IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Caratterizzazione proteomica di *Brucella suis* per l'identificazione di target antigenici proteici da impiegare ad uso diagnostico – IZSAM 06/08 RC

Manuela Tittarelli, Ivanka Krasteva, Domenica Travaglini, Flavio Sacchini*

Convegno «I risultati della ricerca IZSAM 2012» - CIFIV

Teramo, 23 maggio 2013

Background

- Il progetto nasce da una scientific opinion dell'EFSA sulla brucellosi suina (*B. suis*) su richiesta della Commissione Europea (DG Health and Consumer Protection) a cui hanno partecipato esperti dell'IZSAM. **Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (Brucella suis). The EFSA Journal (2009) 1144, 1-112**

- Obiettivo: valutare la necessità o meno di adottare un piano di sorveglianza ed eradicazione della brucellosi suina in Europa in base a diffusione, rischi di introduzione nella filiera suina e di trasmissione all'uomo

- La Brucellosi suina è una zoonosi causata dalla *Brucella suis* biovar 1, 2 e 3, tra le quali, le biovarianti 1 e 3, sono particolarmente patogene per l'uomo
- Nonostante la lotta alla Brucellosi sia da anni una delle priorità veterinarie nazionali, il quadro epidemiologico di *Brucella suis* è ancora incompleto
- Inoltre i test sierologici impiegati presentano limiti di specificità quando applicati ai singoli capi

- Infatti i test diagnostici attualmente in uso (SAR, FdC, ELISA) si basano sulla determinazione di anticorpi diretti contro elementi della membrana esterna, tra i quali l'antigene lipopolisaccaridico (S-LPS) rappresenta la componente quali-quantitativa più importante oltre che la più immunogena

- L'espressione di tali antigeni in altri patogeni Gram negativi, primi fra tutti *Yersinia enterocolitica* 0:9, determina la comparsa di reattività crociate e pertanto di falsi positivi (Nielsen *et al*., 2006)

Obiettivi

- Caratterizzare le proteine di membrana di *Brucella suis* e *Y. enterocolitica* per l'identificazione di target antigenici proteici (non cross-reattivi) da impiegare ad uso diagnostico

Materiali e metodi

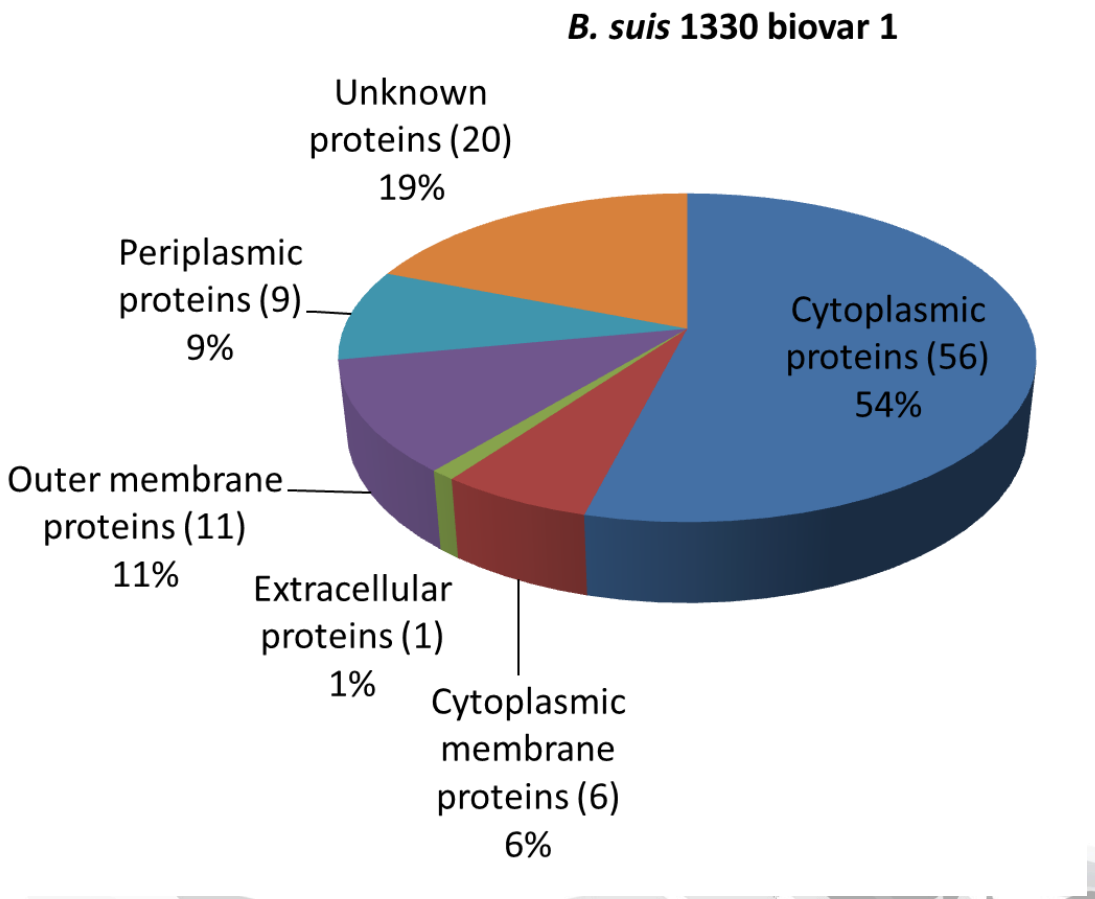
- **Ceppi**:
  - *Brucella suis* biovar 1 (NCTC 10316, ceppo 1330)
  - *Brucella suis* biovar 3 (NCTC 10511, ceppo 686)
  - *Yersinia enterocolitica* O:9 (NCTC 11174)

- Purificazione delle proteine di membrana (rimozione LPS) secondo quanto descritto in letteratura **(Connolly *et al*., 2006. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. Proteomics. Jul;6(13):3767-80)**

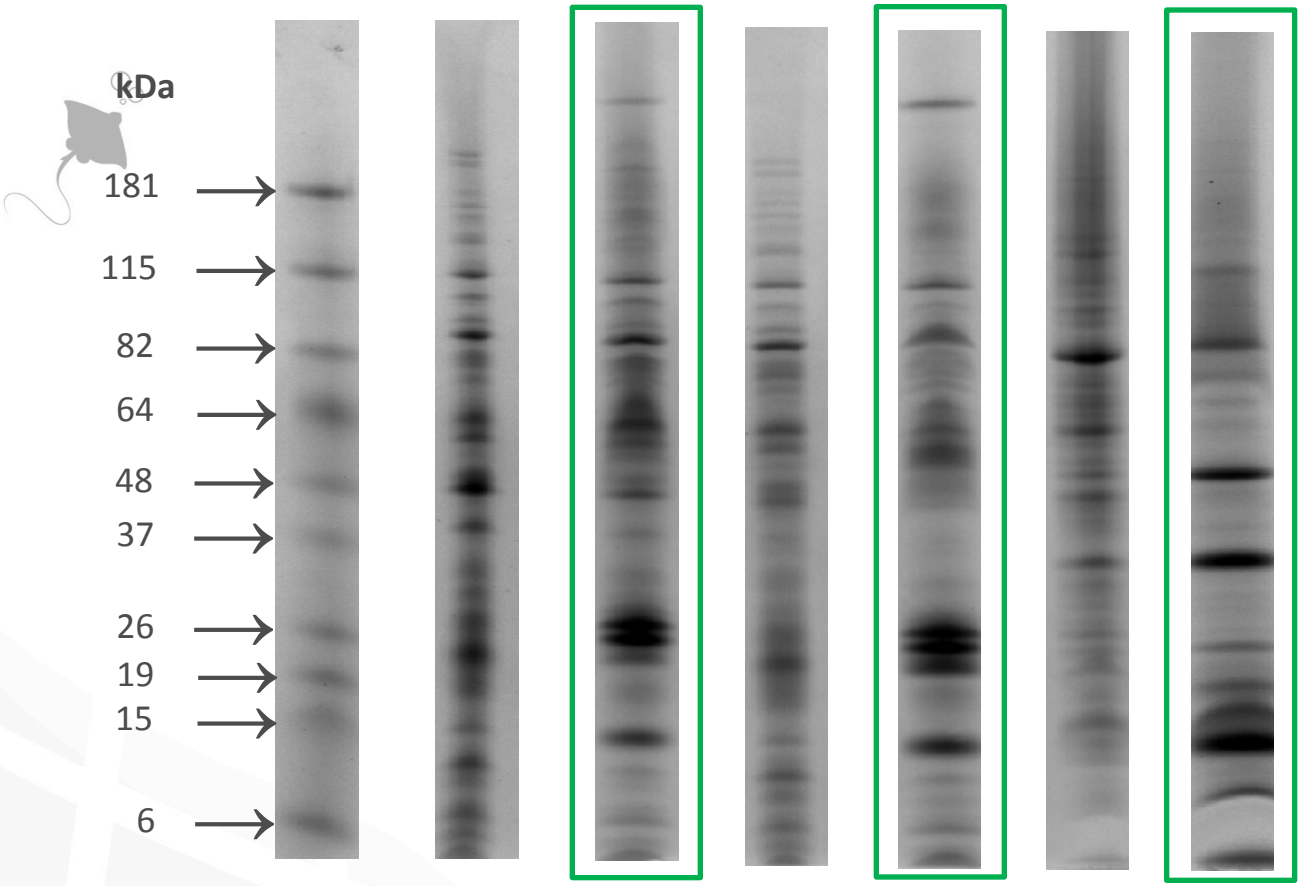
Risultati: *B. suis 1330 bv.1*

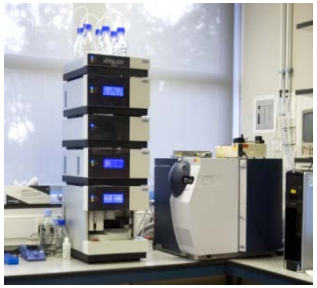
- Proteine identificate: **103**.

PSORTb v3.0 bacterial localization prediction tools to predict sub-cellular location



M&M: SDS-PAGE e LC-ESI-MS/MS





LC-ESI-MS/MS

W.C.: Whole Cells
M.P.: Membrane Proteins

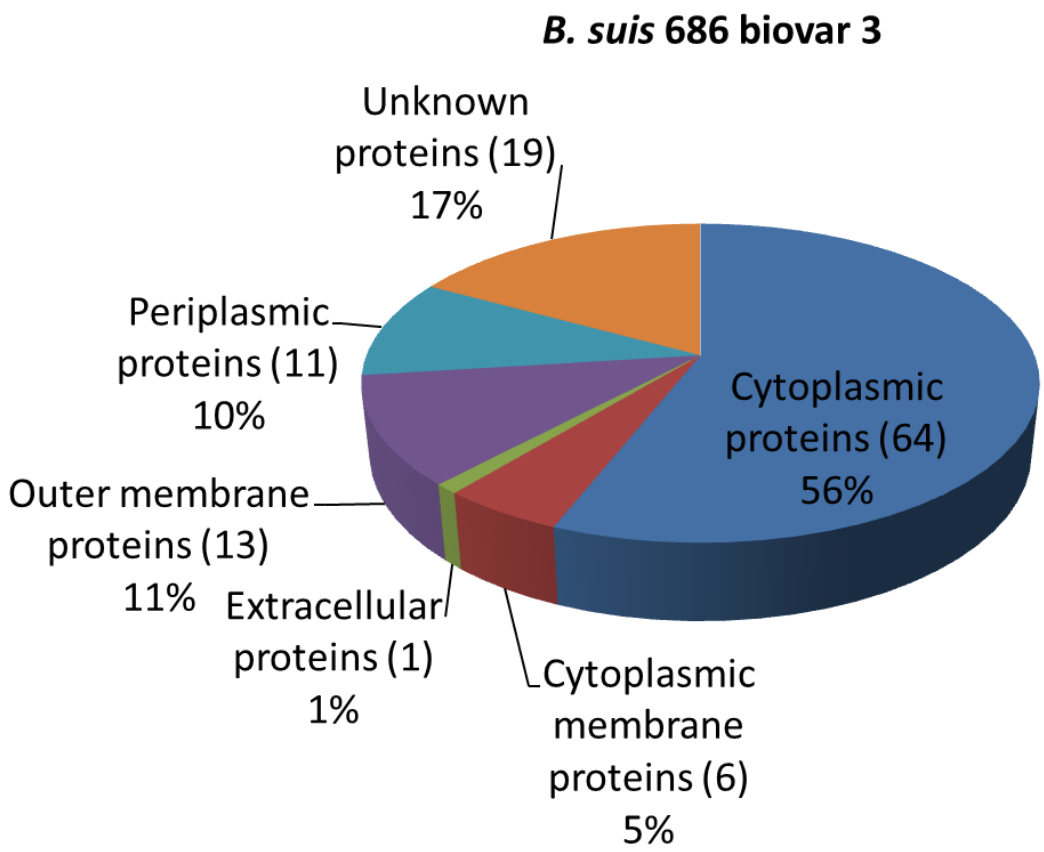
M&M: analisi bioinformatiche

- Le proteine identificate sono state confrontate mediante il software **Basic Local Alignment Search Tool** (NCBI **BLASTP**, versione 2.2.27) per individuare eventuali omologie di sequenza tra i 2 ceppi di *B. suis* e tra le *B. suis* e la *Y. enterocolitica*

Risultati: *B. suis 686 bv.3*

- Proteine identificate: **114**.

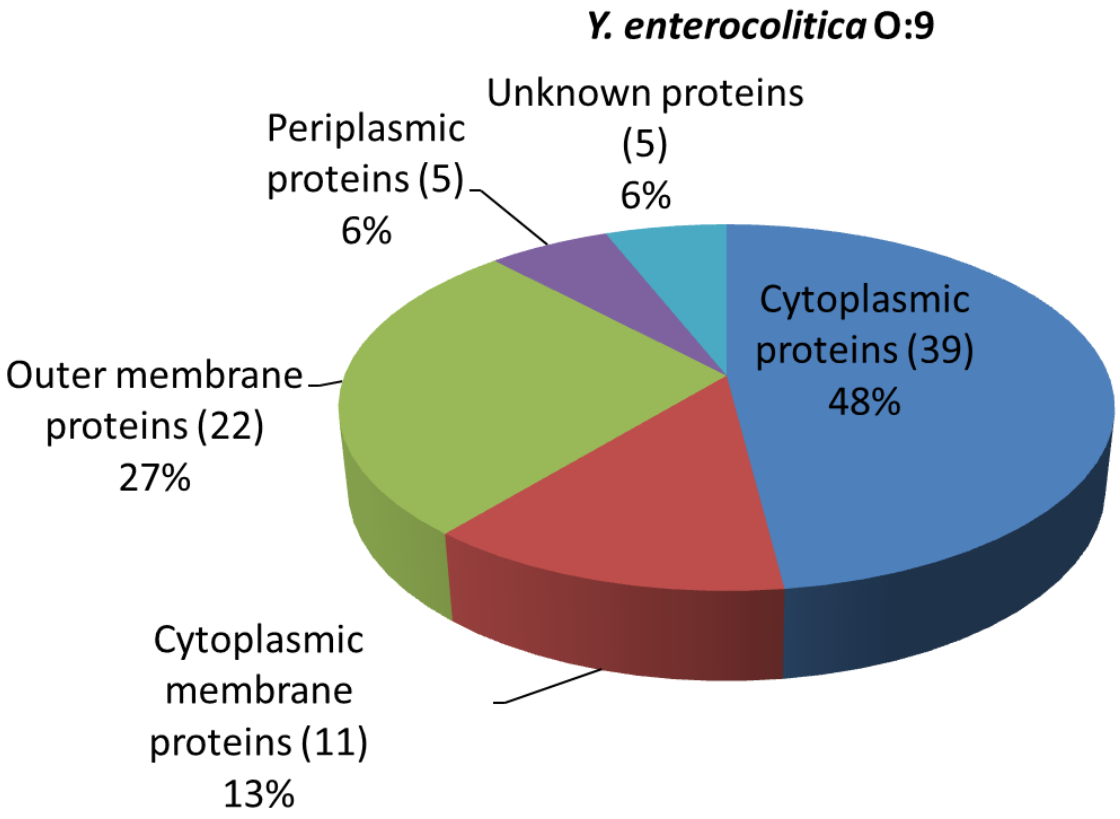
PSORTb v3.0 bacterial localization prediction tools to predict sub-cellular location

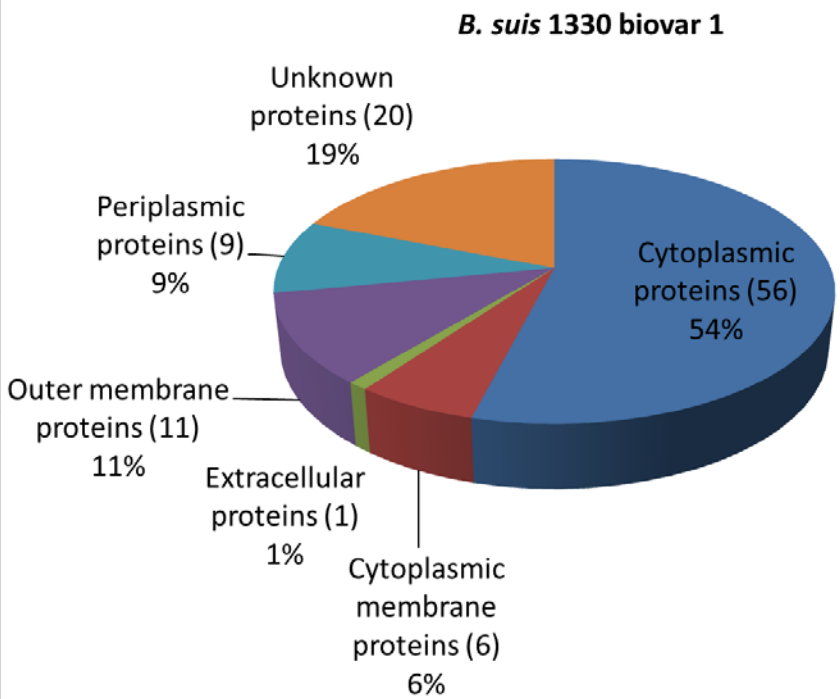


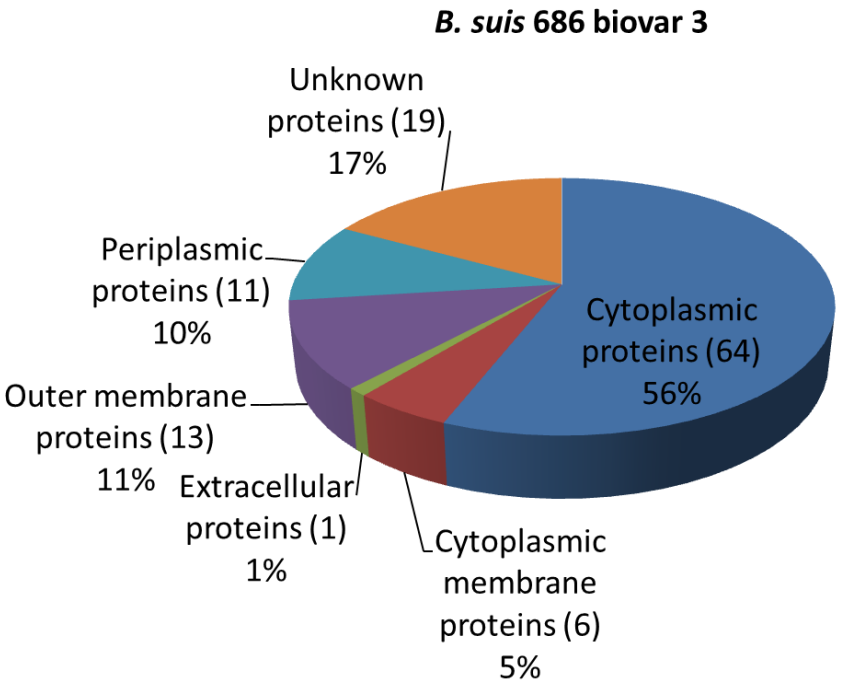
Risultati: *Y. enterocolitica* O:9

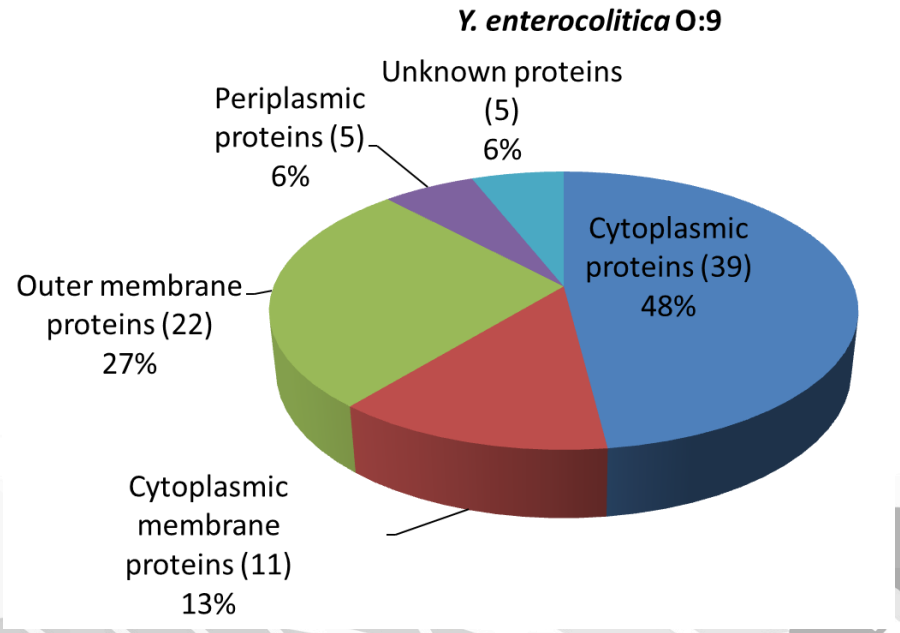
- Proteine identificate: **82**.

PSORTb v3.0 bacterial localization prediction tools to predict sub-cellular location




B. suis 1330 biovar 1
Unknown proteins (20) 19%
Periplasmic proteins (9) 9%
Cytoplasmic proteins (56) 54%
Outer membrane proteins (11) 11%
Extracellular proteins (1) 1%
Cytoplasmic membrane proteins (6) 6%


B. suis 686 biovar 3
Unknown proteins (19) 17%
Periplasmic proteins (11) 10%
Cytoplasmic proteins (64) 56%
Outer membrane proteins (13) 11%
Extracellular proteins (1) 1%
Cytoplasmic membrane proteins (6) 5%


Y. enterocolitica O:9
Unknown proteins (5) 6%
Periplasmic proteins (5) 6%
Cytoplasmic proteins (39) 48%
Outer membrane proteins (22) 27%
Cytoplasmic membrane proteins (11) 13%

Risultati: BLASTP

- Di tutte le proteine identificate per *B. suis*, più del **50%** sono risultate comuni con *Y. enterocolitica*
- Solo **10** delle proteine identificate nei due ceppi di *B. suis* sono descritte in letteratura come immunogene (*B. abortus*, *B. melitensis*)
- 7 proteine immunogene sono risultate comuni alle due *B. suis*, tuttavia 4 di queste sono risultate comuni anche alla *Yersinia*

Quindi……

Risultati: 3 potenziali target diagnostici

- **3** potenziali target antigenici:
  - ***omp25 gene product***
  - ***omp28 gene product***
  - ***groES gene product***

- Queste proteine possono essere considerate possibili target diagnostici specifici per *Brucella* in quanto comuni alle due *B. suis* ma non a *Y. enterocolitica*

Risultati: 3 potenziali target diagnostici

Di queste 3 proteine:

- la **omp28** anche nota come Bp 26 è descritta come presente in *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* e *B. canis* ma non in *Y. enterocolitica* come confermato nel presente studio (Rossetti *et al*., 1996)
- Per quanto riguarda le altre 2 proteine, la **omp25** e la **chaperonin / groES**, la loro immunogenicità è già stata descritta in letteratura per altre Brucelle diverse da *B. suis* (Cloeckaert *et al*., 2002; Martin-Martin *et al*., 2009; Al Dahouk *et al*., 2006)

Conclusioni

- Lo studio condotto ha fornito importanti informazioni sulla caratterizzazione delle proteine di membrana (e citoplasmatiche) di *B. suis* e del suo cross-reattivo *Y. enterocolitica*, individuando tre potenziali target immunogeni da considerare per lo sviluppo di nuovi test diagnostici

Attività future

- Produzione di antigeni ricombinanti e valutazione della loro immunogenicità nella specie suina per impiego in test diagnostici

- Ulteriori analisi di altri target proteici non di membrana

Ringraziamenti

- **Ministero della Salute**

- **Personale IZSAM coinvolto nelle attività di ricerca**

- **Moredun Institute**
  - Dr. John March
  - Dr. David Smith