

## Produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali specifici per *Escherichia coli* O157:H7

M. Luciani<sup>(1)</sup>, G. Armillotta<sup>(1)</sup>, M. Magliulo<sup>(2)</sup>, O. Portanti<sup>(1)</sup>, T. Di Febo<sup>(1)</sup>, E. Di Giannatale<sup>(1)</sup>, A. Roda<sup>(2)</sup> & R. Lelli<sup>(1)</sup>

### Riassunto

Sette anticorpi monoclonali (MAbs) specifici per *Escherichia coli* O157:H7, uno dei maggiori responsabili di colite emorragica nell'uomo, sono stati prodotti immunizzando topi Balb/c con il ceppo *E. coli* O157:H7. Tali anticorpi monoclonali non cross-reagiscono con gli altri microrganismi, come *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O14, *E. coli* JM109, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella panama*, *Salmonella saint-paul*, *Salmonella derby*, *Salmonella muenchen*, *Salmonella bredeney*, *Salmonella hadar*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* 13M, *Listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia fergussoni*, *Klebsiella pneumoniae*. Tra i sette MAbs ottenuti, è stato scelto il MAb 8B8C3 per l'allestimento di un metodo ELISA in formato sandwich, altamente sensibile e specifico per *E. coli* O157:H7.

### Parole chiave

*Escherichia coli* O157:H7, Anticorpi monoclonali, ELISA Sandwich.

### Introduzione

*Escherichia coli* è un batterio comunemente presente nel tratto intestinale dell'uomo e degli animali ed è inoltre ubiquitario nell'ambiente (3). Esistono molti tipi e molti ceppi differenti, alcuni dei quali potenzialmente patogeni. Questi, infatti, possono causare malattia nell'uomo attraverso differenti meccanismi infettivi e tossinogenici. I sintomi prodotti variano in relazione al ceppo coinvolto e alla resistenza individuale all'infezione.

*E. coli* sierotipo O157:H7 appartiene alla categoria di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC), (4, 12) produce, infatti, due gruppi di tossine che hanno un ruolo fondamentale nell'effetto patogeno chiamate: verocitossine (verocitossina 1 e 2 rRNA-N-glicosidasi) e intimina (ligando del recettore batterico Tir). E' stato identificato per la prima volta nel 1982 (21), quale uno dei principali agenti patogeni che causano diarrea emorragica e colite emorragica accompagnate da una serie di complicazioni quali sindrome emolitica-uremica (HUS) e porpora trombocitopenica (TTP). Tale microrganismo è isolato da coproculture come terzo patogeno dopo *Salmonella* e *Campylobacter*. Veicoli di infezione possono essere carne macinata di bovini e suini, consumata poco cotta, salsicce semi-stagionate ingerite crude, succhi di frutta non pastorizzati, ortaggi, acqua potabile contaminata con acqua non clorinata (22), prodotti lattiero caseari, in particolare formaggio a pasta molle e latte non pastorizzato. Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che la trasmissione può avvenire non

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

(2) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Belmeloro, 6, 40126 Bologna, Italia

solo attraverso il cibo contaminato, ma anche da persona a persona per contagio diretto (8).

Il sierotipo di *E. coli* O157:H7 è stato tradizionalmente identificato mediante test di agglutinazione ed immunofluorescenza che si avvalgono dell'utilizzo di anticorpi policlonali (1). Ma l'uso di sieri iperimmuni policlonali può dare come esito diagnostico risultati non specifici per *E. coli* O157:H7 (15, 20). Pertanto, al fine di disporre di metodi di determinazione di O157:H7 negli alimenti con caratteristiche di sensibilità e specificità elevati, oltre che di rapidità, si è ritenuto opportuno produrre anticorpi monoclonali (Mabs) dotati di caratteristiche di specificità elevate, da utilizzare in detti metodi in considerazione del fatto che le metodiche attualmente disponibili richiedono tempi lunghi e non sono altamente specifiche.

## Materiali e metodi

### Ceppi batterici

*E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 (American Type Culture Collection Rockville, Maryland), è stato utilizzato per la produzione degli anticorpi monoclonali e degli anticorpi policlonali. I seguenti ceppi batterici sono stati utilizzati per la caratterizzazione dei MAb: *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *E. coli* O14 (BGVV), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* JM109, *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella panama* ceppo di campo, *Salmonella saint-paul* ceppo di campo, *Salmonella derby* ceppo di campo, *Salmonella muenchen* ceppo di campo, *Salmonella bredeney* ceppo di campo, *Salmonella hadar* ceppo di campo, *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132), *Shigella flexneri* (ATCC 120222), *Listeria ivanovii* (ATCC 19119), *Listeria monocytogenes* 13M (ATCC 7644), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Enterobacter cloacae* ceppo di campo, *Enterobacter agglomerans* ceppo di campo, *Enterobacter amnigenus* ceppo di campo, *Citrobacter freundii* ceppo di campo, *Escherichia fergussoni* ceppo di campo, *Klebsiella pneumoniae*

ceppo di campo. Inoltre sono stati utilizzati sette ceppi di campo di *E. coli* O157:H7.

### Preparazione degli antigeni

I ceppi batterici sono stati coltivati in brain heart infusion broth (CM225, Oxoid Ltd, London) a 37° C in incubazione per 14-16 h. Successivamente, per ottenere la lisi cellulare, la sospensione è stata sottoposta a trattamento termico a 60° C per 1 h prima di essere utilizzata ad una concentrazione di  $2 \times 10^8$  cfu/ml. I batteri sono stati successivamente raccolti per centrifugazione a  $5\,468 \times g$  per 30 min e lavati per 3 volte in tampone fosfato salino 0.01M pH 7.2 (phosphate-buffered saline) (PBS) per centrifugazione  $5\,468 \times g$  per 30 min. Successivamente il pellet è stato sospeso in PBS 1x. Tale antigene è stato utilizzato nelle prove di cross-reattività dei Mabs in ELISA indiretta. Per le immunizzazioni dei topi e successivo screening ELISA degli ibridomi e per il Western blotting, la sospensione batterica di *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 è stata sonicata 2.5 min  $\times$  2 con intervallo di 5 min in bagno di ghiaccio. La concentrazione proteica di tutte le sospensioni batteriche è stata determinata mediante Kit BCA assay reagent (Pierce, Rockford).

### Immunizzazione dei topi

MAbs anti *E. coli* O157:H7 sono stati prodotti immunizzando topi Balb/c con *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 inattivato al calore e sonificato (10). Il lisato cellulare è stato diluito in adiuvante di Freund incompleto (IFA) (incomplete Freund's adjuvant, Sigma, Missouri), fino ad ottenere una concentrazione proteica di 50  $\mu$ g/ml ed è stato inoculato per via intraperitoneale. Dopo 14 giorni è stata effettuata una seconda inoculazione con 50  $\mu$ g/ml di lisato cellulare in IFA.

Successivamente sono state effettuate due inoculazioni: da 25  $\mu$ g/ml di lisato cellulare in PBS. Al 31° giorno di immunizzazione è stato effettuato un "booster" con 50  $\mu$ g/ml di lisato cellulare in PBS. Al 34° giorno, i topi sono stati sacrificati.

## Fusione cellulare e clonaggio degli ibridomi

La fusione cellulare e il clonaggio degli ibridomi è stato effettuato secondo il metodo di Galfre (6) con alcune modifiche. In breve gli splenociti dei topi immunizzati sono stati sottoposti a fusione cellulare con cellule di mieloma di topo Sp2/O-Ag-14 (ATCC, Rockville, Maryland) utilizzando Polietilglicole PEG 1 550 soluzione al 50%. Gli ibridomi sono stati coltivati, per due settimane, in terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, Missouri) contenente 20% di siero fetale bovino (foetal bovine serum, Euroclone, UK), glutammina 2 mM (L-glutamine HybriMax<sup>®</sup>, Sigma, Missouri), anfotericina-penicillina-streptomicina 100x (APS, Sigma, Missouri), gentamicina 50 mg/ml (Gentamicin Sulphate Solution, Sigma, Missouri) nistatina 10 000 UI/ml (Nystatin suspension HybriMax<sup>®</sup>, Sigma, Missouri) e HAT 50x (HAT Media supplement HybriMax<sup>®</sup>, Sigma, Missouri). Gli ibridomi secernenti anticorpi sono stati clonati secondo la metodica delle diluizioni limite (2, 7, 17). La produzione su larga scala degli anticorpi monoclonali è stata effettuata *in vitro* mediante passaggi seriali di colture di ibridomi secernenti anticorpi e raccolta dei relativi surnatanti.

### ELISA indiretta

Uno screening degli ibridomi secernenti MAbs anti *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 è stato effettuato in ELISA indiretta (18). E' stata inoltre verificata, con il medesimo metodo, la reazione crociata con altri ceppi batterici e con i vari ceppi di campo di *E. coli* O157:H7 (13). In breve, le micropiastre per ELISA a 96 pozzetti sono state attivate con 10 µg/ml di *E. coli* O157:H7 sonicato e inattivato al calore diluiti in tampone carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9.6) per lo screening degli ibridomi e con 10 µg/ml degli altri ceppi batterici inattivati al calore per quanto riguarda le prove di cross-reattività dei MAbs. Le

piastre sono state incubate per una notte a 4° C, lavate con PBS contenente 0.05% di Tween 20 (PBS-T) e saturate con 100 µl per pozzetto di PBS-T contenente estratto di lievito 1% per 1 ora a 37° C. Cento microlitri di ciascun campione, di controllo positivo (siero di topo immunizzato 1:5 000) e di controllo negativo (siero di topo 1:5 000) sono stati aggiunti ai pozzetti e la micropiastre è stata incubata per 1 h, in agitazione, a 37° C. Dopo il lavaggio sono stati dispensati, in tutti i pozzetti della micropiastre, 100 µl/pozzetto di un anticorpo polivalente, anti-mouse-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP) (Sigma, Missouri) diluito 1:2 000 in PBS-T. La micropiastre è stata incubata per 30 min a 37° C. Dopo un ulteriore lavaggio, sono stati dispensati 100 µl/pozzetto di substrato cromogeno (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA) e la piastra incubata a temperatura ambiente per 30 min. La reazione colorimetrica è stata quindi interrotta con 50 µl di acido solforico 1 N e la densità ottica (DO) misurata a 450 nm con un lettore per micropiastre. Sono stati considerati positivi i campioni il cui valore è superiore al valore soglia. Il calcolo del valore soglia è stato fatto nel seguente modo: sono stati presi 12 sieri di topi negativi per *E. coli* O157:H7, testati in ELISA indiretta verso *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato. La DO<sub>450</sub> di questi è stata determinata, la media più 3 volte la sua deviazione standard è stata considerata come cut-off (0.3). La sensibilità del metodo per lo screening degli ibridomi è stata valutata utilizzando per l'attivazione delle piastre concentrazioni decrescenti di *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 sonicato e inattivato al calore. La specificità dei MAbs è stata valutata utilizzando come antigeni in ELISA indiretta i seguenti ceppi batterici: *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Y. enterocolitica* (ATCC 23715) preparati come descritto precedentemente.

## Anticorpi policlonali

Un siero iperimmune anti *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 35150 è stato prodotto immunizzando conigli di razza New Zealand con una quantità di antigene corrispondente a 200 µg/ml di lisato cellulare di *E. coli* O157:H7 in adiuvante di Freund completo (FCA) (Freund's adjuvant complete, Sigma, Missouri), per via intradermica per 6 volte in un arco di tempo di 50 giorni (9). La frazione immunoglobulinica G (IgG) del siero è stata purificata in cromatografia di affinità con Proteina A utilizzando un sistema cromatografico (Äktapurifier, Amersham Pharmacia Biotech) e una colonna preimpaccata con Proteina A ricombinante (HiTrap rProtein A FF, 5 ml, Amersham Biosciences), tampone di attacco sodio fosfato 0.1 M, pH 7.0, tampone di eluizione Glicina-HCl 0.1 M, pH 3.0 e tampone di neutralizzazione Tris-HCl 1 M, pH 9.0. Le IgG sono state utilizzate come anticorpo capture (anti-*E. coli*). I MAbs, con isotipo IgG, sono stati purificati con lo stesso metodo di purificazione e coniugati con perossidasi (19).

## Caratterizzazione anticorpi monoclonali

L'isotipo dei MAbs è stato determinato utilizzando ImmunoPure<sup>®</sup> Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (Pierce, Rockford). La separazione elettroforetica di *E. coli* O157:H7 sonificato e inattivato è stata realizzata a corrente costante 20 mA/gel su un apparato Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell e gel di poliacrilammide al 12% Tris-HCl (Bio-Rad laboratories, California) (14). Il trasferimento su membrana di nitrocellulosa 0.45 µm, a corrente costante 35 mA per 55 min, è stato effettuato successivamente con il Mini Trans-blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad laboratories, California). La membrana di nitrocellulosa è stata saturata, per 1 ora a 37° C, con Tris-buffered saline contenente 0,05% di Tween 20 (TBS-T) e 3% di latte scremato (skimmed milk powder, Fluka, Missouri). I Mab 8B8C3, 13A12G9, 1D6C8 e 5D4G5B7, purificati e coniugati con perossidasi,

sono stato diluiti in TBS-T e le strip incubate per una notte a 4° C. Dopo i lavaggi con TBS-T, le strip di nitrocellulosa sono state trattate con Opti-4 Chloro-1-Naphthol substrate kit (Bio-Rad laboratories, California) fino alla rivelazione degli immunocomplessi (23).

## Preparazione degli antigeni per l'ELISA Sandwich

Le colonie di *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 sono state trasferite da un terreno solido selettivo per batteri gram-negativi (Herellea Agar; Biolife S.r.l., Milano) in 5 ml di brodo Luria-Bertani (LB) (Bacto<sup>®</sup> LB Broth, Lennox, Difco Laboratories, Detroit) e fatte crescere per 12-18 ore a 37° C.

I batteri lavati sono stati diluiti in tampone fosfato isotonic (phosphate-buffered saline isotonic PBSi), fino ad avere una lettura allo spettrofotometro pari a DO<sub>600</sub> di 0.6, corrispondente a circa 7x10<sup>8</sup> cfu/ml. I batteri trattati al calore sono stati utilizzati a diverse diluizioni seriali in PBSi fino ad avere delle sospensioni comprese nell'intervallo 2 x 10<sup>8</sup>-6 x 10<sup>5</sup> cfu/ml, queste sono state utilizzate come standard per ottenere la curva di calibrazione nel metodo ELISA.

Gli altri ceppi batterici testati (*E. coli* ceppo JM109, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *Y. enterocolitica* ATCC2371, *L. monocytogenes* ATCC7644) sono stati coltivati in brain heart infusion broth (CM225, Oxoid Ltd, London,) a 37° C in condizioni statiche di incubazione per 14-16 h. Successivamente, per ottenere la lisi cellulare, la sospensione è stata sottoposta a trattamento termico prima di essere utilizzata alla concentrazione di 2 x 10<sup>8</sup> cfu/ml.

## ELISA Sandwich

Le micropiastre per ELISA a 96 pozzetti sono state attivate con anticorpi policlonali verso *E. coli* O157:H7 (100 µl/pozzetto), alla concentrazione di 5 µg/ml in tampone carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9.6), incubate per una notte a 4° C, quindi saturate con PBSi contenente BSA 1% a 4° C per 2 ore.

Per il dosaggio 100  $\mu$ l delle sospensioni batteriche standard (da  $6 \times 10^5$  a  $2 \times 10^8$  cfu/ml), di controllo negativo (PBS 1x) e di brodo colturale negativo sono stati dispensati nelle micropiastre e questa è stata incubata per 1 ora a 37° C. Dopo un ulteriore lavaggio, sono stati dispensati 100  $\mu$ l/pozzetto degli anticorpi monoclonali 8B8C3, 13A12G9, 1D6C8 e 5D4G5B7 purificati, diluiti 1:250 v/v in PBSi con Tween20 0.05% (PBSi-T) e la micropiastre è stata incubata per 1 ora a 37° C.

Dopo un ulteriore lavaggio, sono stati dispensati 100  $\mu$ l/pozzetto di anticorpo anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano (Miles Scientific, Naperville) diluito in PBSi, e incubata per 30 minuti al buio a 25° C.

Per effettuare la rivelazione colorimetrica sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di substrato cromogeno per perossidasi (HRP) [1,2-fenilendiammina (0.5 mg/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.25 mmol/l) in tampone citrato (0.05 mol/l), pH 5.0] e la piastra è stata incubata per 20 minuti al buio a temperatura ambiente.

La reazione colorimetrica è stata quindi bloccata con 100  $\mu$ l di acido solforico 4 N e la densità ottica OD misurata a 492 nm con un lettore per micropiastre (Multiskan EX, Labsystems) (11). Per effettuare la rivelazione chemiluminescente sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di substrato chemiluminescente per HRP costituito da luminolo/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/enhancer (PIERCE, Rockford) ed il segnale è stato immediatamente misurato mediante luminometro per piastre microtiter (Luminoskan Ascent, LabSystem). La curva di calibrazione è stata ottenuta riportando su grafico il segnale registrato (assorbanza o emissione chemiluminescente) in funzione della concentrazione batterica. Per valutare la specificità dell' ELISA sandwich sono state analizzate sospensioni batteriche di *E. coli* ceppo JM109,

*S. Typhimurium* (ATCC14028), *Y. enterocolitica* (ATCC23715), *L. monocytogenes* (ATCC7644).

## Risultati

### Screening degli ibridomi

Sono state effettuate 6 diverse fusioni di splenociti murini con la linea tumorale Sp2/O-Ag-14 dalle quali sono stati ottenuti e quindi testati 3 612 surnatanti di ibridomi cellulari, di questi 101 ibridomi sono risultati essere positivi in ELISA indiretta verso *E. coli* O157:H7 (DO<sub>450</sub>≥0.3). Un primo controllo di cross-reattività è stato effettuato utilizzando come antigeni: *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150), (ATCC 14028), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Y. enterocolitica* (ATCC 23715); 34 MAb sono risultati positivi solo per *E. coli* O157:H7 e negativi nei confronti degli altri 3 antigeni testati. Un ulteriore screening ELISA di questi 34 anticorpi monoclonali con 25 antigeni batterici ha portato ad identificare sette MAb che reagiscono solo con *E. coli* O157:H7 e non con gli altri antigeni batterici (Tabella I).

Essi sono stati sottoposti ad ulteriori prove di cross-reattività verso sette ceppi di campo di *E. coli* O157:H7. I risultati sono riportati in Tabella II.

### Caratterizzazione anticorpi monoclonali

E' stato determinato l'isotipo dei sette anticorpi monoclonali che in ELISA indiretta sono risultati positivi solo per *E. coli* O157:H7 (Tabella III). Tra questi le successive prove di caratterizzazione in Western blotting sono state fatte sui 4 Mabs con isotipo IgG. Il Mab 8B8C3 in Immunoblotting reagisce con una sola banda di circa 37 kDa corrispondente ad una componente della catena polisaccaridica O (5). Tale banda non è presente nell'immonoblotting degli altri 3 Mabs testati, infatti il Mab 5D4G5B7 reagisce con 4 bande di peso molecolare diverso (73, 78, 115, 140 kDa), il Mab 13A12G9 si lega a due bande (73, 181 kDa)

Tabella I  
Reazioni crociate dei MAbs in ELISA-indiretta DO<sub>450</sub> con diversi antigeni batterici

Anticorpi monoclonali	8B8C3*	13A12G9	5D4G5B7	1D6C8	13E4B10	13E4D6	13A12F10
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC13076)	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Escherichia coli</i> 014 (BGVV)	0.06	0.01	0.01	0.00	0.05	0.02	0.05
<i>E. coli</i> JM109 (ceppo di campo)	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03
<i>E. coli</i> (ATCC25922)	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC23715)	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Klebsiella oxitoca</i> (ATCC49131)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC48132)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC12022)	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC19119)	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC7644)	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01
<i>L. innocua</i> (ATCC33090)	0.02	0.00	0.05	0.01	0.04	0.00	0.00
<i>Enterobacter cloacae</i> (ceppo di c.)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
<i>E. cloacae</i> (ceppo di campo)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>E. agglomerans</i> (ceppo di c.)	0.00	0.02	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01
<i>E. amnigenus</i> (ceppo di campo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Citrobacter freundii</i> (ceppo di c.)	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00
<i>Escherichia fergussoni</i> (ceppo di c.)	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ceppo di c.)	0.03	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Salmonella panama</i> (ceppo di c.)	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.04
<i>S. saintpaul</i> (ceppo di campo)	0.02	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. derby</i> (ceppo di campo)	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. derby</i> (ceppo di campo)	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00	0.02	0.00
<i>S. muenchen</i> (ceppo di campo)	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. bredeney</i> (ceppo di campo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
<i>S. hadar</i> (ceppo di campo)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01
<i>E. coli</i> O157:H7 ceppo ATCC35150	3.00	0.40	1.80	0.30	2.60	1.00	0.30

\* anticorpo monoclonale utilizzato per lo sviluppo dell'ELISA sandwich

Tabella II  
Reazioni crociate dei MAbs in ELISA-indiretta DO<sub>450</sub> vs vari *E. coli* O157:H7 di campo

Anticorpi monoclonali	E-D 393	E-D 412	E-D 506	E-D 390	E-D 268	E-D 416	E-D 521	<i>E. coli</i> O157:H7 ceppo ATCC 35150
8B8C3*	3.00	3.10	2.80	2.60	2.80	3.30	3.20	3.00
13A12G9	0.30	0.60	2.40	1.10	2.50	0.30	2.00	0.40
5D4G5B7	2.50	2.80	1.10	1.50	1.30	0.90	2.30	1.80
1D6C8	0.60	1.10	0.30	0.20	0.50	1.50	1.80	0.30
13E4B10	2.80	3.20	3.20	3.50	3.90	3.50	3.00	2.60
13E4D6	1.20	2.50	2.30	0.90	1.10	2.30	1.50	1.00
13A12F10	0.50	1.50	0.60	2.30	1.80	0.30	0.80	0.30

\*anticorpo monoclonale utilizzato per lo sviluppo dell'ELISA sandwich

mentre il Mab 1D6C8 si lega ad una banda (73 kDa) (Fig. 1).

### ELISA sandwich

Per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali testati, i risultati migliori sono stati ottenuti con il MAb 8B8C3. Infatti il MAb 13A12G9 non ha prodotto, anche a concentrazioni batteriche elevate, un segnale significativamente superiore al bianco; il MAb 1D6C8 ed il Mab 5D4G5B7 hanno prodotto una curva di calibrazione caratterizzata da un

Tabella III  
Isotipo anticorpi monoclonali

Anticorpo monoclonale	Isotipo
8B8C3	IgG1 anti k
13A12G9	IgG1 anti k
5D4G5B7	IgG1 anti k
1D6C8	IgG1 anti k
13E4B10	IgA anti k
13E4D6	IgA anti k
13A12F10	IgA anti k

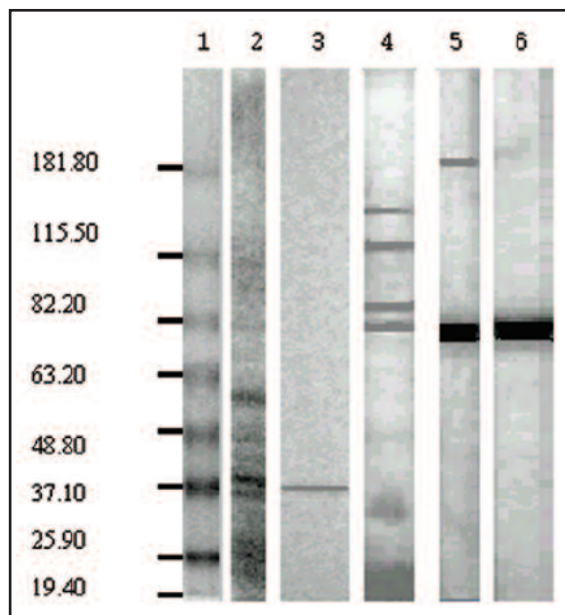


Figura 1  
Elettroforesi in SDS PAGE e Western blotting  
Mabs vs *E. coli* O157:H7

- 1 Markers
- 2 Elettroforesi SDS PAGE *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato
- 3 Western blotting Mab 8B8C3 vs *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato
- 4 Western blotting Mab 5D4G5B7 vs *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato
- 5 Western blotting Mab 13A12G9 vs *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato
- 6 Western blotting Mab 1D6C8 vs *E. coli* O157:H7 inattivato al calore e sonicato

segnale aspecifico molto alto, causando di conseguenza un significativo aumento del limite di rivelazione del metodo ed una riduzione dell'intervallo lineare della risposta.

L'ELISA sandwich è stata messa a punto utilizzando il MAb 8B8C3. Il limite di rivelazione del metodo (LOD) è stato calcolato interpolando sulla curva standard il valore medio di assorbanza/emissione del bianco più tre volte la sua deviazione standard. Il LOD calcolato è risultato pari a  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml sia per il metodo colorimetrico che chemiluminescente. L'intervallo della curva di taratura è compreso tra  $1.8 \times 10^6$  e  $8 \times 10^7$  cfu/ml. Il metodo è altamente specifico rispetto alle altre specie batteriche testate ed al ceppo di *E. coli* JM109, che non hanno prodotto un segnale significativamente superiore al bianco anche quando testate ad alte concentrazioni ( $1 \times 10^{10}$  cfu/ml).

## Discussione

La normativa comunitaria, recepita in ambito nazionale, inerente il controllo igienico sanitario degli alimenti, ha introdotto una serie di indicazioni che hanno come obiettivo la produzione di alimenti con elevate caratteristiche igienico sanitarie che rimangano invariate nel tempo. Allo stato attuale c'è un enorme bisogno di metodi che riescano in breve tempo ad evidenziare la presenza negli alimenti di microrganismi potenzialmente patogeni, oltre che di residui di sostanze indesiderate, fra i primi, di importanza primaria la presenza di *E. coli* O157:H7, da discriminare anche nei confronti di altri *E. coli* non-O157:H7. I vantaggi di tale approccio sono numerosi in quanto eventuali metodi immunoenzimatici, sviluppati secondo criteri di qualità, permettono l'analisi di molti campioni in tempi molto brevi; di conseguenza possono essere utilizzati per screening rapidi di alimenti potenzialmente contaminati da batteri con una

notevole riduzione dei costi, oltretutto per i controlli di filiera previsti dalle attuali normative comunitarie, come l'HACCP (hazard analysis and critical control point). Altri potenziali vantaggi sono una maggiore specificità e un ampio ambito dinamico.

A tale scopo è stato messo a punto un metodo immunoenzimatico in formato "sandwich" altamente specifico per soddisfare tali richieste.

Nella messa a punto di tali metodiche ricopre un ruolo primario la disponibilità di reagenti che rispondano a caratteristiche di laboratorio tali da poter essere utilizzati con successo nell'allestimento delle metodiche e fra essi, la disponibilità di anticorpi monoclonali specifici per determinati antigeni. Il MAb 8B8C3 possiede tali caratteristiche, esso, infatti, non reagisce, sia in ELISA indiretta che in ELISA sandwich, con gli altri batteri testati e soprattutto non riconosce altri *E. coli* non-O157. Per quanto riguarda la sensibilità del metodo il valore di  $1.8 \times 10^6$  cfu/ml è paragonabile a quello di altri metodi attualmente sul mercato. Il sistema di rivelazione chemiluminescente, in questo caso, non consente di ottenere un LOD più basso rispetto a quello colorimetrico ma risulta comunque più vantaggioso in quanto permette una lettura immediata del segnale dopo l'aggiunta del substrato e quindi consente di ridurre i tempi di analisi. L'ELISA sandwich combinata con l'arricchimento in brodo coltura può essere usato quale metodo alternativo per la rivelazione di *E. coli* O157:H7 negli alimenti. La procedura è facile da eseguire, meno costosa e più rapida se confrontata con i metodi microbiologici tradizionali che prevedono l'isolamento e la successiva tipizzazione dei ceppi batterici. L'indagine diagnostica di *E. coli* O157 negli alimenti è condotta secondo l'ISO/DIS 16654 che prevede un prearricchimento, una successiva concentrazione mediante immunoseparazione magnetica e l'isolamento su terreno selettivo CT-SMAC (16). La conferma viene effettuata mediante test biochimici ed immunologici (12). Altre procedure di rivelazione di antigeni o acidi nucleici come



immunoblotting, PCR dei geni di virulenza o sonde di acidi nucleici richiedono costi elevati per l'esecuzione e sono a differenza dell'ELISA sandwich meno adatte per lo screening di un elevato numero di campioni.

## Finanziamento

La ricerca è stata effettuata nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero della Salute Italiano, Progetto di Ricerca Finalizzata 2000 "Determinazione simultanea di patogeni in alimenti con metodi immunometrici luminescenti", codice progetto MSRFTE 0800.

## Bibliografia

1. Borczyk A., Lior H. & Ciebin B. 1987. False-positive identifications of *Escherichia coli* O157 in foods. *Int J Food Microbiol*, **4**, 347-349.
2. Campbell A.M. 1987. Monoclonal antibody technology. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, 13 (R.H. Burdon & P.H. van Knippenberg, eds). Elsevier Science, Amsterdam.
3. Conedera G., Chapman P.A., Marangon S., Tisato E., Dalvit P. & Zuin A. 2001. A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy. *Int J Food Microbiol*, **66**, 85-93.
4. Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottaviani D., Paterlini F., Pezzotti G., Pisanu M., Semprini P. & Caprioli A. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol*, **96**, 67-73.
5. Currie C.G. & Poxton I. 1999. The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **24**, 57-62.
6. Galfre G. & Milstein C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth Enzymol*, **73** (Pt B), 3-46.
7. Goding J.W. 1993. Monoclonal antibodies: principles and practice. Production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology, Third Ed. Academic Press Limited, London, 171-177.
8. Griffin P.M. & Tauxe R.V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*, **13**, 60-98.
9. Harlow E. & Lane D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 92-119, 309-318, 553-612.
10. He Y., Keen J.E., Westerman R., Littledike E.T. & Kwang J. 1996. Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 3325-3332.
11. Johnson R.P., Durham R.J., Johnson S.T., MacDonald L.A., Jeffrey S.R. & Butman B.T. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 386-388.
12. Karmali M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, **2**, 15-38.
13. Kerr P., Chart H., Finlay D., Pollock D.A., Mackie D.P. & Ball H.J. 2001. Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains. *J Appl Microbiol*, **90**, 543-549.
14. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T. *Nature (London)*, **227**, 680-685.

15. Lior H. & Borczyk A.A. 1987. False positive identifications of *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, **1**, 333.
16. Liu Y. & Li Y. 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. *J Microbiol Meth*, **51**, 369-377.
17. Malavasi F. & Bargellesi-Sevesi A. 1992. Anticorpi monoclonali tecniche di base Ph.D. 02. In I manuali delle scuole, Scuola superiore di oncologia e scienze biomediche. Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica Medica Università degli Studi di Torino, Istituto di Chimica Biologica Università degli Studi di Genova, Genova.
18. Morgan-Capner P.H., Pullen J.R., Pattison D.E., Bidwell A., Bartlett B. & Voller A. 1979. A comparison of three tests for rubella antibody screening. *J Clin Pathol*, **32** (6), 542-545.
19. Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, **22**, 1084-1091.
20. Padhye N.V. & Doyle M.P. 1992. *E. coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Prot*, **55**, 555-565.
21. Riley L.W., Remis R.S. & Helgerson S.D. 1983. Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med*, **308**, 681-685.
22. Shelton D.R., Van Kessel J.A.S., Wachtel M.R., Belt K.T. & Karns J. 2003. Evaluation of parameters affecting quantitative detection of *Escherichia coli* O157 in enriched water samples using immunomagnetic electrochemiluminescence. *J Microbiol Meth*, **55**, 717-725.
23. Towbin H., Staehelin T. & Gordon S. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354.