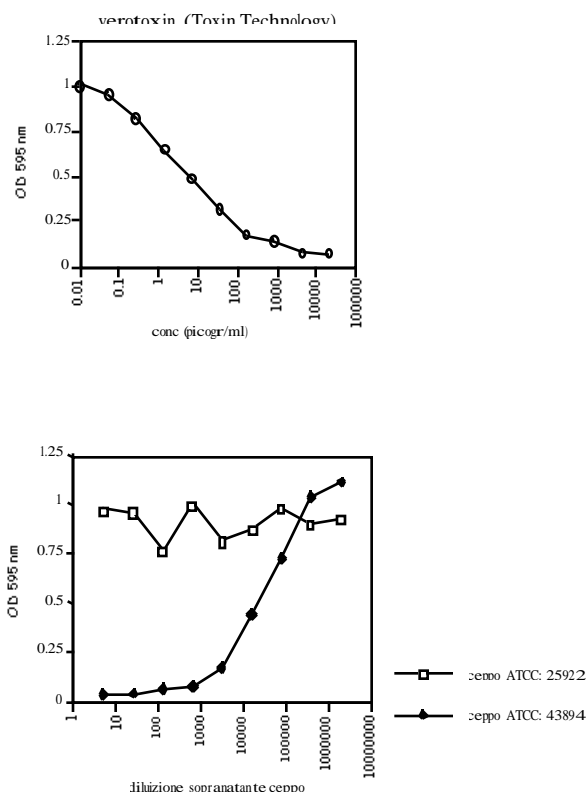


Fig. 9 Dosaggio della tossina nei surnatanti di colture di *E. coli*. Nel pannello superiore è riportata la curva di risposta dello standard ottenuta nello stesso esperimento ed utilizzata per la determinazione delle quantità.

## 5.6 Cromatografia a scambio anionico

Il ceppo 43894 è stato tenuto in coltura a 37°C per 48 h; studi precedenti hanno infatti dimostrato che la tossina viene rilasciata dopo lisi/morte della cellula batterica (O'Brien et al, 1987), pertanto la coltura è stata portata fino alla fase stazionaria. Il surnatante centrifugato, filtrato, concentrato con PEG e dializzato è stato sottoposto a cromatografia a scambio e frazioni di 2 mL sono state raccolte e saggiate dopo diluizione 1:100 nel test di citotossicità. In Fig. 10 è riportato il profilo di assorbanza a 280 nm (in nero) relativo alla separazione cromatografica ed il segnale ottenuto dalle singole frazioni nel saggio biologico (in rosso).

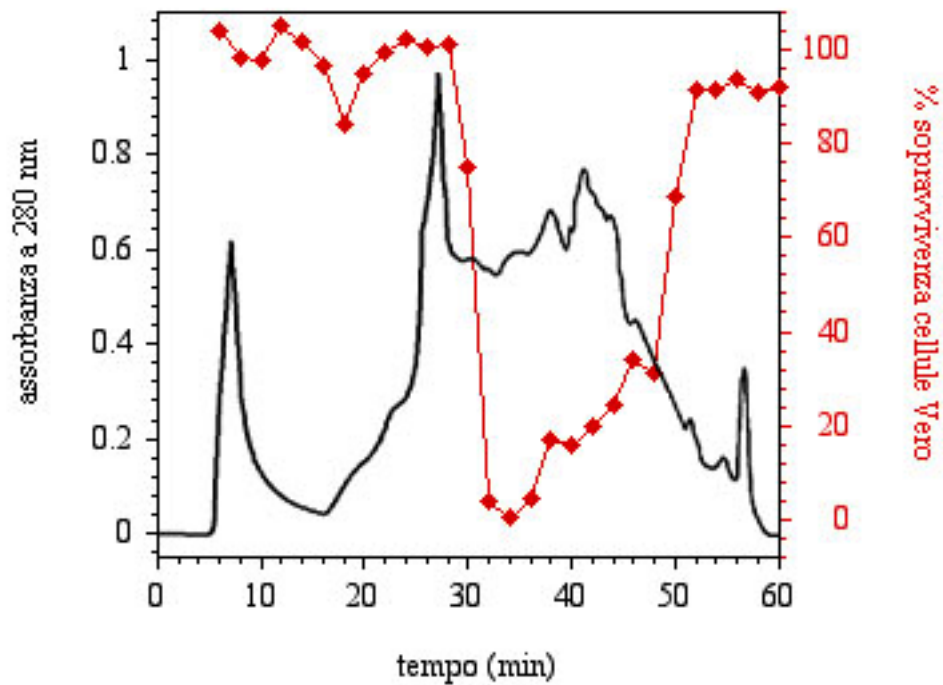


Fig. 10 Cromatografia a scambio anionico del surnatante *E. coli* in nero, assorbanza a 280 nm; in rosso, segnale saggio biologico delle frazioni

### 5.7 Arricchimento con DBs e test ELISA

Le frazioni che hanno mostrato una maggiore attività citotossicità nel test biologico (n° 16, 17 e 18, eluite dal 32° a 36° minuto) sono state incubate separatamente con 50  $\mu$ L di antiV2B-coated-DBs L'eluato da DBs è stato saggiato in sei diluizioni scalari (1:4<sup>n</sup>) in un test ELISA in eccesso di anticorpo. In Fig.11 sono riportate le curve di titolazione ottenute dalle tre frazioni cromatografiche dopo eluizione da DBs. È importante sottolineare che ciascuna delle tre frazioni cromatografiche da FPLC, prima dello step di purificazione con DBs, non avevano dato alcun segnale in un test ELISA. Come precedentemente osservato nel caso della preparazione commerciale di VTII, lo step di separazione immunomagnetica con anti-VTII-coated DBs ha consentito l'ottenimento di tossina adeguatamente purificata per essere utilizzata in saggi ELISA come standard.

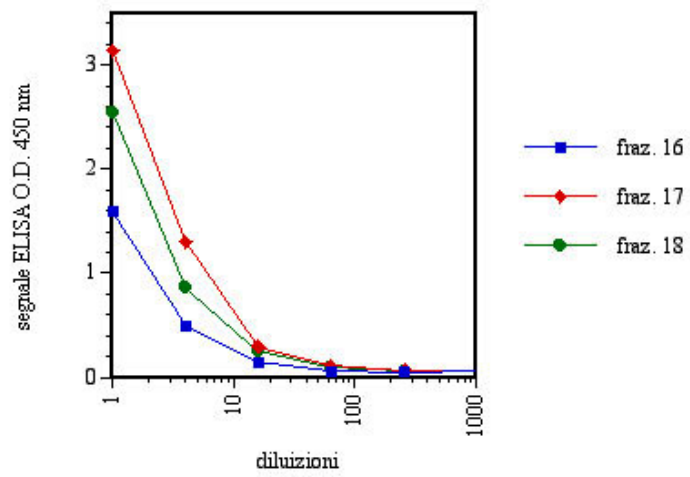


Fig. 11 ELISA delle frazioni cromatografiche dopo arricchimento con DBs



## 6. CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata proposta una metodologia immunochimica per la determinazione delle enterotossine SEB e VT2 negli alimenti. Una separazione immunomagnetica su fase solida combinata con un dosaggio tramite ELISA può consentire la determinazione quantitativa di tossine in matrici alimentari complesse. In particolare sono state definite le condizioni sperimentali ottimali per l'immunoseparazione di SEB su DBs ed è stata ottenuta una curva ELISA di riferimento per il dosaggio dell'enterotossina B da *S. aureus* dopo arricchimento con DBs. La procedura è stata applicata all'analisi di campioni sperimentali e reali e come modelli di studio sono stati scelti latte e prodotti caseari. Alcuni dei campioni di latte commerciale e ovino, utilizzati come controlli negativi, sono invece risultati positivi dopo separazione immunomagnetica e dosaggio ELISA. La positività di un campione di latte di pecora, scelto fra i campioni sopra citati, è stata studiata in maggiore dettaglio e tutte le evidenze sperimentali hanno confermato la presenza di SEB, dimostrando che la procedura sviluppata, almeno in questo caso, ha individuato selettivamente la tossina e che pertanto almeno questo campione non può essere considerato un "falso positivo".

Il grado di purezza della preparazione commerciale di Verotossina<sub>2</sub>, utilizzata come standard, ha purtroppo rallentato l'estensione della procedura analitica messa a punto per la determinazione di SEB. Adattando un saggio biologico già descritto in letteratura per l'identificazione delle verotossine, è stato possibile valutare la reattività dell'antigene (preparazione commerciale di tossina) e delle preparazioni commerciali di anticorpi nonché l'efficacia della separazione immunomagnetica di VT2 su anti-VT2-coated-DBs. Con il supporto dei dati di attività biologica della VT2 è stato sviluppato un metodo semplice di purificazione della tossina VT2 da un surnatante di *E. Coli* O157:H7 verocitoprodotto che include anche uno step di separazione immunomagnetica. È stato verificato infine che la tossina purificata seguendo questo metodo può essere utilizzata in saggi ELISA come standard.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**Acheson DWK.** 1998. Nomenclature of enterotoxins. *Lancet*. 351:1003.

**Anderson JE, Beelman RR, Doores S.** 1986. Persistence of serological and biological activities of staphylococcal enterotoxin A in canned mushrooms. *Journal of Food Protection*. 59:1292-1299

**Association of Official Analytical Chemists.** 1990. *Official Methods of Analysis*. 15<sup>th</sup> ed. AOAC, Gaithersburg, MD

**Balaban N, Rasooly A.** 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of food Microbiology*. 61:1-10

**Bankes P, Rose SA.** 1989. Rapid detection of staphylococcal enterotoxins in food with a modification of the reversed passive latex agglutination assay. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 395-399

**Beáta H, Emil H Marian F, Viera K, Jùlius G, Jan G.** 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med*. 9:179-182

**Bender AE, Bender DA.** 1995. *Dictionary of food and nutrition*. Oxford Univerity Press. Oxford. 152

**Bennett R. W.** 2005. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *Journal of Food Protection*. 68: 1264-1270.

**Bennett R. W.** 1992. The biomolecular temperament of staphylococcal enterotoxins in thermally processed foods. *J Ass Off Anal Chem* 75: 6-12

**Bergdoll MS.** 1989. *Staphylococcus aureus*. Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York. *In* MP Doyle (ed.)

**Bergdoll MS.** 1990. Staphylococcal food poisoning. *In* DO Cliver (ed), Foodborne diseases. Academic Press, San Diego, Calif.

**Bergdoll MS.** 1992. Staphylococcal intoxication in mass feeding. *In* TA Tu (ed). Food poisoning handbook of natural toxins. Marcel Dekker, New York. 7:25-47

**Betley MJ, Mekalanos JJ.** 1992. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: A comparative study of their molecular biology. *Chem Immunol.* 55:1-35

**Blackburn, C. and McClure, P.J.** (2002). Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. CRC Press.

**Caprioli A, Luzzi I, Rosmini F, Pasquini P, Cirrincione R, Gianviti A, Matteucci MC, Rizzoni G.** 1992. Hemolytic-uremic-syndrome and Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy. The HUS Italian Study Group. *J. Infect Dis. Review.* 166:154-158

**Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emergine issues on virulence and modes of trasmission. *Vet. Res.* 36:289-311

**Coleman WW.** 1995. Animal Food Safety and dairy regulation, now and in the future: from farm to fork, a state prospective. *Journal Dairy Science.* 78:1204

**Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galero G, Gramaglia M, Goffredo F, Loffredo G, Morabito S, Ottavini D, Peterlini F, Pezzetti G, Pisanu M, Semproni P, Caprioli A.** 2004. Verocytotoxin-producing *E. coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology.* 96:67-73

**Cullor JS.** 1995. Common pathogens that cause foodborne diseases: can be controlled on the dairy?. *Veterinary Medicine.* 90:185

**Devliegere F, Vermeiren L, Debevere J.** 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. 14:273-285

**Direttiva 92/46/CEE.** CONSLEG 1992L0046-01/05/2004. 35-36. Ufficio delle pubblicazioni ufficiali della Comunità Europea.

**Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Edson C, Thorley-Lawson D, Jecewicz M.** 1984. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. IX. Simplified high yield purification of Shigella toxin and characterization of subunit composition and function by use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *J Exp Med*. 160:1767-1781

**Everson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS.** 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol*. 7:311-316

**Ewald S.** 1988. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Int J Food Microbiol*. 6:141-153

**Fey H, Pfister H, Rüegg O.** 1984. Comparative valuation of different enzyme-immunosorbent assay system for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J Clin Microbiol*. 19: 34-38

**Freed RC, Evenson ML, Reiser RF, Bergdoll MS.** 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol*. 44: 1349-13

**Gentry MK, Dalrymple JM.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *Journal Clinical Microbiology*. 12:361-366

**Gill CO.** 2000. HACCP in primary processing: red meat. In: Brown MH, ed. HACCP in the meat industry. Boca Ratan: CRC Pr. 177-201

**Gomez-Lucia, Goyache Joaquin, Garden Jose A, Domenech A, Hernandez JF, Quiteria RS, Lopez B, Blanco J, Suarez G.** 1992. J Dairy Sci. 75:19-26

**Griffin DE, Gemski P.** 1983. Release of shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1 by polymyxin B. Infect Immun. 40:425-428

**HarrisTO, Grossman D, Kappler JW, Marrach P, Rich RR, Betley MJ, et al.** 1993. Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. Infect Immun. 61:3175-3183.

**Itho Kunihiko, Tekehiko T, Inoue K, Tada H, Suzuki T.** 2001. Different binding property of Verotoxin-1 and Verotoxin-2 against their Glycolipid receptor, glodotriaosylceramide. Tohoku J. Exp Med. 195:237-243.

**Johnson HM, Bukovic JA, Kautman PE.** 1973. Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. Appl. Microbiol. 26:309-313

**Johnson HM, Russel JK, Pontzer CH.** 1992. Superantigeni e malattie dell' uomo. La nuova Immunologia. Franco Celada, Le Scienze (ed.) 20: 192-193.

**Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C.** 1983. Sporadic cases of Haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia Coli* in stools. *Lancet*.i: 619-620

**Kilsby DC, Pugh ME.** 1981. The relevance of the distribution of microorganidms within batches of food to the control of microbiological hazards from foods. Journal Applied Bacteriology. 51:345-354

**Kimmit P, Harwood CR, Barer MR.** 2000. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. Emerging Infectious Diseases. 6:458-465

**Lancette G, Bennett RW.** 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In F. Downes and K Ito (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Assosation, Washington, D.C.

**Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein.** 2000. Microbiologia. 855.Edizione Zanichelli

**LeClaire R, Bavari S.** 2001. Human antibodies to bacterial superantigens and their ability to inhibit T-cell activation and lethality. Antimicrob. Agents Chemother. 45:460-463.

**MacLeod D, Gyles C.** 1990. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-Like toxin II variants. Infection and Immunity. 58:1232-1239

**Martin M Dinges, Paul M Orwin, Patrick S Chlievert.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Review. 16-34

**Martin SE, Meyers ER.**1994. *Staphylococcus aureus*. Foodborne disease handbook, diseases caused by bacteria. Marcel Dekker, New York. In YH Hui, JR Gorham, KD Murrell, DO Cliver (ed.) 345-394

**Meloni C, Pelissero G.** 1990. Epidemiologia e prevenzione delle malattie infettive a trasmissione oro-fecale. Igiene, Ambrosiana (ed.), Milano. 496

**Meloni C, Pelissaro G, Checcacci L** 1990. Effetti dei microrganismi patogeni sull'uomo. Ambrosiana( ed ) seconda edizione. Igiene.247-249

**Middlebrook JL, Dorland RB.** 1984. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. Microbiol. Rev. 48: 199-221

**Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Gianattale E., Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zoccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV.** 2005. Coagulase-positive

Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology. 98:73-79.

**Notaro JP, Kaper JB.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201

**O'Brien AD, Holmes RK.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Reviews. 51:206-220

**O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB.** 1987. Shiga and shiga like toxins. Microbiol Rev. 51:206-220.

**O'Brien AD, La Veck GD, Griffin DE, Thompson MR.** 1980. Characterisation of Shigella dysenteriae 1 (Shiga) toxin purified by anti shiga-toxin affinity chromatography. Infect Immunology. 30:170-179

**O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250: 4007-21.

**Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM.** 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect Immunol 69:360-366.

**Otero A, Garcia ML, Garcia MC, Moreno B, Bergdoll MS.** 1989. Production of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2 and Thermonuclease throughout the Growth Cycle. Applied Environmental Microbiology. 56:555-559

**Papageorgiou AC, Tranter HS, Acharya KR.** 1998. Crystal structure of microbial superantigen Staphylococcal Enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC Class II molecules and T-cell receptors. J. Mol. Biol. 277:61-79.

**Paton JC, Paton AW.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clinical Microbiology Reviews. 11:450-479

- Peterson K, Håkansson M, Nilsson H, Forsberg G, Svesson LA, Liljas A, Walse B.** 2001. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *European Molecular Biology Organization*. 20:3306-3312
- Poli MA, Rivera VR, Neal D.** 2002. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. *Toxicon*. 40:1723-1726
- Rasooly A, Rasooly RS.** 1998. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western Immunoblotting. *International Journal of Food Microbiology*. 41:205-212
- Riley LW, Remis RS, helgerson SD, et al.**1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. Coli* serotype. *N Engl J Med*. 308: 681-685
- Sandving K, van Deurs B.2000. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *European Molecular Biology Organization*. 19:5943-5950
- Rappuoli R, Montecucco C.** 1997. Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. Publication at Oxford University Press (ed). 15-17
- Stampi S, Caprioli A, De Luca G, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F.** 2004. Detection of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 90:257-262
- Su YU and Wong ACL.** 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *Journal of Food Protection*. 60: 195-202
- Takei ST, Yogesh KA, Walker SM.** 1993. Intravenous immunoglobulin contains specific antibodies inhibitory to activation of T cells by staphylococcal toxin superantigens. *J Clin. Invest*. 91:602-607
- Tarr Phillip, Gordon CA, Chandler WL.**2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 365:1073-1086.



**Tiecco G** . 1997. Igiene e tecnologia alimentare.33. Ed. Agricole

**Tiecco G** . 1997. Igiene e tecnologia alimentare. 581-585. Ed. Agricole

**Tortora GJ.** 1997. Staphylococcal food poisoning. Microbiology. An Introduction. 616-618

**Towbin H, Staehelin T, Gordon Y.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:303-10.

**U. S. Department of Agriculture.**1996. Pathogen reduction: Harard analysis and critical control point (HACCP) system: final rule. Fed. Register.61:38805-38989