IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Analisi della risposta anticorpale in corso di PPCB per l'identificazione di target diagnostici – IZSAM 01/09 RC

M. Scacchia, A. Pini, I. Krasteva, M. Luciani, T. Di Febo, G. Muuka, F. Sacchini*

Convegno «I risultati della ricerca IZSAM 2012» - CIFIV

Teramo, 23 maggio 2013

Background

- <u>Test sierologici per PPCB</u> (**FdC**; **c-ELISA**; **Immunoblotting**)
  - **Pro:** Fdc e c-ELISA impiegati per gli screeining di massa, **Immunoblotting** test molto specifico: conferma di casi dubbi
  - **Contro:**
    - Poco sensibili in animali infetti negli stadi iniziali di infezioni (incubazione fino a 6 mesi) e animali con infezione cronica.
    - Il loro impiego è raccomandato a livello di mandria ma non per la diagnosi sul singolo animale (Test and slaughter dell'intera mandria)
    - Impiegano antigene in toto e si possono verificare cross-reattività (falsi positivi) con altri micoplasmi del Mycoplasma mycoides cluster

Obiettivi

- Analizzare lo spettro degli antigeni proteici di membrana immunodominanti del *Mmm*SC riconosciuti dagli isotipi anticorpali (IgG1, IgG2 e IgA) nei diversi stadi evolutivi della malattia per identificare marker precoci di infezione

- Identificare le proteine che compongono le 5 bande antigeniche specifiche del test immunoblotting (110, 98, 95, 62/60 and 48 kDa) riconosciute dalle IgG degli animali infetti

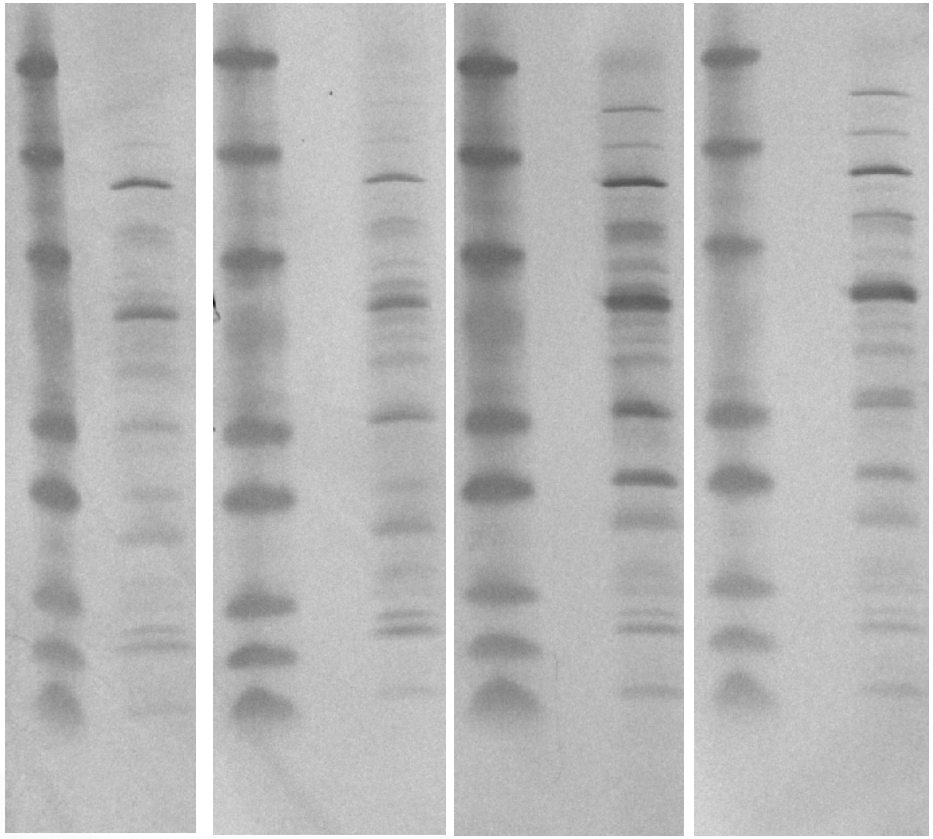
Materiali e metodi – studio 1

- Per la ricerca di marker precoci di infezione sono stati impiegati sieri provenienti da un precedente studio sperimentale condotto in Namibia (Scacchia *et al*., 2007). Nello studio un gruppo di 10 animali (controlli) è stato esposto a contatto diretto con degli animali, precedentemente infettati per via endotracheale con il ceppo *Mmm*SC Caprivi.
- Possibilità di conoscere esattamente il tempo intercorso tra l'esposizione, l'insorgenza della sintomatologia clinica e la sieroconversione

Materiali e metodi- studio 1

- La risposta umorale è stata analizzata mediante metodica western blotting (IgG1, IgG2 e IgA) testando i sieri di 10 animali «infettati naturalmente» in 4 diversi stadi evolutivi dell'infezione
- La metodica western blotting è stata allestita impiegando come antigene le proteine di membrana purificate con Triton X-114 del *Mmm*SC ceppo Caprivi
- I risultati delle analisi in western blotting sono stati confrontati con quelli precedentemente ottenuti con altre metodiche di laboratorio quali la FdC e la c-ELISA

Risultati: IgA



kDa

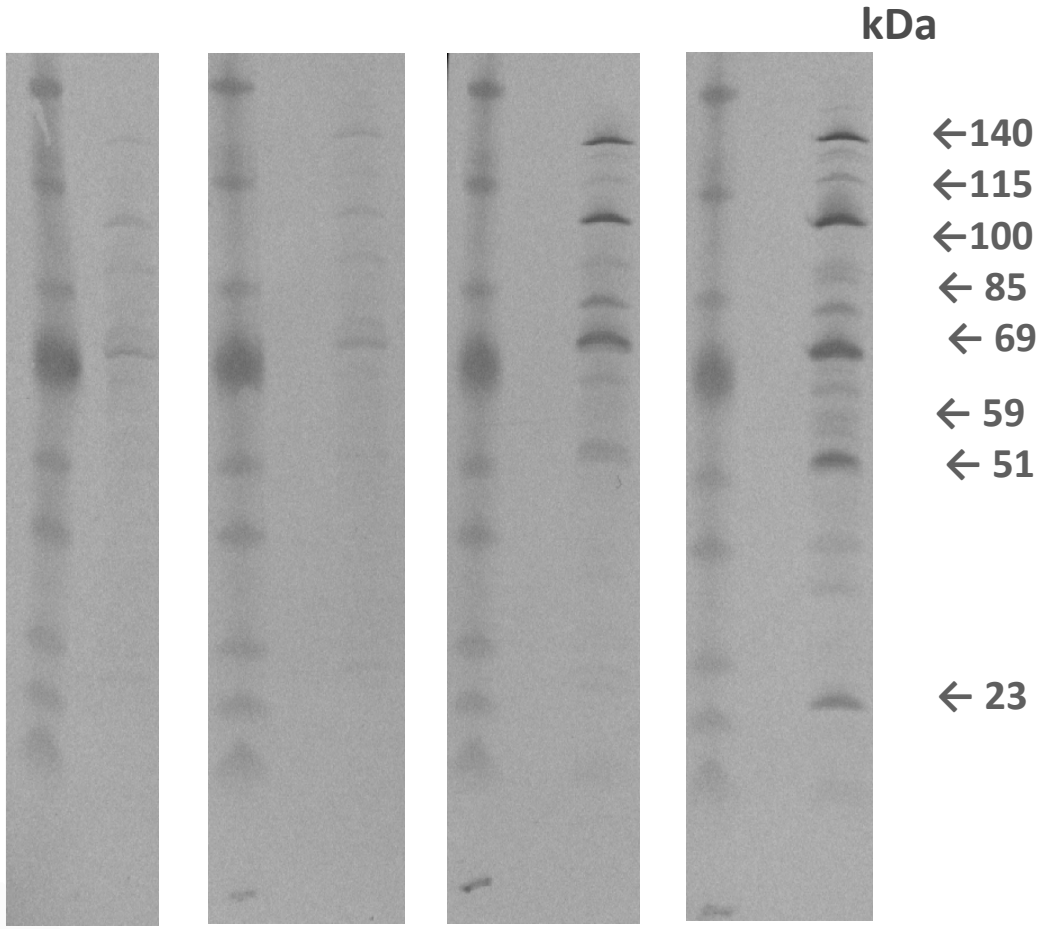
←140
←115
←100
← 85
← 69
← 59
← 51

← 23

D.P.E.	28	42	49	56
FDC	neg.ve	neg.ve	1:640	1:640+++
c-ELISA	neg.ve	neg.ve	+ve	+ve

Inizio sintomatologia clinica

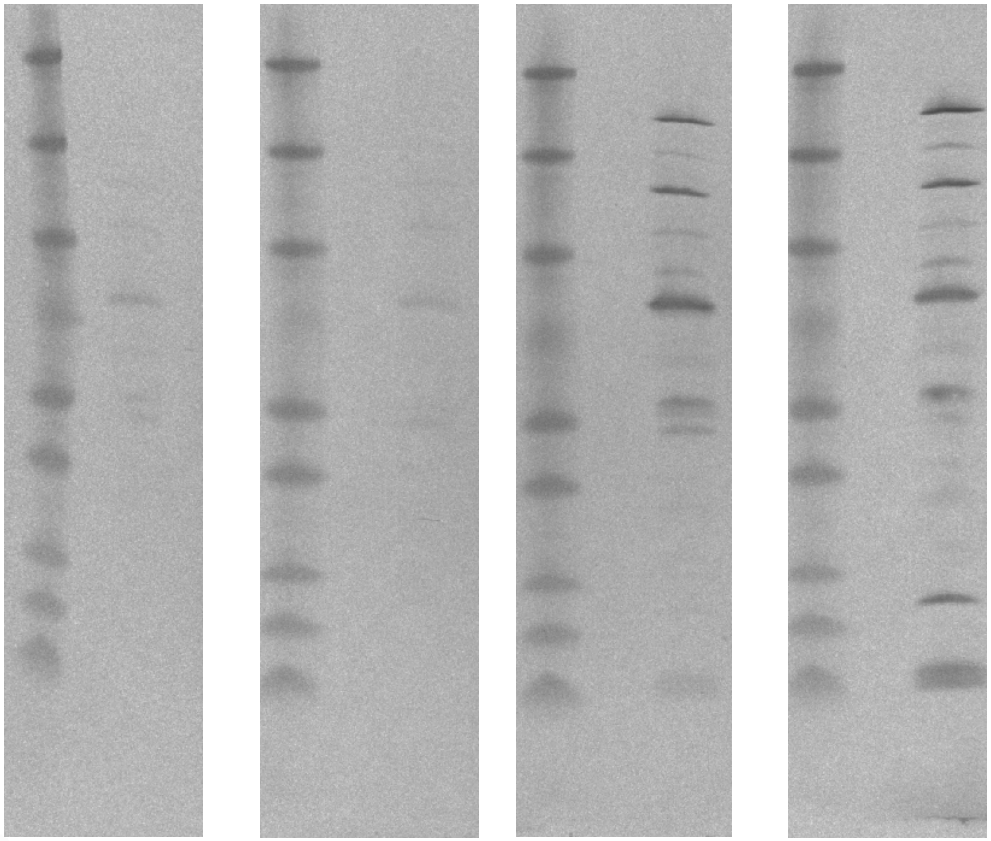
Risultati: IgG1



D.P.E.	28	42	49	56
FDC	neg.ve	neg.ve	1:640	1:640+++
c-ELISA	neg.ve	neg.ve	+ve	+ve

Inizio sintomatologia clinica

Risultati: IgG2



D.P.E.	28	42	49	56
FDC	neg.ve	neg.ve	1:640	1:640+++
c-ELISA	neg.ve	neg.ve	+ve	+ve

Inizio sintomatologia clinica

Risultati sintesi – studio 1

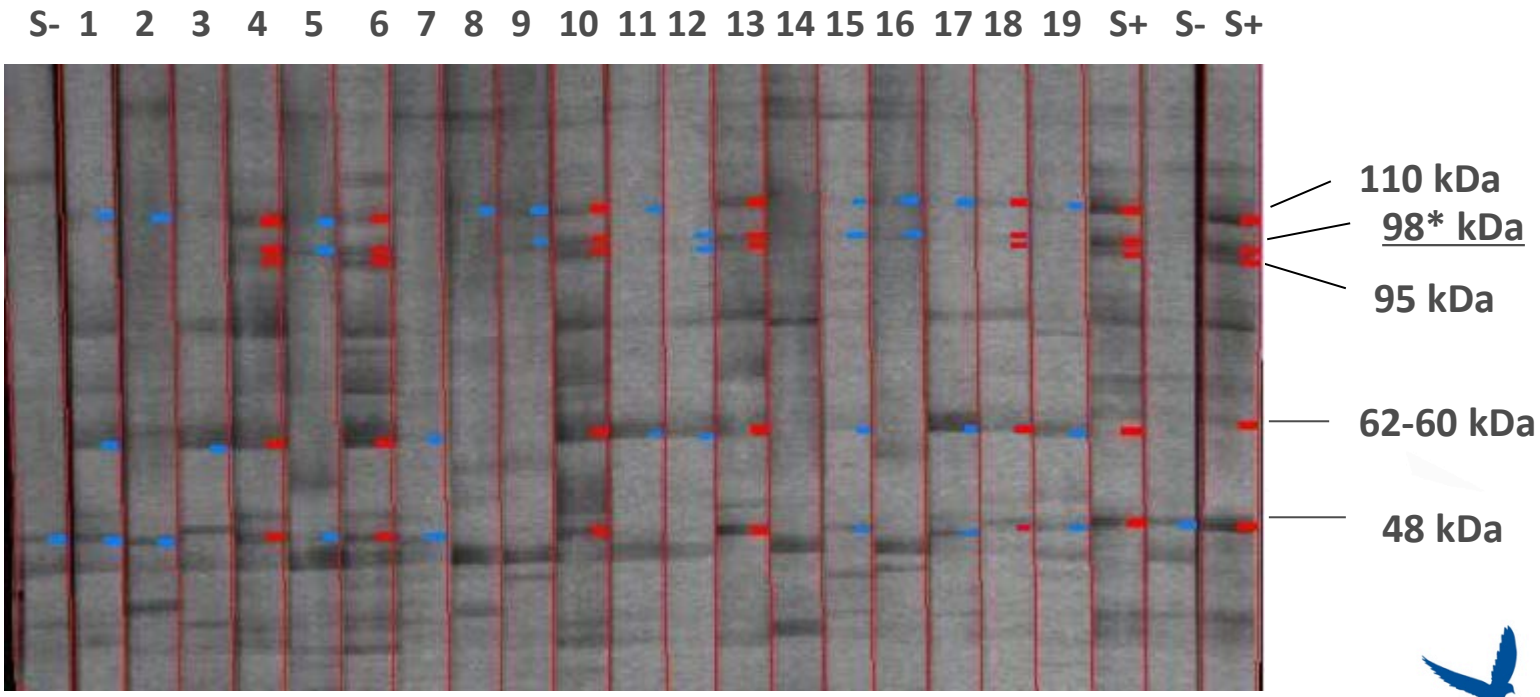
- La analisi in WB hanno individuato 8 principali bande immunoreattive riconosciute dagli animali infetti ma nessun marker precoce di infezione, rispetto alle metodiche FdC e c-ELISA.

- Le 8 bande sono state analizzate con LC-ESI-MS/MS e sono state identificate 37 proteine (11 di queste espresse come antigeni ricombinanti)

Caratterizzazione 5 bande specifiche immunoblotting PPCB – studio 2

IWB +VE

IWB -VE



- Analisi LC-ESI-MS/MS delle **5 bande specifiche** riconosciute dalle IgG di animali infetti (OIE)
- **Identificate 35 proteine** (7 proteine espresse come ant.ric.)

Risultati

110 kDa

- MSC_0089
- MSC_0160
- MSC_0253
- MSC_0263
- MSC_0266
- MSC_0476
- MSC_0500
- MSC_0532
- MSC_0679
- MSC_0830
- MSC_0855
- MSC_0860

98 kDa

- MSC_0139
- MSC_0160
- MSC_0253
- MSC_0256
- MSC_0263
- MSC_0265
- MSC_0266
- MSC_0303
- MSC_0454
- MSC_0532
- MSC_0544
- MSC_0625
- MSC_0627
- MSC_0679
- MSC_0855
- MSC_0860

95 kDa

- MSC_0007
- MSC_0139
- MSC_0160
- MSC_0253
- MSC_0256
- MSC_0263
- MSC_0265
- MSC_0266
- MSC_0352
- MSC_0532
- MSC_0538
- MSC_0625
- MSC_0679
- MSC_0830
- MSC_0860

Risultati

62-60 kDa

- MSC_0011
- MSC_0160
- MSC_0237
- MSC_0253
- MSC_0256
- MSC_0263
- MSC_0266
- MSC_0273
- MSC_0300
- MSC_0519
- MSC_0532
- MSC_0610
- MSC_0679
- MSC_0860

48 kDa

- MSC_0066
- MSC_0160
- MSC_0253
- MSC_0263
- MSC_0505
- MSC_0509
- MSC_0544
- MSC_0554
- MSC_0588
- MSC_0830
- MSC_0850
- MSC_1019

Conclusioni

- L'analisi delle IgA, IgG1 o IgG2 in immunoblotting, impiegando le proteine di membrana purificate del *Mmm*SC, pur identificando 8 principali bande immunoreattive, non hanno evidenziato la presenza di marker precoci di infezione, rispetto a c-ELISA e FDC.
- Le 5 bande specifiche del metodo immunoblotting riconosciute dalle IgG di animali infetti si compongono di 35 proteine, alcune delle quali sono presenti in più bande. E' ora necessario determinare quali di queste sono immunoreattive.

Attività future

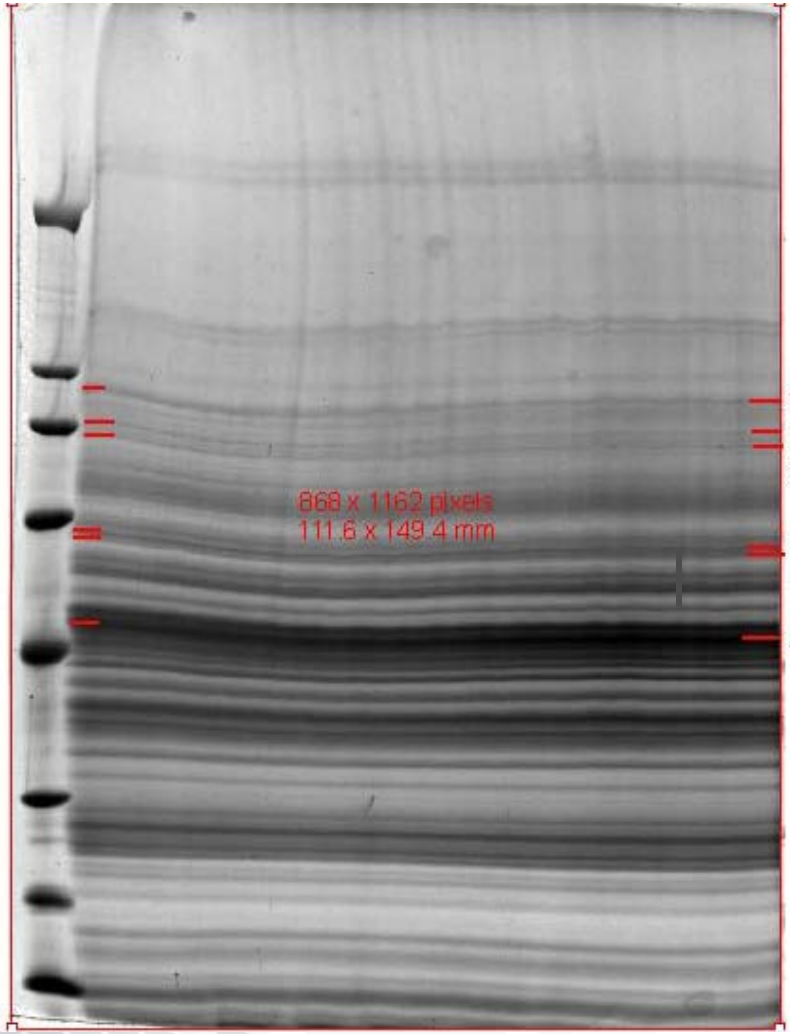
- Condurre ulteriori ricerche mirate all'identificazione di marker precoci di infezione rilevabili mediante metodiche indirette o sviluppo di metodi diretti applicabili su animali in vita.

- Standardizzazione della metodica immunoblotting mediante impiego di antigeni ricombinanti.

Ringraziamenti

- **Ministero della Salute**
- **Moredun Institute**
  - Dr. John March
  - Dr. David Smith
- **Personale IZSAM coinvolto nelle attività PPCB**
- **CVRI**
  - Dr. Geoffrey Muuka

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

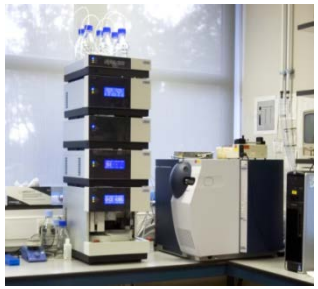
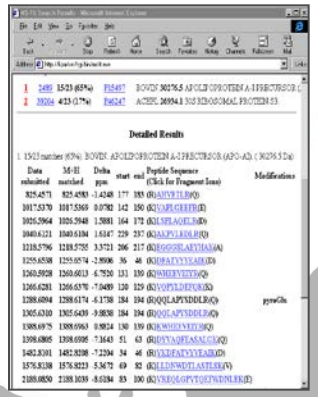


kDa

110
98
95
60-62

48

reduction
alkylation
trypsinolysis



LC-ESI-MS/MS