IZSAM G.CAPORALE TERAMO

PROGETTO DI RICERCA:

Studio dei determinanti di virulenza e sviluppo di una strategia DIVA per il controllo dei virus della malattia emorragica del cervo

SVILUPPO DI UN ELISA COMPETITIVA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DELLA MALATTIA EMORRAGICA DEL CERVO

FEDERICA PIZZURRO *REPARTO DI VIROLOGIA E COLTURE CELLULARI*

LA MALATTIA EMORRAGICA DEL CERVO

- ✓ MALATTIA INFETTIVA NON CONTAGIOSA
- ✓ ARBOVIROSI → *Culicoides spp.*
- ✓ Famiglia *Reoviridae* → genere *Orbivirus*

- ✓ Conosciuta a partire dal 1955 in America (New Jersey e Michigan, USA)
- ✓ Dal 2006 nel bacino del Mediterraneo nel bovino

- ✓ Inserita nella lista OIE – dal 2008
- ✓ Possibile introduzione in Europa

→ PRESENZA DEL VETTORE competente

LA MALATTIA EMORRAGICA DEL CERVO

DIAGNOSI

DIAGNOSI CLINICA NON ATTENDIBILE

- ✓ Isolamento virale (**KC e Vero cells**)
  - SANGUE CON EDTA
  - ORGANI (MILZA, LINFONODI)

- ✓ Rilevamento genoma virale
  - Real-Time RT-PCR sul segmento 10 → EHDV-BT
  - Real-Time RT-PCR sul segmento 2 → SIEROTIPI

- ✓ Rilevamento anticorpi (**10-14 day p.i.**)
  - Siero-neutralizzazione
  - ELISA competitiva

SCOPO DEL PROGETTO

- **ELISA competitiva «*Home-made*»**
- **Generazione Virus Like Particles (VLPs)**

FASI DI SVILUPPO DELLA C-ELISA

✓ Capside a doppio strato composto da 4 proteine strutturali

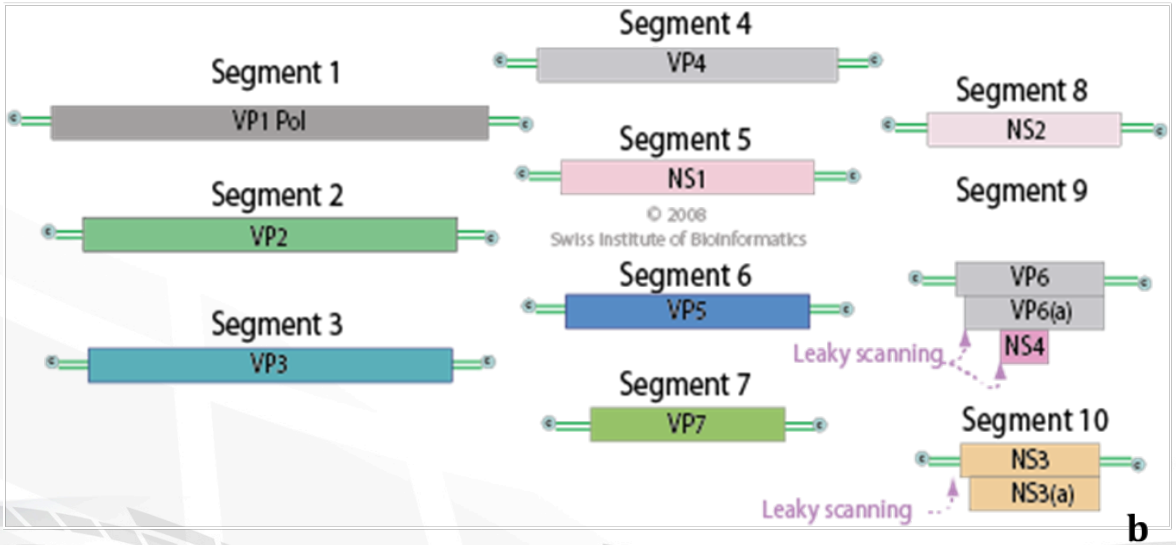
→ capside interno VP3 e VP7
→ capside esterno VP2 e VP5

VP7

✓ Altamente conservata tra i sierotipi

(identità aminoacidica 98-99%)

✓ Antigenicamente specifica tra gli *Orbivirus*



b

FASI DI SVILUPPO DELLA C-ELISA

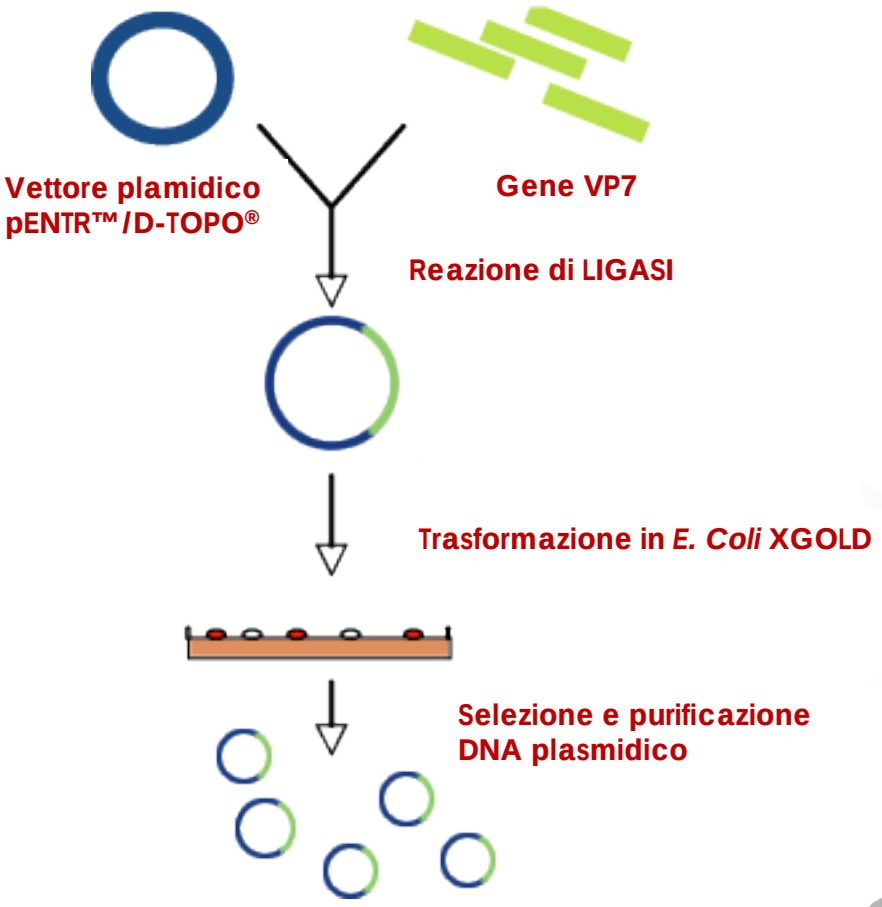
CLONAGGIO PROTEINA VIRALE VP7

GENERAZIONE DEL BACULOVIRUS RICOMBINANTE

SVILUPPO c-ELISA "*HOME-MADE*"

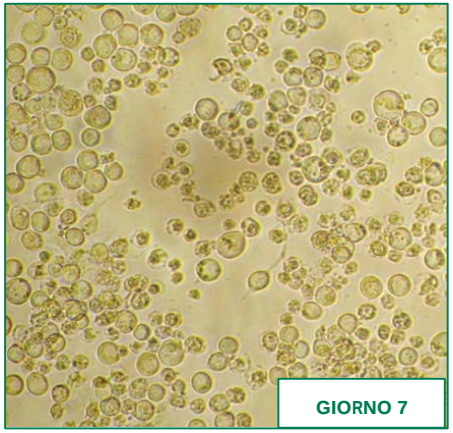
CLONAGGIO PROTEINA VIRALE VP7

1. Retro-trascrizione ed amplificazione del dsRNA virale di **EHDV-6**
2. Reazione di ligasi in vettore
3. Trasformazione delle cellule batteriche competenti (*E.coli* XL 10 GOLD)
4. Identificazione dei ricombinanti batterici
5. Sequenziamento del DNA plasmidico



GENERAZIONE DEL BACULOVIRUS RICOMBINANTE

1. Reazione di ricombinazione
2. Trasfezione
3. Amplificazione stock virale e titolazione

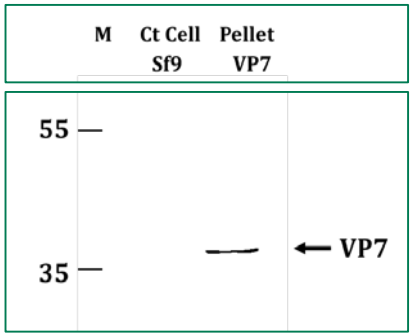


TRASFEZIONE

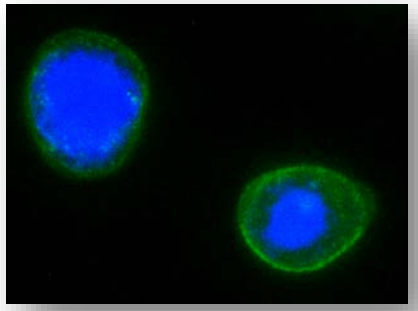
GENERAZIONE DEL BACULOVIRUS RICOMBINANTE

4. Controllo dell'espressione proteica
   - Western Blot
   - Immunofluorescenza

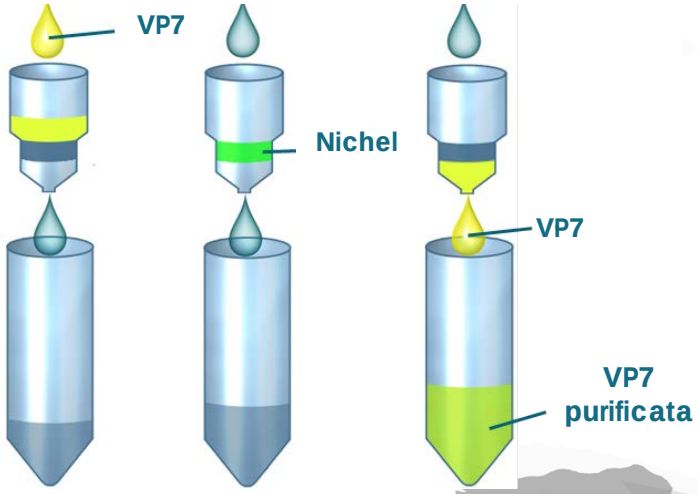
5. Purificazione tramite Cromatografia per affinità



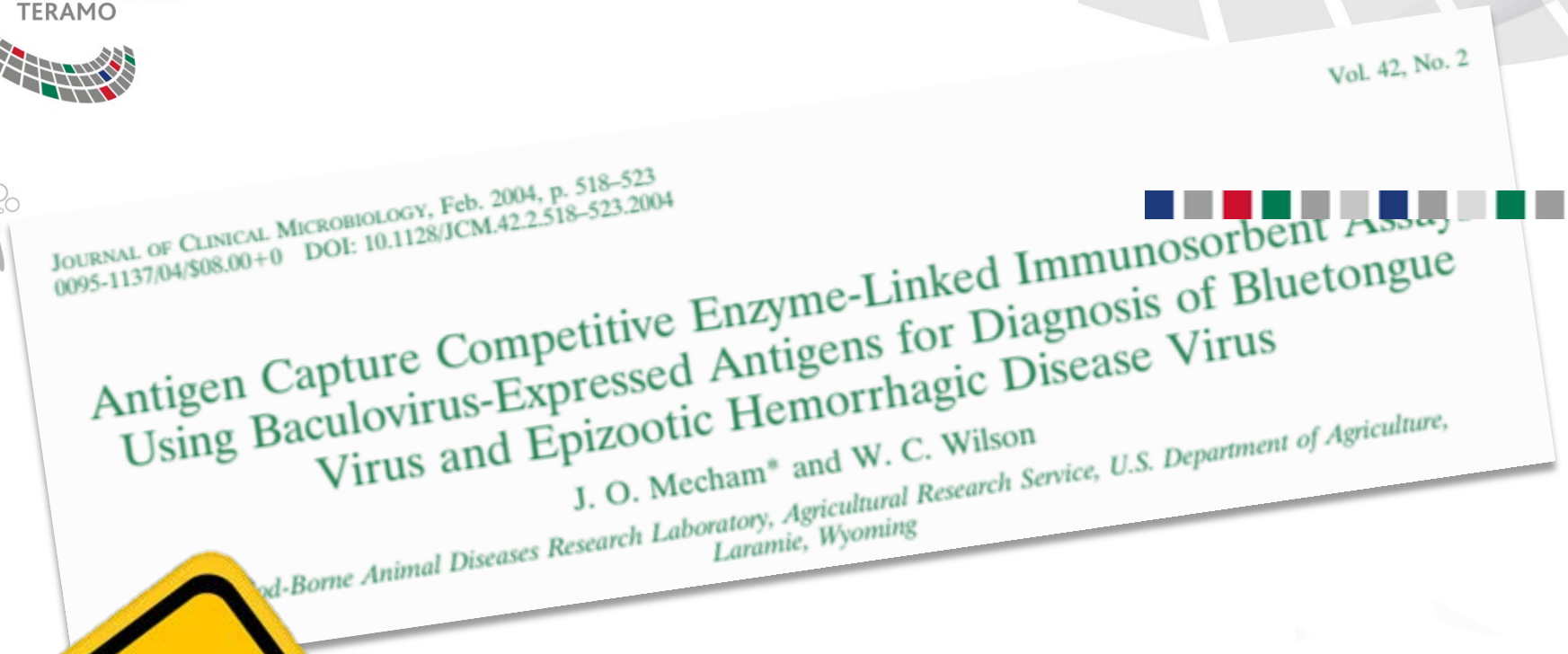
WESTERN BLOT



IFI



IZSAM G.CAPORALE
TERAMO



Vol. 42, No. 2

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2004, p. 518–523
0095-1137/04/$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.42.2.518–523.2004

Antigen Capture Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Baculovirus-Expressed Antigens for Diagnosis of Bluetongue Virus and Epizootic Hemorrhagic Disease Virus

J. O. Mecham* and W. C. Wilson

*Food-Borne Animal Diseases Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Laramie, Wyoming

PROTEINA RICOMBINANTE NON PURIFICATA = PELLET CELLULARE GREZZO INFETTATO CON IL BACULOVIRUS RICOMBINANTE

SVILUPPO C-ELISA "*HOME-MADE*"

- **Ottimizzazione del metodo**

Adsorbimento ANTIGENE	Overnight a TA 25 °C ± 2 °C			Overnight a 4 °C ± 2 °C		1 ora a 37 °C
Incubazione per la saturazione	TA per 30 minuti			TA per 1 ora		TA per 2 ore
Diluizione d'uso dell'anticorpo monoclonale	1:50		1:100	1:500		1:100
Diluizione d'uso dei campioni di siero	TQ	1:2	1:16	1:32	1:64	1:128

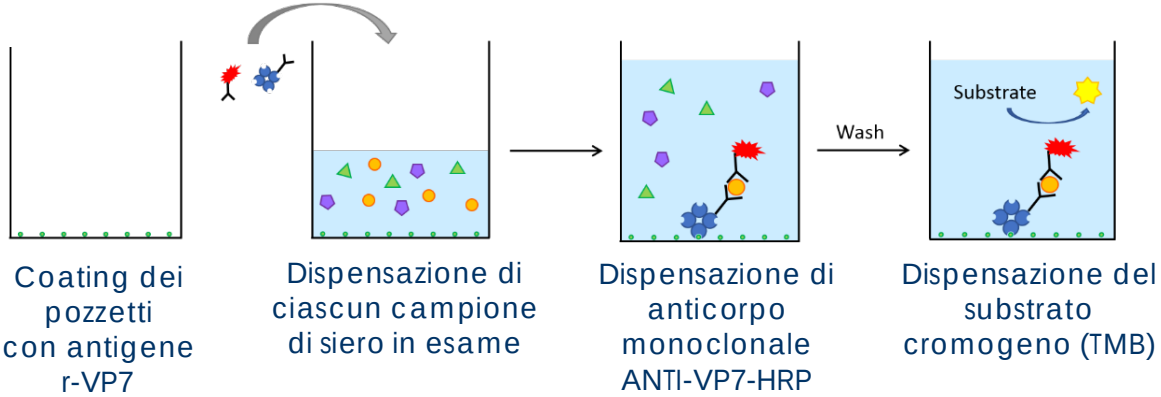
- **Campioni di sieri esaminati**

Totale 275

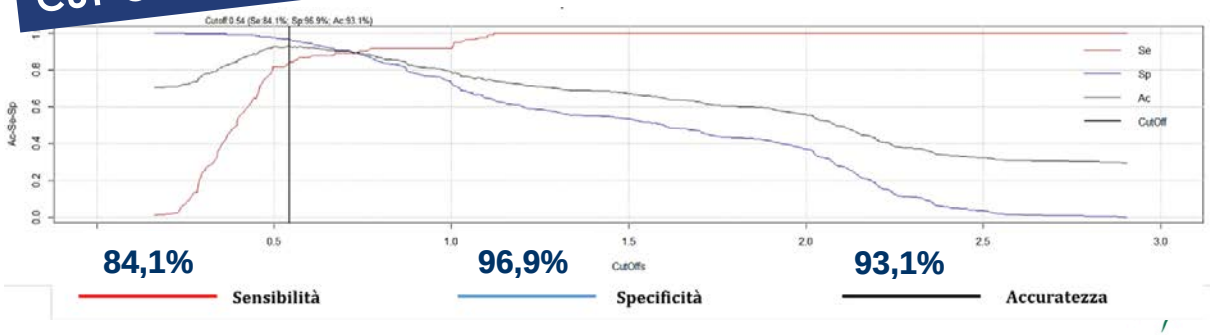
Type of sera	Total number	Origin		Animal species, number	
Positive sera	**82**	74	Field sera	Cattle	15
				Sheep	36
				Impala	22
				Dromedary	1
		8	Positive reference sera	Cattle	
Negative sera	**193**	193	Field sera	Cattle	64
				Sheep	107
				Impala	19
				Dromedary	3

SVILUPPO C-ELISA "*HOME-MADE*"

- **Controllo della cross-reattività (BTV - AHSV)**
- **Calcolo dei parametri diagnostici**
  - **CUT-OFF = valore soglia**
  - **SENBILITÀ = veri positivi/infetti**
  - **SPECIFICITÀ = veri negativi/sani**
  - **ACCURATEZZA = diagnosi corretta**



CUT-OFF = 0,543



CURVA ROC DEL SAGGIO ELISA «HOME-MADE»

SVILUPPO C-ELISA "*HOME-MADE*"

- Calcolo dell'indice di concordanza con ELISA commerciale per EHDV (K Cohen)

1. Riconoscimento dei sierotipi di referenza
2. Campioni discordanti = totale 19

		ELISA commerciale		
		positivi	*Negativi*	**totale**
ELISA "Home-made»	*positivi*	**69**	**6** FP	*75*
	negativi	**13** FN	**187**	*200*
	totale	*82*	*193*	*275*

CONFRONTO TRA ELISA "HOME MADE" ED ELISA COMMERCIA

KAPPA COHEN 0,832

PUNTI DI FORZA vs PUNTI DI DEBOLEZZA

PUNTI DI FORZA

- ✓ Assenza di steps di purificazione
- ✓ Facilità/Rapidità nella produzione dell'antigene ricombinante
- ✓ Assenza di cross-reattività con BTV e AHSV
- ✓ Metodo rapido di screening anticorpale

PUNTI DI DEBOLEZZA

- ✓ Antigene "*GREZZO*"
- ✓ Ottimizzazione dell'espressione dell'antigene ricombinate e sua purificazione
- ✓ Difficoltà nel reperimento dei campioni di siero

RINGRAZIAMENTI

IZS-AM

Reparto di Virologia e Colture Cellulari
- Giovanni Savini
- Alessio Lorusso
- *L'intero reparto*

Reparto di Sierologia
- Manuela Tittarelli
- Tiziana Di Febo

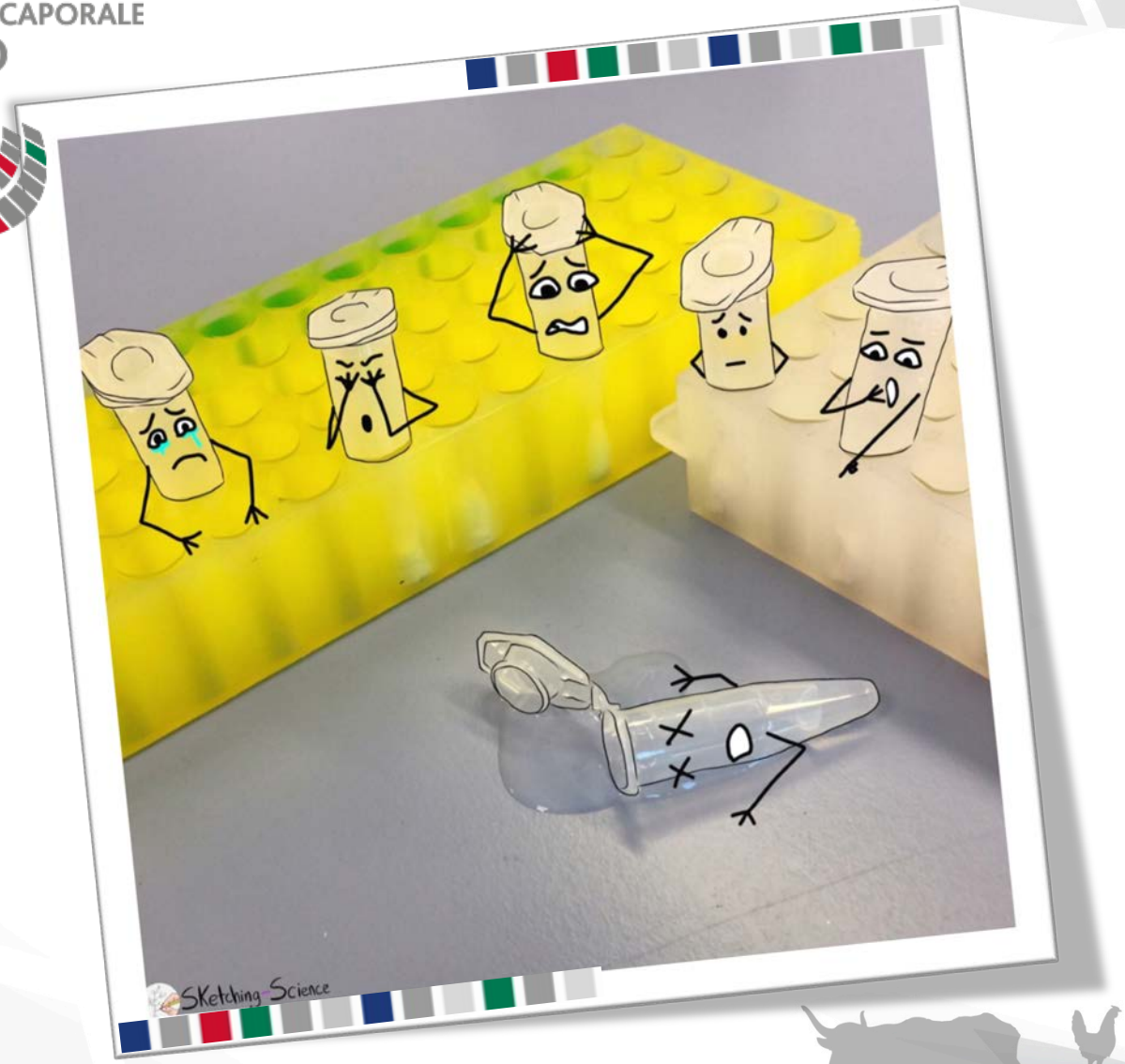
COVEPI-Reparto Statistica
- Annamaria Conte
- Romolo Salini

Università di Pisa – Dipartimento di Scienze Veterinarie
- Francesco Tolari
- Mario Forzan
- Maurizio Mazzei

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna
- Davide Lelli

The Pirbirght Institute
- Peter Mertens

London School of Hygiene and Tropical Medicina, Regno Unito
- Polly Roy

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

GRAZIE PER L'ATTENZIONE