

**IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI *Trichinella* spp. RICONOSCIUTE
DALLE IgG SPECIFICHE PRESENTI NEL SIERO DI SUINI INFETTI MEDIANTE
WESTERN BLOTTING**

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	3
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	3
6	REATTIVI E MATERIALI	4
7	PROCEDIMENTO	5
7.1	Preparazione del campione di corsa e del marcatore	5
7.2	Procedura di caricamento del gel	6
7.3	Procedura di trasferimento	6
7.4	Procedura di verifica dell'efficacia del trasferimento	7
7.5	Procedura di bloccaggio	7
7.6	Preparazione del campione di prova e dei campioni di controllo	7
7.7	Esecuzione della prova	7
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	8
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	9
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	9

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo immunoenzimatico, western blotting, per la rivelazione qualitativa di anticorpi anti-*Trichinella* spp. nel siero di suini.

Il metodo può essere utilizzato come test di conferma sierologica nelle indagini epidemiologiche sui contatti suino-*Trichinella* spp.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Gli antigeni di secrezione/escresione di *Trichinella spiralis* parzialmente purificati vengono separati elettroforeticamente in un gel di poliacrilamide in presenza di dodecil solfato sodico. Successivamente, gli antigeni già separati vengono trasferiti su di una membrana di nitrocellulosa che viene tagliata in strisce. Una volta tagliate, le strisce di nitrocellulosa vengono trattate con un agente bloccante per saturare tutti i siti liberi dell'antigene.

Le strisce di nitrocellulosa vengono distribuite singolarmente in vaschette di plastica e messe a contatto con i sieri diluiti dei controlli e dei campioni, per consentire agli anticorpi anti-*Trichinella* spp., eventualmente presenti nei sieri, di legarsi all'antigene adsorbito sulla membrana di nitrocellulosa.

L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante lavaggio, e successivamente le strisce di nitrocellulosa vengono messe a contatto con anticorpi di coniglio anti-IgG di suino coniugati con una perossidasi.

Una seconda incubazione consente al coniugato di legarsi agli anticorpi del suino eventualmente legati all'antigene adeso alla nitrocellulosa.

L'eccesso di coniugato viene allontanato mediante lavaggio e l'attività dell'enzima, legato agli anticorpi del suino, viene rilevata aggiungendo un substrato cromogeno che consente la visualizzazione di un pattern di bande colorate corrispondente alle proteine che hanno reagito specificamente con anticorpi IgG anti-*Trichinella* spp., presenti nel siero di suino (figura 1).

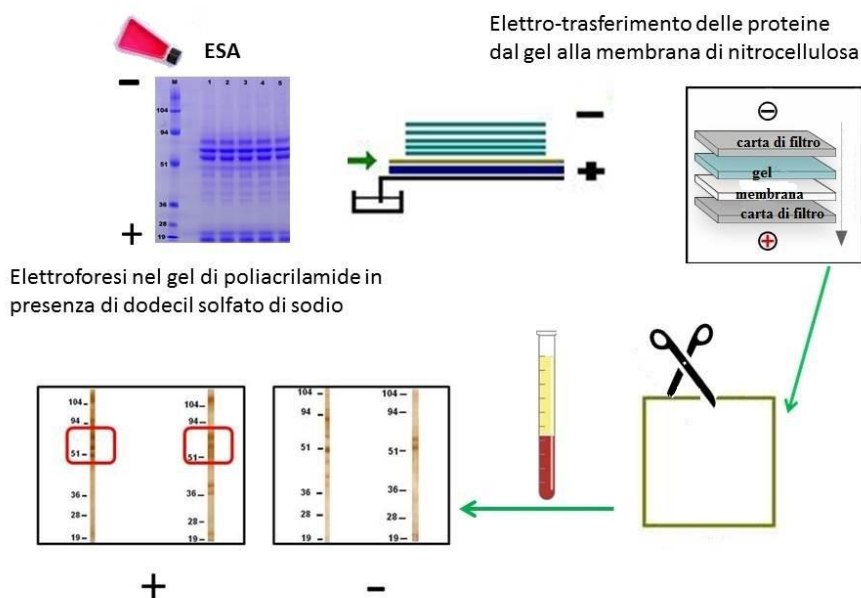


Figura 1. Rappresentazione schematica del metodo

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

Colton, 1988. Statistica in Medicina, Piccini editori

Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD. 1983. Diagnosis of swine trichinellosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet. Parasitol.* 13:349-361.

Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel CM, Gajadhar AA. 2004. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite* 11:3-13.

Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Blaga R, Zivojinovic M, Ribicich M, Pozio E. 2012. A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pig. *Int. J. Parasitol.* 42:1017-23.

Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Bandino E, Capelli G, Corrias F, Gelmini L, Nardi A, Sacchi C, Cherchi S, Lalle M, Pozio E. 2014. Indirect versus direct detection methods of *Trichinella* spp. infection in wild boar (*Sus scrofa*). *Parasit. Vectors*;7:17.

Nöckler K, Pozio E, Voigt WP, Heidrich J. 2000. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.* 93:335-350.

4 DEFINIZIONI

4.1 Acronimi

Ag	Antigene
Ab	Anticorpo
Ag E/S	Antigene di escrezione/secrezione
BSA	Albumina serica bovina
Wb	Western blotting

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

- 5.1 Alimentatori di corrente
- 5.2 Thermomixer
- 5.3 pH-metro, scostamento massimo risoluzione $\pm 0,3$ pH
- 5.4 Bilancia analitica oppure bilancia tecnica
- 5.5 Frigorifero, $1\div 8^{\circ}\text{C}$
- 5.6 Congelatore, $\leq - 50^{\circ}\text{C}$
- 5.7 Congelatore, $\leq -15^{\circ}\text{C}$
- 5.8 Agitatore magnetico
- 5.9 Agitatore Vortex
- 5.10 Micropipette (0.5-10 μL , 5-100 μL , 15-300 μL , 50-1000 μL)
- 5.11 Sistema di filtrazione dell'acqua di grado analitico; se mancante, si provvederà all'utilizzo dell'acqua di grado analitico
- 5.12 Vaschetta X Cell SureLock Mini-cell per elettroforesi verticale
- 5.13 Mini Trans-Blot Module Biorad
- 5.14 Bisturi
- 5.15 Pipettatrice
- 5.16 Pipette sierologiche

6 REATTIVI E MATERIALI

Elettroforesi

- 6.1 Preparazione del campione di corsa:
Ag E/S

100 μg

NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	50 µL
NuPAGE Reducing Agent(10X)	20 µL
Acqua di grado analitico	fino a 200 µL

Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione.

6.2 Gel, per corsa elettroforetica:

NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Mini Gels 1.0mm X2D well Invitrogen

6.3 Marcatori di peso molecolare precolorati:

Prestained SDS-PAGE Standards Low range Biorad 10 µL

6.4 Antiossidante: NuPAGE 500 µL

6.5 Tampone di corsa:

Mops SDS Running Buffer (20X) 50 mL

Acqua di grado analitico fino a 1000 mL

Validità: 1 mese

6.6 Tampone di trasferimento:

Tris-Glycine (25X) 40 mL

Metanolo 200 mL

Acqua di grado analitico fino a 1000 mL

Validità: 1 mese

6.7 Membrana in nitrocellulosa 0,2 µm

6.8 Soluzione Ponceau S 20 mL

6.9 Mini-Incubation Trays

Western blotting

6.10 Tampone TBS

Tris 0,2 M 2,4 g

NaCl 3 M 17,5 g

Acqua di grado analitico fino a 2000 mL

Validità: 6 mesi

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 1000 mL di acqua di grado analitico. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione. Controllare il pH (5.3) che deve essere di $7,8 \pm 0,2$ e portare a volume.

Conservare a $1 \div 8^{\circ}\text{C}$. Stabilità: 6 mesi.

6.11 Tampone TTBS

Tween 20 1 mL

Tampone TBS fino a 2000 mL

6.12 Soluzione di diluizione per sieri e coniugato

Latte scremato in polvere 1,5 gr

Tampone TTBS (pH 7,4) fino a 50 mL

La soluzione è da preparare al momento dell'uso come di seguito riportato:
pesare (5.4) 1,5 g di latte scremato in polvere direttamente in una provetta da 50mL,
aggiungere circa 40 mL di tampone TTBS (6.11),
agitare su vortex (5.9) fino al completo scioglimento della soluzione portare a volume con tampone TTBS (6.11).

Se Conservata in frigorifero (5.5) alla temperatura di $1 \div 8^{\circ}\text{C}$ può essere utilizzata entro 24 ore.

6.13 Soluzione di lavaggio:

Tampone TTBS (6.11) 2000 mL

6.14 Soluzione di bloccaggio

Latte scremato in polvere 2,5 g

Tampone TTBS (6.11)

50 mL

La soluzione è da preparare al momento dell'uso come di seguito riportato:
pesare (5.4) 2,5 g di latte direttamente in una provetta da 50mL,
aggiungere circa 40 mL di tampone TTBS (6.11),
agitare su vortex (5.9) e portare a volume con tampone TTBS (6.11).

Se conservata in frigorifero (5.5) alla temperatura di $1\div 8^{\circ}\text{C}$ può essere utilizzata entro 24 ore.

6.15 Tampone fosfato (PBS), pH $7,3 \pm 0,2$

KH_2PO_4	0,34 g
Na_2HPO_4	1,21 g
NaCl	8,0 g
Acqua di grado analitico	fino 1000 mL

Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 750 mL di acqua di grado analitico.

Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione.

Controllare il pH (5.3) che deve essere di 7.3 ± 0.2 e portare a volume.

Stabilità: 6 mesi.

6.16 Sieri di suino positivi per anticorpi anti-*Trichinella* spp. (controlli positivi).

Sieri prelevati al 60° giorno da suini infettati sperimentalmente con larve di *Trichinella* spp.

6.17 Sieri negativi per anticorpi anti-*Trichinella* spp. (controlli negativi).**6.18 Cromogeno DAB (3, 3'diaminobenzidina).**

Dissolvere una pasticca di cromogeno in 15 mL di PBS (6.15). Miscelare sul vortex (5.9) fino al suo completo scioglimento.

6.19 Perossido d'idrogeno12 μL

Aggiungere al cromogeno (6.18) immediatamente prima dell'uso.

6.20 Coniugato.

Anticorpi di coniglio anti-IgG di suino coniugati con horseradish peroxidase (perossidasi di rafano).

Prima dell'utilizzo il materiale, liofilizzato, deve essere reidratato con acqua di grado analitico agitando su vortex (5.9) fino alla sua completa dissoluzione. Una volta reidratato, il coniugato può essere conservato refrigerato (5.5) a $1\div 8^{\circ}\text{C}$ per una settimana.

Per determinare la diluizione ottimale di lavoro del coniugato (cioè quella in cui vengono visualizzate le bande specifiche nei controlli positivi mantenendo la minima colorazione di fondo), si utilizzano le diluizioni di lavoro raccomandate dal fornitore per l'utilizzo in Wb. Se nessuna delle suddette diluizioni risulta ottimale, si procede alla preparazione di ulteriori diluizioni del reagente fino ad individuare quella ottimale).

Il coniugato deve essere aliquotato e conservato congelato (5.6) a $\leq -50^{\circ}\text{C}$. In queste condizioni resta stabile per almeno 5 anni. Dopo la data di scadenza la sua idoneità verrà verificata attraverso la reattività dei sieri di controllo positivi e negativi nelle sedute analitiche nelle quali è utilizzato. Prima della sessione di prova, un'aliquota di coniugato deve essere diluita alla concentrazione ottimale con la soluzione di diluizione (6.11). Una volta diluito, conservare il coniugato refrigerato (5.5) a $1\div 8^{\circ}\text{C}$ ed utilizzarlo entro 24 ore.

7 PROCEDIMENTO**7.1 Preparazione del campione di corsa e del marcatore**

Utilizzare un'aliquota da 100 μg di Ag E/S, preparare il campione di corsa (6.1). Mescolare mediante agitatore magnetico (5.8) fino a completa dissoluzione. Incubare la provetta 10 minuti a 70°C nel Thermomixer (5.2)

Prelevare un'aliquota di marcatori di peso molecolare (6.3) contenente 10 μL ed incubarla 1 minuto a 40°C nel Thermomixer (5.2).

7.2 Procedura di caricamento del gel

Disporre il/i gel (6.2) nell'apposita vaschetta (5.12) per elettroforesi verticale (figura 2).

Versare il tampone di corsa (6.5) fino a riempire metà vaschetta (circa 500 mL).

Aggiungere nella parte centrale della vaschetta 200ml di tampone di corsa e 500 µL di antiossidante (6.4).

Caricare le proteine nel gel mediante micropipetta (5.10), collegare la vaschetta da elettroforesi all'alimentatore (5.1) e lasciar separare le proteine applicando 150 V per circa 1h a temperatura ambiente.

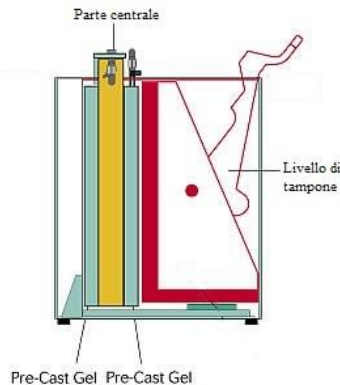


Figura 2. Rappresentazione della cassetta per elettroforesi verticale.

7.3 Procedura di trasferimento

A fine corsa adagiare il gel contenente le proteine su una membrana di nitrocellulosa (6.7), secondo lo schema del Mini Trans-Blot Module Biorad (5.13) riportato nella figura 3.

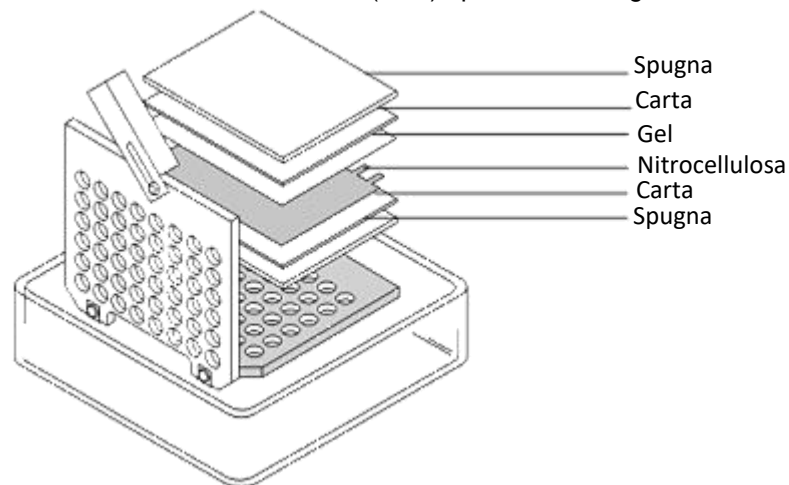


Figura 3. Schema di trasferimento delle proteina da gel alla membrana di nitrocellulosa.

Porre il sistema così assemblato nell'apposita cassetta (figura 4) con tampone di trasferimento (6.6) e blocco di ghiaccio, collegare l'alimentatore (5.1) per 1 h a +4°C con una tensione di 38 mA, in modo tale da far migrare le proteine dal gel, posizionato nel polo negativo, alla nitrocellulosa, posizionata nel polo positivo.

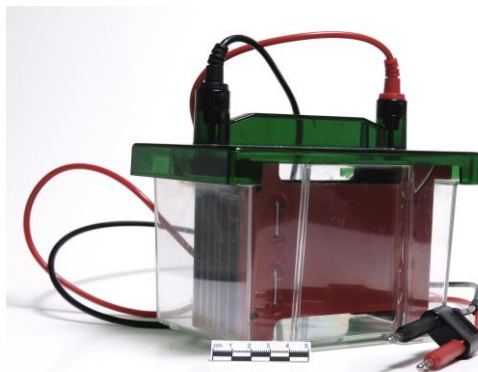


Figura 4. Cassetta utilizzata per il trasferimento delle proteine.

7.4 Procedura di verifica dell'efficacia del trasferimento

Alla fine del trasferimento aprire la cassetta, prelevare la nitrocellulosa e porla in una vaschetta con colorante (6.8) per verificare l'avvenuto trasferimento. Lavare con acqua di fonte per eliminare il colorante in eccesso e tagliare il filtro, mediante bisturi (5.14), in circa 20 strisce di circa 5 mm.

7.5 Procedura di bloccaggio

Bloccare le strisce con soluzione di bloccaggio (6.14) per tutta la notte a +4°C.

Il giorno seguente lavare le strisce con il tampone TTBS (6.11). Le strisce vengono messe ad asciugare e, così preparate, possono essere conservate a temperatura ambiente fino a due mesi avvolte in carta da filtro.

7.6 Preparazione del campione di prova e dei campioni di controllo

Scongelare i sieri "campione di prova", il siero di controllo negativo e il siero di controllo positivo collocandoli in frigorifero (5.5) a 1÷8°C per almeno 5 ore. Una volta scongelati possono essere conservati in ghiaccio sul banco di lavoro. Prima dell'utilizzo, agitarli mediante vortex (5.9).

Diluire 1:100 il/i campione/i di prova, il siero di controllo negativo e il siero di controllo positivo come segue: in una provetta a fondo conico da 1-2 mL dispensare 1 mL di soluzione di diluizione (6.12) tramite pipetta sierologica (5.16) posta sulla pipettatrice automatica (5.15) ed eliminare 10 µL della soluzione tramite micropipetta (5.10), alternativamente dispensare 990 µL di soluzione di diluizione (6.12) con una micropipetta (5.10), aggiungere 10 µL di siero. Conservare quindi in frigorifero (5.5) a 1÷8°C fino al momento dell'uso. Stabilità: 1 giorno.

7.7 Esecuzione della prova

- Prelevare dal frigorifero i campioni di siero.
- Disporre le strisce di nitrocellulosa nelle apposite Mini-IncubationTrays (6.9) ed effettuare un lavaggio con TTBS (6.11) per 5' a temperatura ambiente.
- Incubare i sieri di controllo ed i sieri da esaminare per 1h a temperatura ambiente.
- Lavare per 3 volte per 5' a temperatura ambiente con soluzione TTBS (6.11).
- Incubare il coniugato diluito (6.20) 1h a temperatura ambiente.
- Lavare per 3 volte per 5' a temperatura ambiente con soluzione TTBS (6.11).
- Lavare una volta per 5' a temperatura ambiente con soluzione TBS (6.10)
- Aggiungere il cromogeno (6.18) e il perossido d'idrogeno (6.19) fino alla visualizzazione delle bande.
- Bloccare la reazione con acqua di fonte.

8 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La separazione elettroforetica delle proteine di *T. spiralis* e il loro successivo trasferimento sulla membrana di nitrocellulosa sono considerati validi quando tutti i marcatori (o standards) di peso molecolare (PM) colorati, utilizzati in ogni gel, sono stati:

- separati elettroforeticamente,
- trasferiti sulla membrana di nitrocellulosa.

Inoltre la mobilità relativa di ogni standard deve rimanere nell'intervallo previamente stabilito

mediante tre esperimenti indipendenti. Per gli standard di proteine di 104, 94, 51, 36, 28 e 19 kDa, le relative mobilità sono: 0.13, 0.24, 0.41, 0.66, 0.80, 0.91, rispettivamente (S.D. $\leq \pm 0.2$; Figura 5); per il controllo positivo le relative mobilità sono state precedentemente pubblicate (Gomez Morales et al., 2014, con S.D. ± 0.2).

Se anche una sola mobilità relativa non rientra nei valori specificati, i risultati non devono essere considerati validi e la prova deve essere ripetuta.

Per identificare le proteine specifiche dell'Ag E/S di *T. spiralis* che reagiscono con i sieri di riferimento e i sieri di prova dei suini, si procede al calcolo del loro peso molecolare (PM) come segue (figura 5):

1. in un foglio elettronico di Microsoft Word Excel tracciare un grafico del log dei PM degli standard pre-colorati verso la loro distanza di migrazione relativa (Rf); dovrà essere calcolato il coefficiente di correlazione (r^2), che avrà come limite superiore 1 e come limite inferiore 0,75, sulla base di quanto pubblicato in letteratura (Colton, 1988. Statistica in Medicina, Piccini editori),
2. interpolare la Rf delle proteine specifiche dell'Ag E/S di *T. spiralis* che reagiscono con i sieri di suino, sia di riferimento che di prova, per calcolare i loro pesi molecolari,
3. le proteine specifiche che reagiscono con i sieri di suino, sia di riferimento che di prova, devono mostrare un pattern a tripla banda in una regione compresa tra i 48 e i 72 kDa (la prima banda da 48 kDa a 55 kDa, la seconda banda da 59 kDa a 62 kDa e terza banda da 64 a 72 kDa).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	MW (kD) of the prestained molecular marker proteins	Migration distance (cm) of the prestained molecular marker proteins			Rf prestained molecular marker proteins			Rf Mean	Log MW
2		experiment 1	experiment 2	experiment 3	experiment 1	experiment 2	experiment 3	x	y
3	104	0,6	0,9	0,7	=PRODUCT(B3;1/B10)	=PRODUCT(C3;1/C10)	=PRODUCT(D3;1/D10)	=MEAN(E3;G3)	=LOG10(A3)
4	94	1,2	1,5	1,3	=PRODUCT(B4;1/B10)	=PRODUCT(C4;1/C10)	=PRODUCT(D4;1/D10)	=MEAN(E4;G4)	=LOG10(A4)
5	51	2,2	2,5	2,3	=PRODUCT(B5;1/B10)	=PRODUCT(C5;1/C10)	=PRODUCT(D5;1/D10)	=MEAN(E5;G5)	=LOG10(A5)
6	36	3,6	3,8	3,7	=PRODUCT(B6;1/B10)	=PRODUCT(C6;1/C10)	=PRODUCT(D6;1/D10)	=MEAN(E6;G6)	=LOG10(A6)
7	28	4,4	4,7	4,5	=PRODUCT(B7;1/B10)	=PRODUCT(C7;1/C10)	=PRODUCT(D7;1/D10)	=MEAN(E7;G7)	=LOG10(A7)
8	19	5	5,2	5,1	=PRODUCT(B8;1/B10)	=PRODUCT(C8;1/C10)	=PRODUCT(D8;1/D10)	=MEAN(E8;G8)	=LOG10(A8)
9									
10		5,5	5,8	5,6					
11	Migration distance of the front								
12									
13		Migration distance of the unknown proteins			Rf unknown proteins			Rf Mean	Log MW
14									
15		1,8	2,1	1,9	=PRODUCT(B15;1/B10)	=PRODUCT(C15;1/C10)	=PRODUCT(D15;1/D10)	=MEAN(E15;G15)	=TREND(I3:I8;H3:H8;H15;TRUE)
16		2,2	2,4	2,3	=PRODUCT(B16;1/B10)	=PRODUCT(C16;1/C10)	=PRODUCT(D16;1/D10)	=MEAN(E16;G16)	=TREND(I3:I8;H3:H8;H16;TRUE)
17		2,5	2,8	2,6	=PRODUCT(B17;1/B10)	=PRODUCT(C17;1/C10)	=PRODUCT(D17;1/D10)	=MEAN(E17;G17)	=TREND(I3:I8;H3:H8;H17;TRUE)
18									
19									=POWER(10;I15)
20									=POWER(10;I16)
21									=POWER(10;I17)
22									

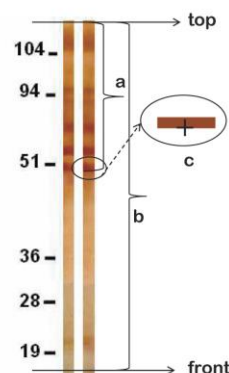
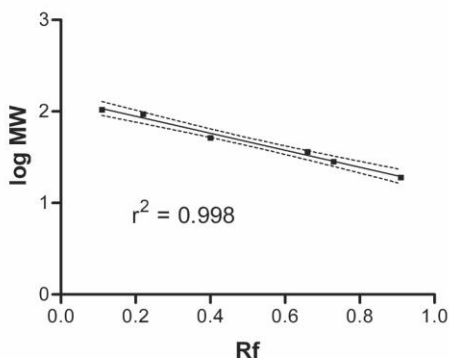


Figura 5. La tabella in alto mostra i risultati degli esperimenti effettuati per determinare la mobilità relativa di ciascun marcatore di peso molecolare. Il grafico di sinistra mostra la retta di regressione

della distanza relativa dei sieri di riferimento in funzione del loro peso molecolare. Il grafico di destra mostra il pattern delle proteine specifiche dell'Ag E/S di *T. spiralis* che reagiscono con i sieri di suino in Wb.

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

Poiché si manipolano sieri, potenzialmente infetti da patogeni zoonotici, gli operatori che manipolano tali sieri dovranno essere dotati di dispositivi individuali di protezione come guanti monouso e camici.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal *Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro* dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito <http://intranet.iss.it/prev/index.php?lang=1&anno=2020&tipo=13> (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).