



# **Implementering och verifiering av kvantitativ ELISA för analys av *Staphylococcus aureus* enterotoxin A och C**

## **Implementation and verification of quantitative ELISA for analysis of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and C**

**Maria Karlsson**

---

Uppsala BioCenter  
Institutionen för mikrobiologi  
Fakulteten för naturresurser och  
lantbruksvetenskap  
Sveriges lantbruksuniversitet

**Självständigt arbete 2010:5**

Uppsala

ISSN 1101-8151  
ISRN SLU-MIKRO-EX-10/5-SE

---





# **Implementering och verifiering av kvantitativ ELISA för analys av *Staphylococcus aureus* enterotoxin A och C**

## **Implementation and verification of quantitative ELISA for analysis of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and C**

**Maria Karlsson**

**Handledare: Åsa Rosengren, Livsmedelsverket; SLU, institutionen för mikrobiologi**

**Btr handledare: Roland Lindqvist, Livsmedelsverket; SLU, institutionen för mikrobiologi**

**Examinator: Bengt Guss, SLU institutionen för mikrobiologi**

***Nyckelord: Staphylococcus aureus, matförgiftning, enterotoxin, SEA, SEC, ELISA, BHI, mjölk***

***EX0426 Självtändigt arbete i livsmedelsvetenskap – kandidatarbete***

***15 poäng inom agronomprogrammet livsmedel, nivå grund C, G2E***

---

**Uppsala BioCenter  
Institutionen för mikrobiologi  
Fakulteten för naturresurser och  
lantbruksvetenskap  
Sveriges lantbruksuniversitet**

**Självtändigt arbete 2010:5**

**Uppsala**

**ISSN 1101-8151**

**ISRN SLU-MIKRO-EX-10/5-SE**

---



## Sammanfattning

Varje år uppskattas en halv miljon svenskar drabbas av matförgiftning och knappt en tredjedel rapporteras ha drabbats av en matförgiftning orsakad av bakterier eller bakteriella toxiner. Under år 2007 drabbades drygt 2500 EU-medborgare av matförgiftning orsakade av stafylokockenterotoxiner (SEs). I livsmedel har man sett att produktion av SEs framförallt är kopplat till *Staphylococcus aureus*. Studier har visat att SEA följt av övriga klassiska SEs är de toxin som oftast orsakar matförgiftningar.

Detta kandidatarbete har haft som mål att sätta upp en ELISA för kvantitativ bestämning av stafylokockenterotoxin A och C i BHI-buljong (brain heart infusion) och pastöriserad mjölk med fetthalt 1,5 %. Ytterligare mål var att fastställa nedre gränsen för att kvantitativt bestämma enterotoxininnehållet med använd ELISA. Detta för att kunna jämföra enterotoxinproduktionen hos *S. aureus* under olika odlingsbetingelser relevanta för livsmedel.

I denna studie valde vi att använda en ELISA som baseras på en metod för kvantifiering av SEA och SED som utarbetats av Schelin och Rådström vid Lunds Tekniska Högskola. Metoden har dock inte tidigare testats med avseende på SEC.

Analysprincipen för ELISA:n var att SEs band till specifika antikroppar som bundits till brunnarna på en mikrotiterplatta. Därefter tillsattes biotinylerade antikroppar, NeutrAvidin-kopplat alkaliskt fosfat och *p*-nitrofenylfosfat vilket resulterade i att de brunnar som innehöll SE fick ett färgomslag. Intensiteten i färgen var proportionell mot mängden SE. En linjär standardkurva upprättades med hjälp av en rad prover med kända SE-koncentrationer. Toxinnivåerna i de okända proverna beräknades sedan utifrån standardkurvan. Nedre kvantifieringsgräns bestämdes till 0,313 ng/ml för SEA och 0,156 ng/ml för SEC.

Resultaten visar att använda stammar, odlade över natt vid 37 °C, producerar SEA i såväl BHI-buljong som pastöriserad mjölk, men att nivåerna är lägre i mjölk. Även produktion av SEC sker i BHI-buljong medan endast mycket begränsade mängder bildas i mjölk. Resultaten tyder på att odlingsmediet, antalet inokulerade bakterier och genetiska faktorer har betydelse för toxinbildningen.

**Nyckelord:** *Staphylococcus aureus*, matförgiftning, enterotoxin, SEA, SEC, ELISA, BHI, mjölk.



## Abstract

In Sweden, half a million people get food poisoned every year and almost one third due to bacteria or bacterial toxins. During 2007, more than 2500 EU-citizens were reported food poisoned by staphylococcal enterotoxins (SEs). In foods, SEs are primarily connected with *Staphylococcus aureus*. Research has shown that SEA followed by the other classical SEs are the most frequent toxins to cause food poisoning.

The purpose of this work was to implement and determine the level of quantification of an ELISA for quantification of staphylococcal enterotoxins A and C in BHI (brain heart infusion) broth and pasteurized milk with 1,5 % fat content. This to compare *S. aureus* enterotoxin production under different growth conditions relevant to foods.

In this study, we use an ELISA for quantification of SEA and SED elaborated by Schelin and Rådström at the University of Lund, Sweden. However, the method had not been tested on SEC before.

Analytical principle of the ELISA was that SEs bound to antibodies adhered to wells in microtiter plates. Thereafter, biotinylated antibodies, NeutrAvidin conjugated alkaline phosphatase and *p*-nitrophenyl phosphate were added and resulted in a change of colour in wells containing SEs. The intensity of the colour was proportional to the amount of SEs. A linear standard curve was made out of a series of samples with known SE concentrations. The toxin concentrations in the unknown samples could be derived from the standard curve. The lowest quantification limits were set to 0,313 ng/mL for SEA and 0,156 ng/mL for SEC.

Results show that tested strains, cultured over night at 37 °C, produces SEA in BHI broth and pasteurized milk. However, toxin levels were lower in milk. SEC is produced in BHI broth, but only in small amounts in milk. The results indicate that growth media, the number of inoculated bacteria and genetical factors are important for SE production.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, food poisoning, enterotoxin, SEA, SEC, ELISA, BHI, milk.





# Innehållsförteckning

1. Inledning.....	9
1.1 Syfte .....	9
1.2 Matförgiftningar i Sverige och Europa orsakade av stafylokocker.....	9
1.3 Stafylokocker .....	10
1.4 Stafylokockenterotoxin .....	10
1.5 Detektionsmetoder för stafylokockenterotoxiner.....	11
1.6 Varför kvantifiera toxininnehållet i livsmedel .....	11
2. Material och metoder .....	13
2.1 Bakteriestammar.....	13
2.2 ELISA.....	13
3. Resultat.....	17
3.1 Bakteriestammar.....	17
3.2 ELISA.....	17
4. Diskussion .....	20
4.1 Bakteriestammar.....	20
4.2 ELISA.....	20
4.3 Fortsatta studier .....	22
5. Slutsatser .....	23
6. Tack.....	23
7. Referenslista .....	24
8. Bilagor.....	26
8.1 Bilaga 1 – Detaljerat utförande .....	26
8.2 Bilaga 2 – Buffertar, reagenser och utrustning .....	32



# 1. Inledning

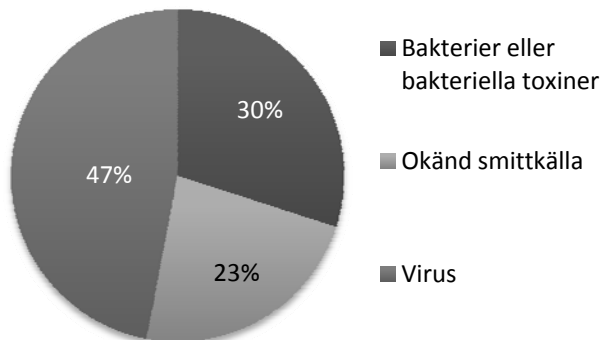
## 1.1 Syfte

Syftet med detta kandidatarbete var att sätta upp en ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) för kvantitativ bestämning av stafylokockenterotoxin A och C i BHI-buljong (brain heart infusion) och pastöriserad mjölk med fetthalt 1,5 %. Ytterligare syfte var att fastställa nedre gränsen för att kvantitativt bestämma enterotoxininnehållet med använd ELISA. Detta för att kunna jämföra enterotoxinproduktionen hos *Staphylococcus aureus* under olika odlingsbetingelser relevanta för livsmedel.

## 1.2 Matförgiftningar i Sverige och Europa orsakade av stafylokocker

Matförgiftning orsakad av stafylokocker kännetecknas av illamående, kräkningar och diarré, men leder mycket sällan till dödsfall (EFSA, 2009). Inkubationstiden är kort och symptomen uppkommer vanligtvis inom 1-6 timmar efter intag av kontaminerat livsmedel (Balaban & Rasooly, 2000). Symptomen går över av sig själv och ingen särskild behandling brukar behövas för tillfrisknande (Harvey & Gilmour, 1999). Hur kraftiga symptomen blir beror på mängden stafylokockenterotoxin (SE) som intas och individens känslighet (Evenson et al., 1988). Försök på apor har visat att efter upprepade intag utvecklades en viss resistens mot toxinet (Bergdoll et al., 1959) och det är troligt att något liknade kan ske hos människor.

Varje år uppskattas att en halv miljon svenskar drabbas av matförgiftning (Livsmedelsverket, 2010). Knappt en tredjedel (30 %) av de drabbade har fått en matförgiftning orsakad av bakterier eller bakteriella toxiner. En fjärdedel (23 %) av de insjuknade hade en okänd smittkälla och knappt hälften hade drabbats av virus (figur 1). I de fall där smittkällan var känd, kom stafylokocker på femte plats när det gällde att orsaka flest matförgiftningar. År 2003 till 2007 finns 44 dokumenterade fall där personer har blivit matförgiftade på grund av att ha fått i sig SEs (Livsmedelsverket, 2009). Under år 2007 rapporterades drygt 2500 EU-medborgare ha ådragit sig en matförgiftning orsakade av stafylokockenterotoxiner, fördelade på 258 utbrott. Majoriteten av utbrotten rapporterades från Frankrike. I fyra fall ledde förgiftningen till dödsfall (EFSA, 2009). Underrapporteringen av antalet matförgiftningar tros i allmänhet vara stor och i synnerhet vad gäller matförgiftningar orsakade av stafylokocker på grund av de kortvariga symptomen.



**Figur 1.** Fördelning av smittkällor som orsakat matförgiftningar hos svenskar år 2003-2007.  
Källa: Livsmedelsverket 2009.

Enligt rapporter inkomna till Livsmedelsverket och Smittskyddsinstitutet är de vanligaste smittkällorna för stafylokocker maträtter som pizza och kebab. Orsakerna till att folk drabbas av matförgiftning tros främst vara bristande temperaturkontroll vid tillagning och dålig handhygien hos personer som hanterar livsmedlen (Livsmedelsverket, 2009). Internationellt sett är produkter gjorda på opastöriserad mjölk, framför allt ost, den livsmedelsgrupp som ofta orsakar stafylokockrelaterade matförgiftningar (Le Loir et al., 2003). Mjölksproducerande djur (med mastit eller subklinisk mastit) och mjölkutrustning utgör en kontaminationsrisk (Rørvik & Granum, 2007). Med bakgrund av detta valde vi att studera SE-produktionen i mjölk.

### 1.3 Stafylokocker

Stafylokocker är runda, 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  i diameter, grampositiva, katalaspositiva, icke-rörliga bakterier som förekommer som solitära, i par, korta kedjor eller oregelbundna kluster. Stafylokocker är fakultativa anaeroba och har såväl respirativ som fermentativ metabolism (Martin & Iandolo, 1999). I livsmedel är koagulaspositiva stafylokocker av störst betydelse då det framförallt är dessa som bildar enterotoxin. Vanligast förekommande bland de koagulaspositiva är *Staphylococcus aureus*.

*S. aureus* växer optimalt under aeroba förhållanden vid 37 °C och pH 7-7,5 men tillväxt kan ske i intervallet 7-48 °C och pH 4,5-9,3 (Martin & Iandolo, 1999; Harvey & Gilmour, 1999). *S. aureus* är även mycket salttålig och klarar miljöer med upp till 15 % NaCl. Den naturliga reservoaren för *S. aureus* är hud och slemhinnor hos varmblodiga djur och människor. Mellan 20-50 % av befolkningen är friska bärare av bakterien. Kolonisering sker framför allt i näsan, svalg, hårbotten och på händerna (Rørvik & Granum, 2007).

### 1.4 Stafylokockenterotoxin

Stafylokockenterotoxiner (SEs) är vattenlösliga extracellulära proteiner bestående av en polypeptidkedja med en molekylvikt på ca 30 kDa (Iandolo, 1989). I livsmedel är SE-produktion framförallt kopplat till *S. aureus*, men även koagulaspositiva *S. intermedius* och *S. hyicus* och koagulasnegativa stammar av *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* och *S. epidermidis* har setts kunna producera toxin. De koagulasnegativa har dock visat sig irrelevanta i livsmedelssammanhang (Le Loir et al., 2003).

Till dags dato har ett stort antal SEs identifierats, de klassiska stafylokockenterotoxin A (SEA) till SEE och de så kallade stafylokockenterotoxin liknande (SEI) som inkluderar SEG-SEI, SEIJ-SEIQ, SER-SET, SEIU-SEIV (Balaban & Rasooly, 2000). Olika stammar av *S. aureus* har förmågan att producera allt ifrån inga till flera olika SEs (Iandolo, 1989).

Troligen produceras SEs mot slutet av bakteriens exponentiella tillväxtfas och under stationärfasen (Rørvik & Granum, 2007). Intervallet inom vilket toxin bildas har ett optimum mellan 35-40 °C och pH 6-7 (SEA 5,3-6,8) men SEs kan bildas mellan pH 4,8-9,0 (Adams & Moss, 2008). Vattenaktiviteten ( $a_w$ ) är också avgörande för SE-produktionen. SEA och SED kan bildas vid  $a_w > 0,86$  medan bildning av SEB och SEC kräver  $a_w > 0,93$  (Rørvik & Granum, 2007).

På grund av sin kompakta struktur är SEs stabila och står emot låga pH-värden, värmebehandling och matspjälkningskanalens proteaser. Värmestabiliteten varierar dock med mediets pH och salthalt (Balaban & Rasooly, 2000). Toxinerna tros interagera med tarmepitelet och centrala nervsystemet och därigenom orsaka framför allt illamående och kräkningar. De exakta detaljerna kring hur detta går till är inte kända (Adams & Moss, 2008).

Flera studier visar att SEA är det toxin som oftast orsakar matförgiftningar följt av övriga klassiska SEs (Balaban & Rasooly, 2000; Genigeorgis, 1989) SEA produceras framför allt av *S. aureus*-stammar av humant ursprung medan SEC är vanligare bland stammar av animaliskt ursprung (Akineden et al., 2008).

Den mängd toxin som behöver intas för att drabbas av matförgiftning är låg, runt 100 ng. Vid ett större matförgiftningsutbrott i USA har visats att ett intag av så låga nivåer som 0,5-0,75 ng SEA/ml livsmedel (chokladmjölk) gav barn matförgiftningssymptom. Barnen fick totalt i sig toxinmängder motsvarande  $144 \pm 50$  ng SEA (Evenson et al., 1988).

### 1.5 Detektionsmetoder för stafylokockenterotoxiner

De på marknaden tillgängliga kommersiella antikroppsbaseade metoderna detekterar SEA-SEE (Morandi et al., 2007). De vanligaste detektionsmetoderna för SEs är RPLA (reverse-phase latex agglutination) och immunologiska metoder som bygger på ELISA (Harvey & Gilmour, 1999).

ELISA, som är den metod vi har valt i detta försök, har en förhållandevis låg detektionsgräns och kan detektera nivåer av SEs lägre än 1 ng/g livsmedel (Freed et al., 1982). Antikroppar från får har visat sig ge färre falskt positiva resultat än antikroppar från kanin då fårantikroppar har en lägre affinitet till protein A (Freed et al., 1982). Protein A är ett ytprotein hos de flesta stammar av *S. aureus*. Proteinet binder till immunglobulinernas konstanta delar, framför allt IgG-antikroppar (Nationalencyklopedin, 2010), och kan därigenom bidra till ett falskt positivt resultat. Med anledning av detta eftersträvas antikroppar med så låg bindningsförmåga som möjligt till protein A (Freed et al., 1982).

### 1.6 Varför kvantifiera toxininnehållet i livsmedel

Två begrepp att hålla isär är kvalitativa och kvantitativa analyser. Till skillnad från kvalitativa metoder, där endast förekomst av en eller flera SEs påvisas, fastställer en kvantitativ analys även koncentrationen SEs.

Anledningen till varför det kvantitativa SE-innehållet i livsmedel bör analyseras istället för antalet kolonibildande enheter (colony forming units, cfu) av *S. aureus* är för att det är SEs som orsakar matförgiftning. Studeras enbart antalet cfu/g eller cfu/ml livsmedel kan det ge en direkt missvisande bild av livsmedlets säkerhet med avseende på toxininnehåll då inte alla stammar av *S. aureus* har förmågan att producera SEs.

Morandi et al. (2007) har i en studie visat att 67 % av *S. aureus*-stammarna innehöll en eller flera gener som kodar för SEs inkluderat både ”klassiska” toxiner (SEA-SEE) och ”nya” (SEG-SEJ). Av dessa var 52 % toxinproducerande vid odling i buljong. Andelen toxigena stammar varierar dock mellan olika studier. I en studie gjord av Notermans och van Otterdijk (1985) var 25 % av *S. aureus*-stammarna toxinproducerande och Rørvik & Granum (2007) påstår att 50-70 % är SE-producerande. Nuvarande lagstiftning kräver analys av SEs om halten koagulaspositiva stafylokocker är över  $10^5$  cfu/g i ost, mjölkpulver eller vasslepulver (Kommissionens Förordning (EG) nr 2073/2005). Vid utbrottsutredningar har dock konstaterats att halter av koagulaspositiva stafylokocker mellan  $10^2$ - $10^9$  cfu/g är tillräcklig mängd för att orsaka matförgiftning (Kérouanton et al., 2007).

I praktiken är det möjligt att det under något produktionssteg skett tillväxt av *S. aureus* och att SEs bildats i livsmedlet. Till följd av diverse processer (t.ex. pastörisering, torkning, sänkning av pH, lagring) kan bakterieantalet ha reducerats, medan aktivt toxin fortfarande finns kvar (Harvey & Gilmour, 1999).

Mycket forskning har ägnats åt att, till exempel med PCR-teknik, detektera generna som kodar för SEs. Men att analysera SE-gener för att fastställa om ett livsmedel är säkert med avseende på SE-innehåll är inte aktuellt. Forskarna är inte på det klara med under vilka omständigheter toxinerna produceras och man bör komma ihåg att långt ifrån alla gener uttrycks jämt. Somliga gener uttrycks ständigt medan andra uttrycks ibland, under särskilda förhållanden eller aldrig (Morandi et al., 2007). Detta innebär att om genen som kodar för ett visst enterotoxin detekteras så behöver det inte betyda att genen har uttryckts. Dessutom kodas olika SEs från olika loci och styrs av olika genetiska mekanismer vilket bidrar till att de kan uttryckas under olika betingelser (Le Loir et al., 2003).

## 2. Material och metoder

### 2.1 Bakteriestammar

#### 2.1.1 Odling

De stammar av *S. aureus* som användes (SA36:1, SA161:4 SA168:1 och SA176:1) hade isolerats från korttidslagrade ostar tillverkade på gårdsmejerier runt om i Sverige. SA161:4 och SA168:1 hade förmågan att producera SEA medan SA36:1 och SA176:1 producerade SEC (Rosengren, 2010). En referensstam (FRI913) som både producerade SEA och SEC användes (vänligen tillhandahållen av Dr S. Loncarevic vid Veterinærinstituttet Norge).

Stammarna odlades vid 37 °C över natt (Termarks) på nötblodagar (Oxoid) varefter stammarnas renhet kontrollerades. En isolerad koloni slammades upp i 10 ml BHI-buljong (BD Difco) respektive 10 ml pastöriserad mjölk (Arla mellanmjölk, 1,5 % fetthalt) och odlades vid 37 °C över natt.

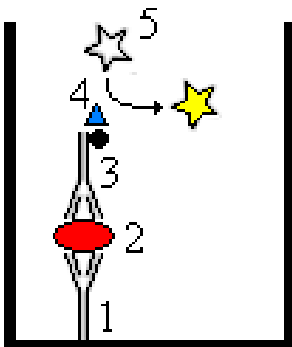
#### 2.1.2 Centrifugering och sterilfiltrering

BHI-buljongen centrifugerades 10 min 3252 g (Hettich Universal 30 F). Supernatanten från BHI-buljongen sterilfiltrerades genom 0,2 µm Whatman-filter (Schleicher & Schuell) ner i ett Falconrör (BD) märkt med stambeteckning och datum och förvarades vid -20 °C.

Den pastöriserade mjölken centrifugerades 10 min 3252 g (Hettich Universal 30 F). I likhet med Ridascreens metod kasserades det fettskiktet som bildades överst i mjölkprovet. Toxinerna är vattenlösliga och antas finnas i supernatanten. Supernatanten fördes över till Falconrör (BD) märkt med stambeteckning och datum och förvarades vid -20 °C.

## 2.2 ELISA

Metoden vi valde att använda baseras på den metod Schelin och Rådstöm utarbetat vid Lunds Tekniska Högskola. De yttersta brunnarna på mikrotiterplattan uteslöts då det fanns en misstanke om att ströljus kunde påverka resultaten vid avläsning. För att ändå analysera en rimlig mängd prov per platta (3 st) resulterade detta till att proverna analyserades i duplikat när triplikat hade varit mer önskvärt. För detaljerat utförande, recept på buffertar, reagenser och utrustning se bilaga 1 och 2. En schematisk bild över de olika reaktionsstegen visas i figur 2. Varje analys utfördes två gånger, totalt åtta analyser utfördes.



**Figur 2.** Schematisk bild över reaktionsstegen i brunnarna på mikrotiterplattan. 1. Coating-antikropp binder till brunnarna. 2. SEA eller SEC från prov eller standardkurva binder till coating-antikroppen. 3. Biotinylerad detektionsantikropp binder in till SE. 4. NeutrAvidin-kopplat alkaliskt fosfat binder till detektionsantikroppen. 5. Substratet *p*-nitrofenylfosfat reagerar med alkaliska fosfatet och en fosfatgrupp klyvs av. Substratet blir gult. Intensiteten i färgen är proportionell mot mängden toxin.

Källa: Modifierad från University of Bergen.

### 2.2.1 Coating och blockning

Mikrotiterplattor (Thermo Fisher Scientific Inc.) coatades med 100  $\mu$ l coating-antikropp (Toxin Technologies Inc.) i varje brunn. Mikrotiterplattan inkuberades vid 4 °C över natten (Termarks). Dagen efter blockerades tomma ytor med blockbuffert. Blockning skedde i 1 timme vid 37 °C plus ytterligare minst 1 timme vid 4 °C.

### 2.2.2 Tvätt

Blockbufferten kasserades och mikrotiterplattan tvättades genom att 185  $\mu$ l tvättbuffert dispenserades till mikrotiterplattans samtliga brunnar med hjälp av en Finnpiquette® Novus (Thermo Fisher Scientific Inc.). Tvättbufferten tömdes omedelbart ut genom att plattan hastigt vändes över diskhon. Plattan slogs mot pappershanddukar för att få bort resterade tvättbuffert. Proceduren upprepades ytterligare en gång. Ytterligare tvättning skedde genom att 185  $\mu$ l tvättbuffert dispenserades till mikrotiterplattans samtliga brunnar och plattan placerades på skakbord (figur 3) 5 min 250 svängningar/min (Janke & Kunkel IKA Labortechnik). Tvättbufferten tömdes ut genom att plattan hastigt vändes över diskhon. Plattan slogs mot pappershanddukar för att få bort resterade tvättbuffert. Proceduren upprepades en gång.



**Figur 3.** Skakbord (KS 250 Janke & Kunkel IKA Labortechnik) användes vid tvättning av mikrotiterplattan.

### 2.2.3 Standardkurva, prov, positivkontroll och blankprover

En standardkurva upprättades genom att späda renframställt stafylokokenterotoxin (Toxin Technologies Inc.) till koncentrationen 100 ng/ml i MilliQ-vatten. Därefter gjordes en seriespädning i 1:2 steg (från 10 ng/ml till 0,039 ng/ml) i BHI-buljong eller pastöriserad mjölk. På grund av de höga toxinkoncentrationerna utfördes arbetet i LAF-bänk<sup>1</sup>. De okända proverna späddes 1:50, 1:100 och 1:200 för analys i BHI-buljong eller 1:10, 1:20 och 1:50 för analys i mjölk. Som positiv kontroll (PC) användes stam SA161:4 vid SEA-analys och stam SA36:1 vid SEC-analys. PC späddes 1:100 för analys i BHI-buljong och 1:20 för analys i mjölk. Blankproverna utgjordes av obehandlad BHI-buljong eller pastöriserad mjölk.

Till respektive brunn på mikrotiterplattan tillsattes 100  $\mu$ l av standardkurvans spädningar, ospädda och spädda prover, PC och blankprover (figur 4). Fyra analyser gjordes även med

<sup>1</sup> Dragskåppliktade arbetsyta, även kallad sterilbänk, med laminärt luftflöde som skyddar såväl provet som laboranten.



blankprover i yttersta brunnarna. Plattan inkuberades vid 37 °C i 1,5 timmar och tvättades därefter enligt 2.2.2 *Tvätt* men istället för att tömma ut tvättbufferten i diskhon samlades den upp i en plastpåse för destruktion.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											Blank
B		10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	PC	
C		PC	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	Blank	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	
D		10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	Blank	
E		Blank	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	Blank	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	
F		10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	PC	
G		PC	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	Blank	Prov 1:1	Prov 1:10 1:50	Prov 1:20 1:100	Prov 1:50 1:200	
H	Blank											PC

**Figur 4.** Fördelningen av standardkurvas spädningar, spädda prover, positiva kontroller (PC) och blankprover på mikrotiterplattan. Fyra analyser gjordes även med blankprover i yttersta brunnarna.

#### 2.2.4 Biotinylerad detektionsantikropp

Biotinylerad detektionsantikropp (Toxin Technologies, Inc.) späddes 1:2000 i assay-buffert med 1 % mjölkpulver (Semper) och 100 µl dispenserades till varje brunn på mikrotiterplattan. Plattan inkuberades vid 37 °C i 1,5 timmar och tvättades därefter enligt 2.2.2 *Tvätt*.

#### 2.2.5 NeutrAvidin-kopplat alkaliskt fosfatas

NeutrAvidin-kopplat alkaliskt fosfatas (Thermo Fisher Scientific) späddes 1:1000 i assay-buffert och 100 µl dispenserades till varje brunn på mikrotiterplattan. Plattan inkuberades vid 37 °C i 30 minuter och tvättades därefter enligt 2.2.2 *Tvätt*.

#### 2.2.6 *p*-Nitrofenylfosfat och avläsning

Slutligen tillsattes 100 µl *p*-nitrofenylfosfat (Sigma) till varje brunn. Plattan förvarades mörkt i rumstemperatur och absorbansen lästes av efter exakt 45 min vid 405 nm i en Multiscan EX spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) med mjukvaran Ascent Software (figur 5).

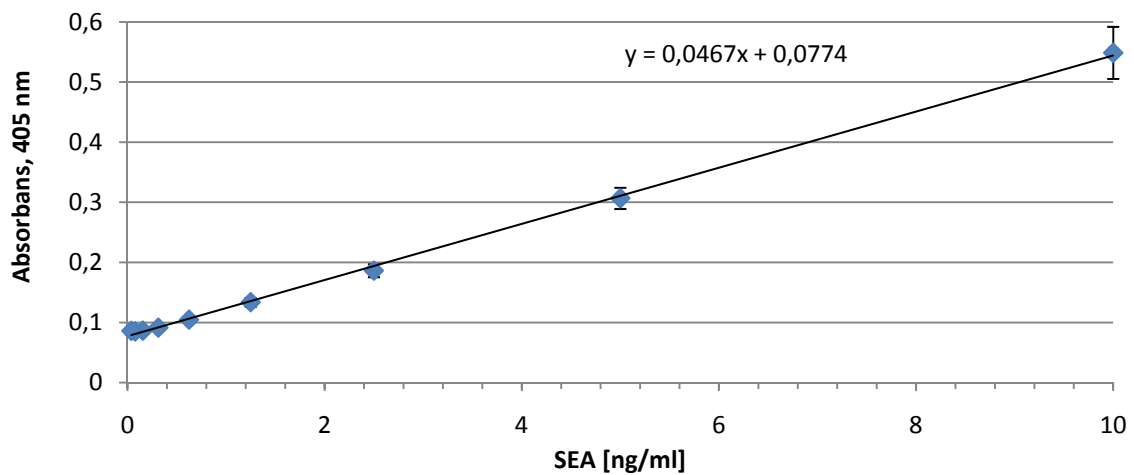


**Figur 5.** Mikrotiterplattan lästes av i en Multiscan EX spektrofotometer.

### 2.2.7 Tolkning av resultaten

Positiva kontrollernas och blankprovernas absorbansvärden kontrollerades och medelvärde och standardavvikelse beräknades. Om de positiva kontrollernas absorbansvärden överensstämmer indikerar detta att alla delar av mikrotiterplattan har behandlats lika.

En separat standardkurva (figur 6) med en unik regressionslinje upprättades för varje analys genom att medelvärdet av standardkurvans spädningar plottades mot toxinkoncentrationen. Absorbansvärden över 2,5 togs ej med i beräkningarna då de ej kan antas vara linjära (Sjögren, 2010). Prover med absorbanser högre än standardkurvans kunde inte heller antas vara linjära och utslöts därför. Även prover med absorbanser lägre än eller lika med blankproverna plus två standardavvikelser utslöts då dessa tangerar området för nedre gräns för kvantifiering och kan därmed inte ses som tillförlitliga. Toxinkoncentrationen i proverna beräknades därefter utifrån räta linjens ekvation ( $y = kx + m$ ).



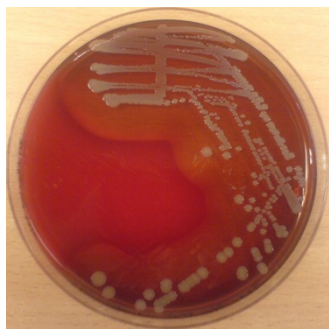
**Figur 6.** Exempel på standardkurva med standardavvikelser inritade hämtad från analys av SEA i pastöriserad mjölk test 2.

## 3. Resultat

### 3.1 Bakteriestammar

#### 3.1.1 Odling

Kolonierna uppvisade det karakteristiska utseendet som kännetecknar *S. aureus*; runda, släta, grå, ca 1-2 mm i diameter (figur 7). SA161:4 och SA168:1 saknade hämolys. Samtliga stammar konstaterades vara fria från kontamineringar.



Figur 7. *S. aureus* med tydlig hämolys utstruken på nötblodagar.

Inkuberingarna i BHI-buljong och mjölk varierade mellan 16,5-23,5 timmar (tabell 1).

Tabell 1. Inkuberingstider för använda stammar i BHI-buljong och mjölk

Stammar	Matrix	Inkubering
FRI913, SA161:4, SA168:1	BHI-buljong	22 timmar 45 minuter
FRI913, SA161:4, SA168:1	Mjölk	23 timmar 30 minuter
SA36:1, SA176:1	BHI-buljong	23 timmar
SA36:1, SA176:1	Mjölk	16 timmar 35 minuter

### 3.2 ELISA

#### 3.2.1 Blankprover

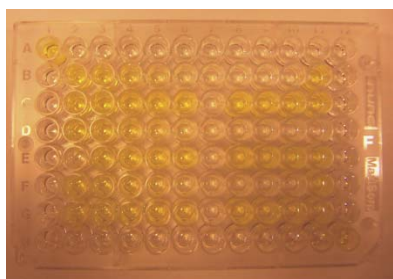
Absorbansvärdena var generellt lägre i plattans överkant och högre i nederkant (figur 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0,075	0,073	0,072	0,073	0,072	0,072	0,074	0,074	0,074	0,089	0,076
B	0,081											0,078
C	0,078						0,080					0,080
D	0,080										0,078	0,079
E	0,079	0,181					0,072					0,075
F	0,093											0,085
G	0,087						0,073					0,077
H	0,119	0,107	0,125	0,117	0,094	0,103	0,097	0,097	0,097	0,101	0,105	

Figur 8. Exempel på absorbanser för blankprover fördelade på mikrotiterplattan från analys av SEC i BHI-buljong test 1.

### 3.2.2 Kvantifiering

Då det på förhand var svårt att uppskatta hur mycket toxin som bildats i proverna innebar detta att vi vid tre försök (test 1 med SEA i mjölk, test 1 med SEC i mjölk och test 1 med SEC i BHI-buljong (figur 9)) endast fick ett eller två absorbansvärden för proverna som låg inom standardkurvan och därmed var användbara för vidare beräkningar.



**Figur 9.** Mikrotiterplattan strax efter avläsning. Bilden visar första testet av SEC i BHI-buljong. Proverna fick en för hög absorbans på grund av att förväntade toxinnmängden hade missbedömts och proverna hade inte späts tillräckligt. Att toxinkoncentrationerna var höga framgår visuellt av den skarpt gula färgen i brunnarna med prov.

Resultaten visade att använda stammar producerade SEA i BHI-buljong och mjölk och att SEC producerades i BHI-buljong men endast i begränsad omfattning i mjölk (tabell 2).

**Tabell 2.** Beräknat kvantitativt SE-innehåll i ng/ml sammanställt från 8 analysförsök.

- = inte analyserat; > = för höga absorbanser, ej linjära

	SEA (ng/ml)				SEC (ng/ml)			
	BHI-buljong		Mjök		BHI-buljong		Mjök	
Stam	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
FRI913	327	352	11	13	>	257	0,4	0,5
SA161:4	496	664	33	38	-	-	-	-
SA168:1	121	175	7	9	-	-	-	-
SA36:1	-	-	-	-	300	94	3	1,1
SA176:1	-	-	-	-	281	113	0,6	0,7

Stam SA161:4 var den av de analyserade stammarna som producerade mest SEA i såväl BHI-buljong som mjök följt av FRI913 och SA168:1. En högproducerande SEA-stam bildade stora mängder toxin i såväl BHI-buljong som mjök.

När det gällde SEC var sambanden inte lika tydliga, vilket kan vara till följd av att test 1 i BHI-buljong och test 1 i mjök genererade endast ett eller två absorbansvärden för proverna inom mätnområdet. Resultaten blir därmed mindre tillförlitliga. I test 1 i BHI-buljong bildade FRI913 så stora mängder att de föll utanför standardkurvas analysområde (>), följt av SA36:1 och SA176:1. I test 2 i samma medium var ordningsföljden ändrad; FRI913 var fortfarande den som producerade mest följt av SA176:1 och lägst produktion hade SA36:1. Vid analys i pastöriserad mjök bildade SA36:1 de högsta SEC-mängderna följt av SA176:1 och FRI913. Sammanfattningsvis såg vi ett tydligt samband stammarna emellan avseende SEA-produktion, men fann inget motsvarande samband vid SEC-produktion.

### 3.2.3 Nedre gräns för kvantifiering

Den nedre gränsen för att kvantitativt kunna bestämma SE-innehållet bestämdes till 0,313 ng/ml för SEA och 0,156 ng/ml för SEC. Under dessa värden planade standardkurvan ut och absorptionsvärdena skiljde sig inte från blankproverna (tabell 3). Vid fastställande av nedre kvantifieringsgränsen togs hänsyn till blankprovernas absorptionsvärden adderat med två standardavvikelser (data ej redovisade).

**Tabell 3.** Absorptionsvärden mätta vid 405 nm för olika spädningskurvor i spädningskurvan och blankprover. Den nedre gränsen för kvantifiering markeras av en streckad linje.

SE (ng/ml)	SEA (Abs. 405 nm)				SEC (Abs. 405 nm)			
	BHI-buljong		Mjök		BHI-buljong		Mjök	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
<b>0,625</b>	0,433	0,401	0,130	0,105	0,188	0,552	0,133	0,116
<b>0,313</b>	0,388	0,383	0,108	0,091	0,133	0,319	0,104	0,099
<b>0,156</b>	0,412	0,375	0,104	0,086	0,105	0,207	0,096	0,087
<b>0,078</b>	0,439	0,385	0,099	0,085	0,091	0,145	0,090	0,083
<b>0,039</b>	0,394	0,385	0,100	0,086	0,089	0,114	0,101	0,082
<b>Blankprover</b>	0,384	0,378	0,094	0,087	0,083	0,082	0,079	0,076

## 4. Diskussion

### 4.1 Bakteriestammar

#### 4.1.1 Odling

*S. aureus* förmåga att hämolysera på nötblodagar har i denna studie inte visat sig vara kopplad till SE-produktionen, vilket stämmer överens med resultat från tidigare studier (Lim et al., 1986).

#### 4.1.2 Sterilfiltrering

Efter att kolonierna odlats och centrifugerats i BHI-buljong eller mjölk användes supernatanten för vidare analys då SEs är vattenlösliga och förväntades dispergerade i supernatanten. För att ytterligare rena BHI-proverna och få bort debris sterilfiltrerades dessa. Ett så rent prov som möjligt är önskvärt för att undvika att annat än toxinerna reagerar med antikropparna i ELISA:n vilket skulle kunna generera falskt positiva resultat. SEs är så små att de passerar filtret.

Mjölksproven gick inte att filtrera då de innehöll höga koncentrationer stora molekyler (proteiner och fett) som täppte till filtren. I det kommersiella detektionkitet Ridascreen<sup>®</sup>s metod för SEA till SEE späds mjölk och mjölkliknade prover 1:20 med destillerat vatten och kan därefter filtreras (Ridascreen, n.d.). Vi ville dock behålla proverna så koncentrerade som möjligt och valde att utesluta spädning och filtrering av mjölkproverna.

### 4.2 ELISA

#### 4.2.1 Blankprover

Att blankprovernas absorbanser skiljer sig mellan översta och nedersta raden bör tas i beaktande vid beslut om att utnyttja hela mikrotiterplattan för analyser.

#### 4.2.2 Kvantifiering

SE-produktionen är generellt högre eller till och med mycket högre i BHI-buljong än i pastöriserad mjölk. Faktorer som kan ha haft en inverkan på resultatet är pH, vattenaktiviteten, temperaturen och odlingsmediet. Stam FRI913, som har förmågan att producera både SEA och SEC, har en större SEA-produktion jämfört med SEC-produktion både i BHI-buljong och i mjölk.

Den mängd toxin som behöver intas för att drabbas av matförgiftning är runt 100 ng. Ett intag av så låga nivåer som 0,5-0,75 ng SEA/ml livsmedel har gett barn matförgiftningssymptom (Evenson et al., 1988). Våra resultat visar att betydligt högre SEA-mängder än så har producerats i våra prover. Tilläggas bör då att bakterietillväxt har skett under nästintill optimala förhållanden.

#### 4.2.3 Inkuberingstider

Som framgår av resultaten i tabell 2 är nivåerna med SEC i mjölk avsevärt lägre än SE-nivåerna i övriga analyserade prover. Inkuberingstiden kan ha spelat in då den är 6,5-7 timmar kortare för SEC-producerande stammarna 36:1 och 176:1 än övriga inkuberingar (se tabell 1). Men i SEC-analysen användes även referensstammen FRI913 som fått tillväxa 23,5 timmar och som trots detta producerar endast mycket små mängder SEC.

#### 4.2.4 Vattenaktivitet

SEA och SED kan bildas vid  $a_w > 0,86$  medan bildning av SEB och SEC kräver  $a_w > 0,93$  (Rørvik & Granum, 2007). Vattenaktiviteten i BHI-buljong och mjölk är ca 0,99 (Rosengren, 2010) och bör därmed inte ha påverkat SEA eller SEC bildningen. Sett ur ett större perspektiv är SEA och SED de SEs som oftast orsakar matförgiftningar (Balaban & Rasooly, 2000) och en förklaring kan vara att de har förmågan att bildas vid lägre vattenaktivitet än SEB och SEC.

#### 4.2.5 pH

Mjölk har normalt ett pH på 6,7 (Rosengren, 2010) vilket ligger nära optimum för SE-bildning. BHI-buljong har pH  $7,4 \pm 0,2$  vilket är lite högre än optimala förhållanden men gott och väl inom gränsen för SE-bildning (Adams & Moss, 2008).

#### 4.2.6 Bakteriemängder

I detta försök standardiserades inte antalet *S. aureus* som inokulerades i medierna vilket gör att viss variation i bakterieantalet troligtvis har förekommit. Inte heller mättes OD-värdet eller cfu efter odling i BHI-buljong eller mjölk. *S. aureus* är känslig för konkurrens med andra mikroorganismer (Le Loir et al., 2003) vilket kan ha bidragit till en sämre tillväxt i mjölk där sporbildande *Bacillus* och *Clostridium* kan ha överlevt pastöriseringen. BHI-buljongen antas vara helt steril efter att ha genomgått autoklivering.

Antalet bakterier som tillväxt i proven är en viktig faktor då fler bakterier kan producera mer toxin. Det kan vara en bidragande faktor till varför olika prov innehåller olika mycket SEA respektive SEC. Detta skulle också kunna vara en förklaring till varför SE-nivåerna är lägre i mjölk, om färre bakterier tillväxte i mjölken och konkurrens mellan olika mikroorganismer har förekommit.

#### 4.2.7 Odlingsmediet

Det ligger nära till hands att tro att odlingsmediet är mycket betydelsefullt i detta försök. Aminosyrasammansättningen i odlingsmediet är av betydelse för toxinbildningen. Valin är nödvändigt för bakterietillväxt och arginin och cystein krävs för både tillväxt och för bildande av SEA, SEB och SEC (Le Loir et al., 2003). Pastöriserad mjölk från ko är rik på aminosyror, dock är cystein den aminosyra som förekommer i begränsad mängd, 45 g/g totalt kväve (FAO, 1970). Tyvärr finns inte motsvarande siffror för aminosyrainnehåll i BHI-buljong att

tillgå. Det går inte att utesluta att de låga cysteinmängderna i pastöriserad mjölk har bidragit till de lägre SE-nivåerna.

#### 4.2.8 Nedre gräns för kvantifiering

AFSSA (French Food Safety Agency), EU:s referenslaboratorium för koagulaspositiva stafylokocker och stafylokockenterotoxiner, har i sin analysmetod en lägsta gräns för kvantifiering vid 0,081 ng/ml för SEA och 0,187 ng/ml för SEC. Därmed konstateras att vi lyckas bra med SEC-analyserna men att vi måste jobba på att sänka kvantifieringsgränsen för SEA.

Den höga kvantifieringsgränsen för SEA beror delvis på att substratet *p*-nitrofenylfosfat inte fungerade tillfredställande vid de två analyserna av SEA i BHI-buljong. Redan innan substratet dispergerades på mikrotiterplattan hade det vid dessa två körningar en intensivare gul färg vilket bidrog till högre absorbanser och en höjning av kvantifieringsgränsen. Substratet är mycket ljuskänsligt och tros ha hunnit reagera innan det dispergerades på mikrotiterplattan.

Vår ELISA innehåller ett par långa inkuberingar på 1,5 timmar och tack vare dessa nås en lägre gräns för att kvantitativt kunna bestämma SE-innehållet (Freed et al., 1982).

#### 4.3 Fortsatta studier

Som framgår av tabell 1 skiljer sig resultaten mellan test 1 och test 2 betänkligt och upprepningar av försöken skulle behöva göras för att få mer tillförlitliga resultat.

Det vore önskvärt att sänka lägsta gränsen för kvantifiering av SEA ytterligare till nivåer jämförbara med AFSSA:s metod.

Nu när metoden har visats fungera i enklare medier är nästa steg att gå vidare med mer komplexa livsmedel, t.ex. ost. Förhoppningen är att metoden kommer kunna användas i utbrottsanalyser där det finns misstankar om att människor har drabbats av matförgiftning orsakad av SEs.

Vidare bör också genernas betydelse för SE-bildningen studeras. Le Loir et al. (2003) har i sin artikel en sammanställning över var i genomet olika gener för SEs är lokaliserade. Genen som kodar för SEA, *sea*, ingår i en grupp som härstammar från fäger. Genen för SEC från nötboskap är lokaliserad på en så kallad "pathogenicity island" medan en annan variant av SEC återfinns på en plasmid. Även olika regulatoriska mekanismer är involverade i genuttrycken och uttrycket av *sea* är inte kopplat till uttrycket av *sec*.



## 5. Slutsatser

Vi har i denna studie visat att de stammar vi använde producerade SEA i BHI-buljong och mjölk och att SEC producerades i BHI-buljong men endast i begränsad omfattning i mjölk. SEA-produktionen är generellt högre eller till och med mycket högre än SEC-produktionen för analyserade stammar. Faktorer som har bidragit till de olika SE-nivåer anses vara bakterieantalet och odlingsmediet. Nedre kvantifieringsgräns bestämdes till 0,313 ng/ml för SEA och 0,156 ng/ml för SEC. Förhoppningen är att metoden kommer kunna användas i utbrottsanalyser där det finns misstankar om att människor har drabbats av matförgiftning orsakad av SEs.

## 6. Tack

Ett stor tack till min handledare Åsa Rosengren vid Mikrobiologiska enheten Livsmedelsverket för ovärderlig handledning, din entusiasm och ditt engagemang. Utan dig hade det inte blivit någon uppsats.

Tack till biträdande handledare Roland Lindqvist vid avdelningen för Forskning och utveckling Livsmedelsverket för värdefulla expertkommentarer under arbetets gång.

Jag vill även passa på att tack övriga medarbetare på Livsmedelsverkets Mikrobiologiska enhet för ert vänliga bemötande.

## 7. Referenslista

- Adams, M.R. & Moss, M.O. (2008). Bacterial agents of foodborne illness. I: M.R. Adams & M.O. Moss, red. 2008. *Food microbiology*. 3:e upplagan. 252-257. Cambridge: RSC Publishing.
- Akineden, Ö., Hassan, A.A., Schneider, E. & Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (2), 211-216.
- Balaban, N. & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (1), 1-10.
- Bergdoll, M.S., Sugiyama, H. & Dack, G.M. (1959). Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 85 (1), 62-69.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007, *The EFSA Journal* (2009), 271, 69-82.
- Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S. & Bergdoll, M.S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, 7 (4), 311-316.
- FAO (Food and Agricultural Organisation) (1970). Amino-acid content of foods and biological data on proteins. *FAO Nutritional Studies*, Nr. 24. Rom, Italy. Stycke 370. [Online] Tillgänglig: <http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T00.htm> [Hämtad 18 maj 2010].
- Freed, R.C., Evenson, M.L., Reiser, R.F. & Bergdoll, M.S. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Biology*, 44 (6), 1349-1355.
- Genigeorgis, C.A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*, 9 (4), 327-360.
- Harvey, J. & Gilmour, A. (1999). *Staphylococcus: Staphylococcus aureus*. I: R.K. Robinson, C.A. Bratt & P.D. Patel, red. 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol 3. 2066-2071. New York: Academic Press.
- Iandolo, J.J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, 43, 375-402.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. & De Busyer, M.L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115 (3), 369-375.
- Kommissionens Förordning (EG) nr 2073/2005 av den 15 november 2005 om mikrobiologiska kriterier för livsmedel.
- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1), 63-76.

- Lim, Y.S., Jegathesan, M. & Koay, A.S. (1986). Relationship of some biochemical characteristics of *Staphylococcus aureus* to enterotoxin production. *Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 80 (6), 972-974.
- Livsmedelsverket (2009). *Matförgiftningar i Sverige – analys av rapporterade matförgiftningar 2003-2007*. Livsmedelsverkets rapport nr 16, 2009.
- Livsmedelsverket (2010). *En halv miljon svenskar blir matförgiftade varje år*. [Online] (Uppdaterad 8 april 2010)  
Tillgänglig: <http://www.slv.se/sv/grupp3/Nyheter-och-press/Nyheter1/En-halv-miljon-svenskar-blir-matforgiftade-varje-ar/>  
[Hämtad 8 april 2010].
- Martin, S.E. & Iandolo, J.J. (1999). *Staphylococcus*: Introduction. I: R.K. Robinson, C.A. Bratt & P.D. Patel, red. 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol 3. 2062-2065. New York: Academic Press.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P. & Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology*, 124 (1-2), 66-72.
- Nationalencyklopedin, 2010. *Protein A*. [Online]  
Tillgänglig: <http://www.ne.se/protein-a>  
[Hämtad 27 april 2010].
- Notermans, S. & van Otterdijk, R.L.M. (1985). Production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 2 (3), 145-149.
- Ridascreen, (n.d.). RIDASCREEN set A,B,C,D,E: enzyme immunoassay for detection of *Staphylococcus enterotoxins A, B, C, D and E*. Art. No.: R4101. R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany.
- Rosengren, Å., 2010. Mikrobiologiska Enheten Livsmedelsverket, Uppsala, Sverige. Personlig kommunikation, 17 maj 2010.
- Rosengren, Å., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., & Lindqvist, R., manus. *Staphylococcus aureus in cheese produced on farm-dairies*.
- Rørvik, L.M. & Granum, P.E. (2007). *Staphylococcus aureus*. I: P.E. Granum red. 2007, 3:e upplagan. *Matförgiftning: næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. Kristiansand: Høyskoleforlaget AS. Kap. 17.
- Schelin, J. och Rådstöm, P., 2008. Standard operating procedure, SOP, for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and D in BHI broth and pasteurized milk using ELISA.
- Sjögren, Y., 2010. Kemiska Enheten 2 Livsmedelsverket, Uppsala, Sverige. Personlig kommunikation, 7 maj 2010.
- University of Bergen, 2010. *ELISA / Multiplex protein analyses*. [Online].  
Tillgänglig: <http://www.uib.no/rg/cardio/research/methods/elisa-multiplex-protein-analyses>  
[Hämtad 16 maj 2010].

## 8. Bilagor

### 8.1 Bilaga 1 – Detaljerat utförande

#### 1. Coating av mikrotiterplatta med typspecifik antikropp (IgG)

Görs eftermiddagen före.

1. Mät upp 10 ml coating-buffert. Tillsätt 20 µl anti-SEA eller 20 µl anti-SEC IgG-antikropp, stockkoncentration 1 mg/ml. Blanda försiktigt, undvik luftbubblor. Slutlig koncentration för coating-antikropp är 2 µg/ml. 10 ml räcker till 1 mikrotiterplatta med 96 brunnar.
2. Fördela 100 µl coating-antikroppslösning i varje brunn på mikrotiterplattan.
3. Täck mikrotiterplattan med lock.
4. Inkubera plattan i 4 °C över natten.
5. Notera starttid för inkubering: \_\_\_\_\_

#### 2. Blockering av tomma ytor

6. Notera stopptid för inkubering: \_\_\_\_\_
7. Vänd flaskan med blockbuffert upp och ner ett par gånger tills allt är väl blandat.
8. Kassera överflödigt coating-lösning genom att hastigt tömma mikrotiterplattan över diskhon.
9. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar för att få bort de sista dropparna. Viktigt för att undvika starka bakgrundssignaler.
10. Överför 185 µl blockbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
11. Täck mikrotiterplattan med lock.
12. Inkubera i 37 °C i 1 timme. Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_
13. Inkubera i 4 °C i minst 1 timme.  
Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_
14. Förbered under tiden standardkurva, prov och positiv kontroll (PC).

#### 3. Förberedelse av standardkurva, prov och positiv kontroll

15. Ta fram frysta prov och låt de tina.
  16. Ta fram enterotoxin-stocklösning.
  17. Märk 22 eppendorfrör med spädningar för standardkurva, prov och PC.
  18. Fördela korrekt volym av passande matrix för spädningar i eppendorfrören.
- Späd enterotoxin A eller enterotoxin C för standardkurvan i lämplig matrix. Matrixen är densamma som matrixen hos de okända proverna (BHI-buljong eller pastöriserad mjölk). Arbeta i laf-bänk.
19. Seriell spädning av toxinet (stockkoncentration 100 µg/ml) i 10x steg till 100 ng/ml i autoklaverat MilliQ-vatten. 100 µg/ml → 10 µg/ml → 1 µg/ml → 100 ng/ml  
**SEA/C 10 µg/ml:** 10 µl enterotoxin-stocklösning + 90 µl MilliQ → 10 µg/ml  
**SEA/C 1 µg/ml:** 20 µl från SEA/SEC 10 µg/ml + 180 µl MilliQ → 1 µg/ml  
**SEA/C 100 ng/ml:** 20 µl från SEA/SEC 1 µg/ml + 180 µl MilliQ → 100 ng/ml.

20. Späd toxinlösningen med koncentrationen 100 ng/ml med passande matrix (BHI-buljong eller mjölk) till lämpliga koncentrationer för standardkurvan. Se tabell 4 nedan.

**Tabell 4.** Schema att följa för upprättande av lämpliga enterotoxinkoncentrationer för standardkurva. Schemat beskriver spädning av SEA. Spädning av SEC sker på motsvarande sätt.

Eppendorfrör	Toxin	Matrix BHI-buljong eller mjölk	Toxin koncentration
<b>SEA 10</b>	100 µl SEA 100 ng/ml	900 µl	10 ng/ml
<b>SEA 5</b>	500 µl SEA 10 ng/ml	500 µl	5 ng/ml
<b>SEA 2,5</b>	500 µl SEA 5 ng/ml	500 µl	2,5 ng/ml
<b>SEA 1,3</b>	500 µl SEA 2,5 ng/ml	500 µl	1,3 ng/ml
<b>SEA 0,63</b>	500 µl SEA 1,3 ng/ml	500 µl	0,63 ng/ml
<b>SEA 0,31</b>	500 µl SEA 0,63 ng/ml	500 µl	0,31 ng/ml
<b>SEA 0,16</b>	500 µl SEA 0,31 ng/ml	500 µl	0,16 ng/ml
<b>SEA 0,078</b>	500 µl SEA 0,16 ng/ml	500 µl	0,078 ng/ml
<b>SEA 0,039</b>	500 µl SEA 0,078 ng/ml	500 µl	0,039 ng/ml

21. Förvara spädningarna i 4 °C tills övriga prov är förberedda.

- Späd proverna med lämplig matrix (BHI-buljong eller mjölk). Förslagsvis analyseras 3-4 olika spädningar av proven (BHI: outspätt, 50x, 100x och 200x. Mjolk: outspätt, 10x, 20x och 50x.).

**BHI: Prov 0x:** tas direkt från supernatanten

**Prov 50x:** 20 µl supernatant + 980 µl matrix → 1:50 spädning i 1000 µl matrix

**Prov 100x:** 400 µl prov 50x + 400 µl matrix → 1:100 spädning i 800 µl matrix

**Prov 200x:** 200 µl prov 100x + 200 µl matrix → 1:200 spädning i 400 µl matrix

**Mjolk: Prov 0x:** tas direkt från supernatanten

**Prov 10x:** 100 µl supernatant + 900 µl matrix → 1:10 spädning i 1000 µl matrix

**Prov 20x:** 500 µl prov 10x + 500 µl matrix → 1:20 spädning i 1000 µl matrix

**Prov 50x:** 200 µl prov 20x + 300 µl matrix → 1:50 spädning i 500 µl matrix

- Späd PC med lämplig matrix (BHI-buljong eller mjölk). En spädning för PC räcker. Förbered en volym som räcker till sex replikat ( $6 \times 150 \mu\text{l} = 900 \mu\text{l}$ ).

**BHI: PC 100x:** 10 µl prov + 990 µl matrix → 1:100 spädning i 1000 µl matrix

**Mjolk: PC 20x:** 50 µl prov + 950 µl matrix → 1:20 spädning i 1000 µl matrix

- När standardkurvan, prov och positiv kontroll är färdigblandade fördelas de i MicroTubes™ i MicroRack™ så som de ska fördelas på mikrotiterplattan, se schema nedan.

22. Fördela varje spädning i spädningsskivan, proverna, PC och blankproverna (BHI-buljong eller mjölk) 150 µl/MicroTube.

23. Förvara MicroRacket i 4 °C till dess laddning på mikrotiterplattan ska ske.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Blank
B	/	10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	PC	/
C	/	PC	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	Blank	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	/
D	/	10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	Blank	/
E	/	Blank	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	Blank	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	/
F	/	10	5	2,5	1,3	0,63	0,31	0,16	0,078	0,039	PC	/
G	/	PC	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	Blank	Sample 0x	Sample 50x/10x	Sample 100x/20x	Sample 200x/50x	/
H	Blank	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	PC

#### 4. Tvättning

24. Ta ut mikrotiterplattan ur inkuberingen.
25. Notera den totala tiden för blockning: \_\_\_\_\_ (1 timme 37 °C + minst 1 timme 4 °C)
26. Vänd flaskan med tvättbuffert upp och ner ett par gånger tills allt är väl blandat.
27. Fyll behållaren för finpipettnovus med tvättbuffert.
28. Kasserar överflödiga blocklösningar genom att hastigt tömma mikrotiterplattan över diskhon.
29. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar för att få bort de sista dropparna. Viktigt för att undvika starka bakgrundssignaler.
30. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
31. Töm genast ut tvättningslösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar för att få bort de sista dropparna.
32. Upprepa tvättproceduren en gång till, punkt 30-31.
33. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar och täck plattan med lock. Placera mikrotiterplattan på ett skakbord, 5 min 250 svängningar/min.
34. Töm tvättningslösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
35. Upprepa denna tvättproceduren en gång till, steg 33-34. Ta under tiden fram MicroRacket ur kylskåpet och vara redo att ladda proverna på plattan.

#### 5. Laddning av prov, standardkurva och PC i mikrotiterplattans brunnar

36. Överför 100 µl från MicroTuberna i MicroRacket till motsvarande brunn på mikrotiterplattan. Arbeta från vänster till höger. Arbeta snabbt för att undvika stora tidsdifferenser mellan första och sista brunnen.
37. Täck plattan med lock.

#### 6. Inkubera i 37 °C i 1,5 timmar

38. Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_

#### 7. Förberedning av typspecifik detektionsantikropp (IgG biotinylerade)

Gör detta strax innan 1,5 timmars inkuberingen är klar.

39. Späd detektionsantikroppen 2000x i assay-buffert: blanda 5 µl biotinylerad antikroppslösning + 10 ml assay-buffert.
40. Tillsätt 1 % mjölkpulver: 0,1 g till 10 ml. Blanda försiktigt, undvik luftbubblor. Vortexa inte!
41. Förvara i 4 °C till dess laddning på mikrotiterplatta ska ske.

## 8. Tvättning

Utförs delvis i laf-bänk pga. höga koncentrationer toxin.

42. Vänd flaskan med tvättbuffert upp och ner ett par gånger tills allt är väl blandat.
43. Fyll behållaren för finnpipettnovus med tvättbuffert.
44. Ta ut mikrotiterplattan ur inkuberingen.
45. Arbeta i laf-bänk. Töm ut innehållet i brunnarna i en stor plastpåse genom att hastigt vända mikrotiterplattan upp och ner.
46. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar för att få bort de sista dropparna.
47. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
48. Töm genast ut tvättilösningen i plastpåsen. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
49. Upprepa tvättproceduren en gång till, steg 47-48.
50. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar och täck plattan med lock. Placera mikrotiterplattan på ett skakbord, 5 min 250 svängningar/min.
51. Töm tvättilösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
52. Upprepa denna tvättprocedur en gång till, steg 50-51. Ta under tiden fram den biotinylerade detektionsantikroppen.

## 9. Laddning av typspecifik detektionsantikropp (IgG biotinylerade)

53. Överför 100 µl detektionsantikroppslösning till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
54. Täck mikrotiterplattan med lock.

## 10. Inkubera i 37 °C i 1,5 timmar

55. Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_

## 11. Tvättning

56. Vänd flaskan med tvättbuffert upp och ner ett par gånger tills allt är väl blandat.
57. Fyll behållaren för finnpipettnovus med tvättbuffert.
58. Ta ut mikrotiterplattan ur inkuberingen.
59. Töm mikrotiterplattan med detektionsantikropparna i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
60. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
61. Töm genast ut tvättilösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
62. Upprepa tvättproceduren en gång till, punkt 60-61.
63. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar och täck plattan med lock. Placera mikrotiterplattan på ett skakbord, 5 min 250 svängningar/min.
64. Töm tvättilösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.

65. Upprepa denna tvättprocedur en gång till, steg 63-64. Förbered under tiden NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas.

## 12. Spädning och laddning av NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas

66. Späd NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas 1000x i assay-buffert: blanda 10 µl NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas + 10 ml assay-buffert. Blanda försiktigt, undvik luftbubblor.
67. Överför 100 µl NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
68. Täck mikrotiterplattan med lock.

## 13. Inkubera i 37 °C i 30 minuter

69. Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_  
Förbered under tiden *p*-nitrofenylfosfat, lös upp eller tina.

## 14. Förberedning av substrat *p*-nitrofenylfosfat

70. Lös upp två uppsättningar tabletter (2 guld + 2 silver) i 40 ml MilliQ-vatten i ett Falconrör, enligt tillverkarens instruktioner.
71. Linda in Falconröret i aluminiumfolie. Substratet är ljuskänsligt. Frys in det enzym som blir över i volymer á 10 ml i -20 °C, förvara mörkt.

## 15. Tvättning

72. Fyll behållaren för finpipettnovus med tvättbuffert.
73. Töm mikrotiterplattan med NeutrAvidin-kopplad alkaliskt fosfatas i diskhon.
74. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar för att få bort de sista dropparna.
75. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
76. Töm genast ut tvättilösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
77. Upprepa tvättproceduren en gång till, punkt 75-76.
78. Överför 185 µl tvättbuffert till mikrotiterplattans samtliga brunnar och täck plattan med lock. Placera mikrotiterplattan på ett skakbord, 5 min 250 svängningar/min.
79. Töm tvättilösningen i diskhon. Slå mikrotiterplattan mot pappershanddukar.
80. Upprepa denna tvättprocedur en gång till, steg 78-79. Förbered under tiden för att applicera substrat *p*-nitrofenylfosfat på mikrotiterplattan.

## 16. Laddning av substrat *p*-nitrofenylfosfat

81. Överför 100 µl substrat till mikrotiterplattans samtliga brunnar.
82. Täck mikrotiterplattan med lock.
83. Slå på spektrofotometern och programmera in hur plattan ska läsas av.

## 17. Inkubera mörkt i rumstemperatur i 45 minuter

OBS! Var noga med tiden.

84. Notera starttid: \_\_\_\_\_ Notera stopptid: \_\_\_\_\_

## 18. Läs av mikrotiterplattan vid 405 nm efter exakt 45 minuters inkubering



### **19. Tolkning av resultaten**

Kontrollera att positiva kontrollernas absorbansvärden är lika vilket indikerar att alla delar av mikrotiterplattan har behandlats lika.

Kontrollera att blankprovernas absorbanser är lika och att värdena är låga.

Upprätta en standardkurva. Plotta medelvärdet av absorbanserna mot toxinkoncentrationen.

Bestäm toxinkoncentrationerna i de okända proverna genom regressionslinjens ekvation.

Använd bara absorbansvärden som är inom mätområdet för standardkurvan.

## 8.2 Bilaga 2 – Buffertar, reagenser och utrustning

### **PBS (Phosphate buffered saline) 100mM, 1 liter**

80 g	NaCl (Merck)
2 g	KCl (Merck)
14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)

Kemikalierna löses i 800 ml MilliQ-vatten. pH justeras till 7,4 med 5 M NaOH. MilliQ-vatten tillsätts till en slutgiltig volym på 1000 ml. Lösningen fördelas på 2 st 500 ml flaskor och autoklaveras vid 121 °C i 20 min. Förvaras i rumstemperatur.

### **Coating-buffert 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 ml**

1,06 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Merck)
--------	---

Kemikalien löses i 90 ml MilliQ-vatten i en autoklaverad glasflaska (250 ml). pH justeras till 9,6 med 5 M HCl. MilliQ-vatten tillsätts till en slutgiltig volym på 100 ml. Förvaras vid 4 °C < 1 månad.

### **Tvättbuffert 10 mM PBS, 1 liter**

100 ml	100 mM PBS
900 ml	MilliQ-vatten
500 µl	Tween 20 (Merck)

PBS och MilliQ-vatten blandas i en autoklaverad glasflaska (1000 ml). Tween 20 tillsätts och blandas väl. Förvaras vid 4 °C < 1 månad.

### **Assay-buffert 50 mM PBS, 100 ml**

50 ml	100 mM PBS
50 ml	MilliQ-vatten
10 mg	BSA (Albumin from bovine serum) (Sigma)
100 µl	Tween 20 (Merck)

PBS och MilliQ-vatten blandas i en autoklaverad glasflaska (250 ml). BSA och Tween 20 tillsätts och blandas väl. Förvaras vid 4 °C < 1 månad.

### **Blockbuffert, 100 ml**

100 ml	Tvättbuffert
5 g	Mjölkpulver (Semper)

Blandas och förvaras vid 4 °C.

### **Coating-antikroppar**

SEA: sheep anti SEA IgG #SLAI101, koncentration 1 mg/mL

SEC: sheep anti SEC IgG #SLCI111, koncentration 1 mg/mL

Toxin Technologies, Inc., Sarasota, FL, USA

### **Biotinylerad detektionsantikropp**

SEA: biotinylated sheep anti SEA IgG #SBAC101

SEC: biotinylated sheep anti SEC IgG #SBCC111

Toxin Technologies, Inc., Sarasota, FL, USA

### **Enterotoxiner**

enterotoxin SEA #AT101SEA, koncentration 100 µg/mL

enterotoxin SEC<sub>1</sub> #CT111SEC1, koncentration 100 µg/mL

Toxin Technologies Inc., Sarasota, FL, USA

### **NeutrAvidin-kopplat alkaliskt fosfatas**

NeutrAvidin conjugated alkaline phosphatase #31002, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA

### **p-Nitrofenylfosfat**

SigmaFast™ p-nitrophenyl phosphate tablets #N2770, Sigma®, Saint Louis, MO, USA

### **Mjölkpulver**

Semper Mjölk till bak, mat och dryck, torkad skummjölk, Semper, Sundbyberg, Sweden

### **Mikrotiterplattor**

Nunc F96 MicroWell™ Plates Polystyrene, #442404 MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA

### **Pipett**

Finnpipette® Novus Single-Channel Pipette, 100-1000 µl, #46200400, Thermo Scientific, USA

### **Inkubatorer**

4 °C: KB8182

37 °C: B7395

Termarks, Bergen, Norway

### **Skakbord**

KS 250, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen, Germany

### **Spektrofotometer**

Multiscan EX spektrofotometer, Thermo Fischer Scientific Inc., USA