

IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Produzione e purificazione di proteine ricombinanti per prove di fattibilità di un'ELISA indiretta per la diagnosi di Morbo Coitale Maligno (MCM)

Progetto IZSAM 03/18 RC Responsabile Scientifico: Dr.ssa Maria Teresa Mercante

U.O.1

MANUELA TITTARELLI Responsabile dell'U.O.1-Immunologia e Sierologia

[TIZIANA DI FEBO](#)

MIRELLA LUCIANI

IVANKA KRASTEVA

DIAMANTE RODOMONTI

U.O.2

MARIA TERESA MERCANTE Responsabile dell'U.O.2 -Produzione Vaccini Virali e Presidi Diagnostici

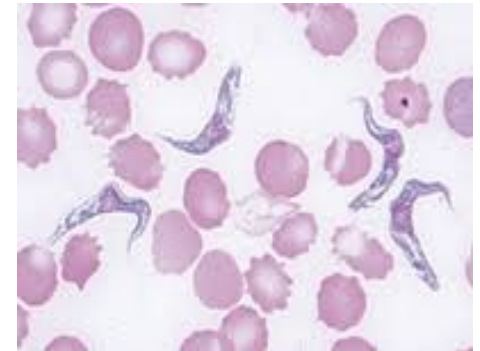
[SIMONETTA ULISSE](#)

GISELLA ARMILLOTTA

CATERINA LAGUARDIA

Morbo Coitale Maligno (Dourine)

- Malattia contagiosa degli equidi a trasmissione sessuale il cui agente eziologico è un protozoo flagellato *Trypanosoma equiperdum*
- Mortalità media del 50%
- Malattia endemica in Africa, Russia, Sud America, parte Medio Oriente e Sud-est Europa (2011-2012 focolai di MCM in Sicilia, Campania e Puglia)
- Diagnosi:
- Isolamento
- PCR/Real Time PCR
- Test sierologici: FdC (test prescritto dall'OIE per il commercio internazionale) IF, ELISA, immunoblotting
- Tutti questi metodi sierologici utilizzano l'antigene *Trypanosoma equiperdum* intero prodotto *in vivo* mediante infezione sperimentale nei ratti.





Obiettivo del progetto

- ❖ Sviluppare un test immunoenzimatico per la diagnosi di morbo coitale maligno mediante l'utilizzo di una proteina ricombinante in sostituzione dell'antigene *T. equiperdum* intero prodotto *in vivo* sui ratti
- ❖ 3R – Replace, Reduce, Refine: sostituire, ridurre e affinare la sperimentazione animale
- ❖ Studi precedenti (Luciani *et al*, 2013; Luciani *et al*, 2018) hanno evidenziato 167 proteine di *T. equiperdum*; 24 di queste, analizzate con software bioinformatici, sono risultate uniche per *T. equiperdum* (Tiziana Di Febo parte 2)
- ❖ Tre proteine (delle 24) sono state scelte per essere prodotte come ricombinanti perchè potenzialmente immunogene :
 1. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (UniProt accession number: A0A1G4I8N3),
 2. GrpE protein homolog (UniProt accession number: A0A1G4I464),
 3. Transport protein particle (TRAPP) component, putative (UniProt accession number: A0A1G4I740)

Produzione su piccola scala delle proteine ricombinanti

FASE PRELIMINARE (ditta GenScript)

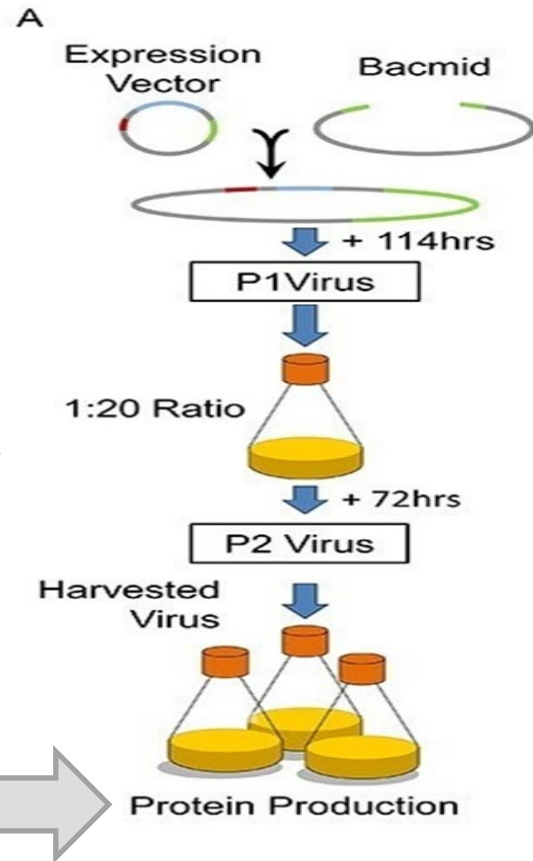
- ❖ Le sequenze di DNA target delle 3 proteine (I8N3 , I464 e I740) sono state fornite alla ditta GenScript per essere ingegnerizzate.
- ❖ I8N3 e I464 sono state prodotte in cellule di insetto (Sf9) mediante il sistema di espressione con baculovirus
- ❖ I740 invece è stata prodotta in *E.coli* (la resa ottenuta con il sistema baculovirus non è risultata soddisfacente)

Alla luce di questi risultati preliminari le fasi successive dell'U.O.2 si sono focalizzate sulla produzione su larga scala solo delle 2 proteine prodotte in baculovirus (I8N3 e I464)



Produzione su larga scala delle proteine ricombinanti

FASE 1: PRODUZIONE STOCK VIRALE P₃



Amplificazione dello stock virale P₂ (GenScript per I8N3 e I464) per ottenere lo stock virale P₃ da utilizzare nelle fasi successive di produzione.

100 mL di sospensione cellulare di cellule di insetto linea Sf9 (ECACC 05011001) sono state infettate con il P₂ di ciascuna proteina (I8N3 e I464) alla Molteplicità di Infezione (MOI) di 0.1

Le due sospensioni sono state incubate alla temperatura di 27±1°C in agitatore termorefrigerato alla velocità di 110 rpm.

Le due sospensioni sono state raccolte a 72 ore post infezione e centrifugate a 3000 g per 10'

I due P₃ prodotti sono stati titolati, utilizzando il metodo della diluizione limite utilizzando le cellule insetto Sf9ET (Easy Titer)

Produzione su larga scala delle proteine ricombinanti

FASE 2: OTTIMIZZAZIONE PARAMETRI – MOI, TOI, TOH

- la Molteplicità di infezione (MOI)

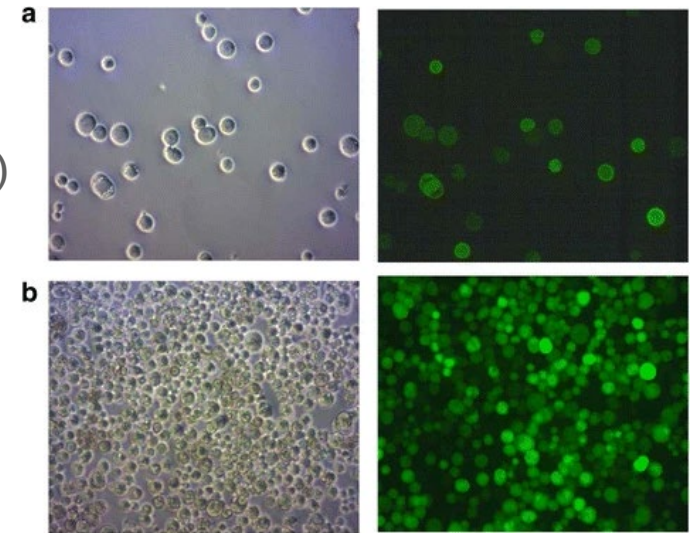
0,1 MOI e 0,01 MOI

- Il tempo dell'infezione cioè la densità cellulare (TOI)

$3,5 \times 10^6$ cellule/mL

- Il tempo di raccolta (TOH)

48 h, 72h e 96 h post infezione



Produzione su larga scala delle proteine ricombinanti

FASE 3: PRODUZIONE E PURIFICAZIONE



Volume 1500 mL Sf9
 $3,5 \times 10^6$ cellule/mL (TOI)
 infettate con P3 0.01 MOI
 $27^\circ\text{C} \pm 0,2$ - 110 rpm
 raccolte a 72h p.i. (TOH)



I8N3



I464



Le sospensioni cellulari sono state centrifugate a 3000 g per 10'
 I surnatanti sono stati purificati mediante colonna cromatografica di affinità (IMAC).
 Le proteine purificate sono state risospese in PBS 1X + 0,05% di Sarkosyl.
 Il grado di purezza delle proteine ricombinanti purificate è stato saggiato in SDS-PAGE

SDS-PAGE di I8N3 e I464 purificate

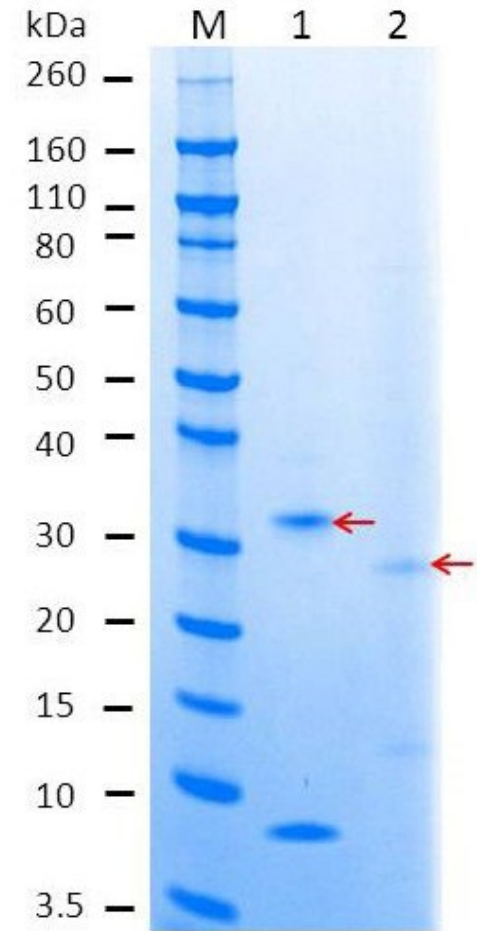
lane M: standard di peso molecolare

lane 1: proteina ricombinante I8N3

~34,5 kDa – 6,6 mL-6,6 mg/mL- purezza ~67%

lane 2: proteina ricombinante I464

~24,7 kDa – 6,8 mL-6,8 mg/mL- purezza ~55%



Confidential and Privileged



SDS-PAGE & Western blot Analysis:

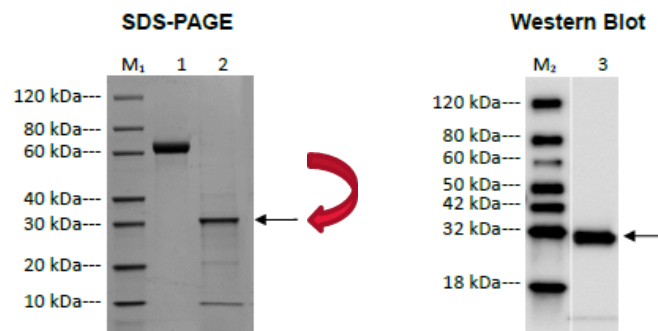


Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of A0A1G4I8N3

Lane M₁: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00516

Lane M₂: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00521

Lane 1: BSA (2.00 µg)

Lane 2: A0A1G4I8N3 (Reducing condition, 2.00 µg)

Lane 3: A0A1G4I8N3 (Reducing condition)

Primary antibody: Mouse-anti-His mAb (GenScript, Cat.No. A00186)

Confidential and Privileged



Packing List of U119CEC120-5

Protein (Shipping Condition: -80°C Dry Ice, Store at -80°C)

Protein name: A0A1G4I8N3

Fused with: His tag

Concentration: 0.25 mg/ml

Purity: ~70%

Buffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8.0

Lot: U119CEC120-5/P4ED001

Total: 1.50 mg. 1.00 ml/tube, 6 tubes

Confidential and Privileged



SDS-PAGE & Western blot Analysis:

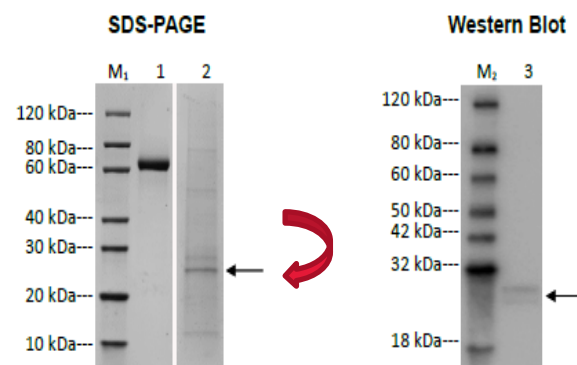


Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of A0A1G4I464

Lane M₁: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00516

Lane M₂: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00521

Lane 1: BSA (2.00 µg)

Lane 2: A0A1G4I464 (Reducing condition, 2.00 µg)

Lane 3: A0A1G4I464 (Reducing condition)

Primary antibody: Mouse-anti-His mAb (GenScript, Cat.No. A00186)

Confidential and Privileged



Packing List of U119CEC120-15

Protein (Shipping Condition: -80°C Dry Ice, Store at -80°C)

Protein name: A0A1G4I464

Fused with: His tag

Concentration: 0.20 mg/ml

Purity: ~55%

Buffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5% Glycerol, pH 8.0

Lot: U119CEC120-15/P4ED001

Total: 1.40 mg. 1.00 ml/tube, 7 tubes

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

FINE PRIMA PARTE

Grazie per l'attenzione

Simonetta Ulisse

IZS

T E R A M O

/

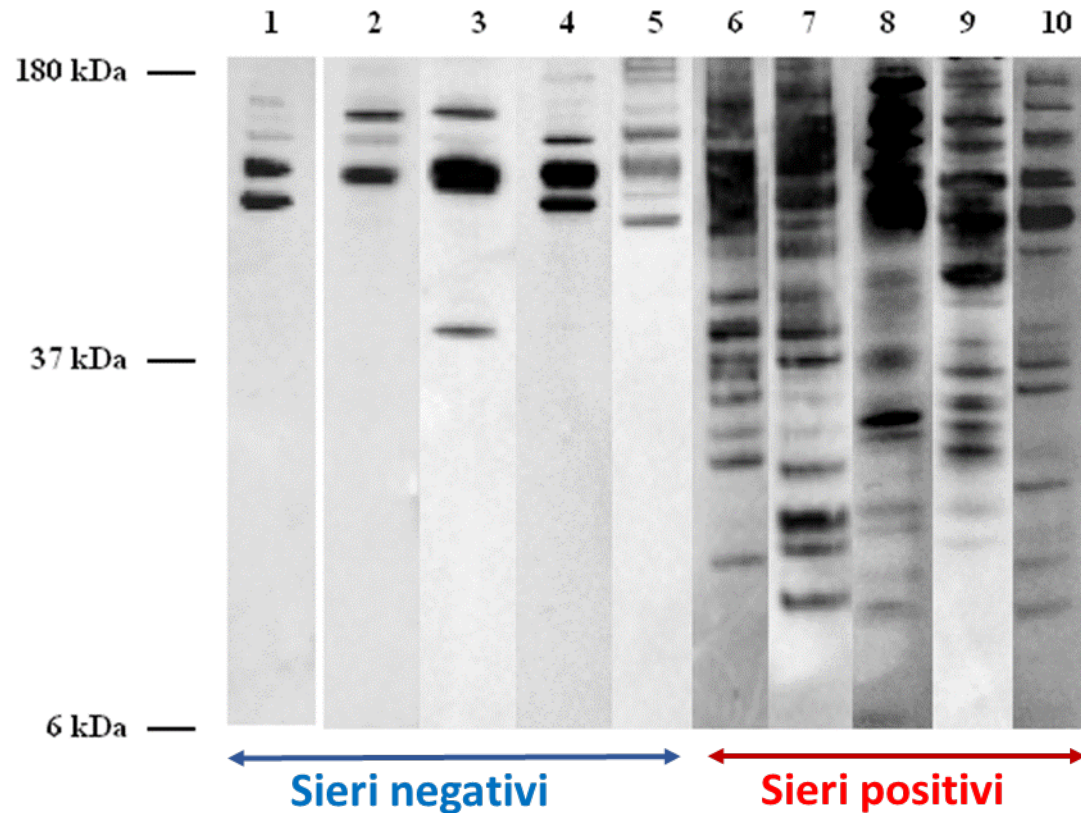
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

SECONDA PARTE

Tiziana Di Febo

Immunoblotting per MCM

IZS TE B2.1.6 SOP 061



Metodo di conferma in caso di:

- risultati dubbi ottenuti in FdC e IFI
- sieri anticomplementari in FdC

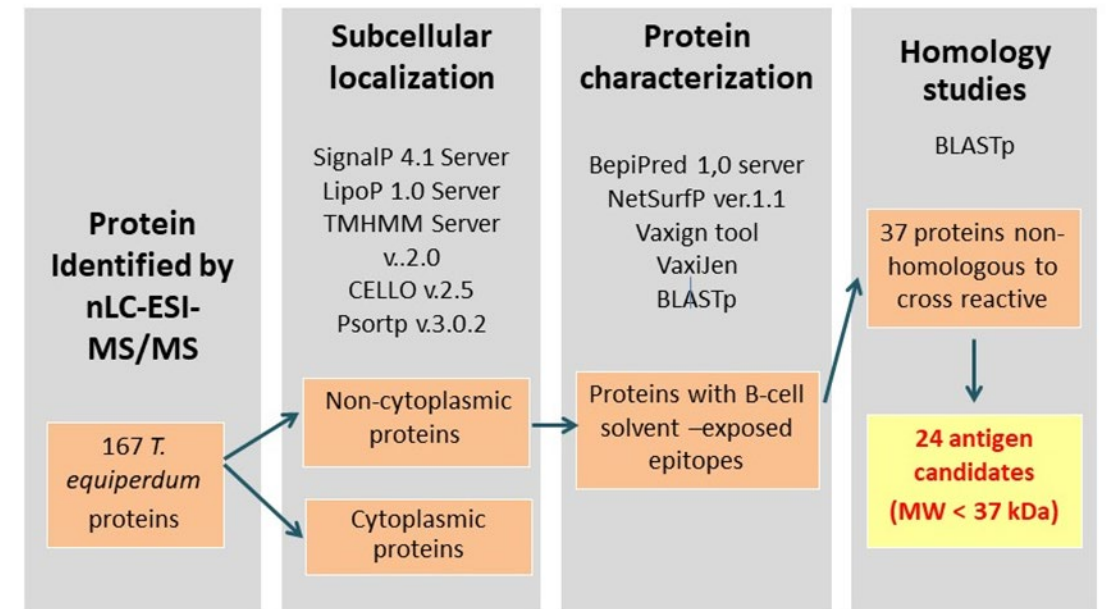
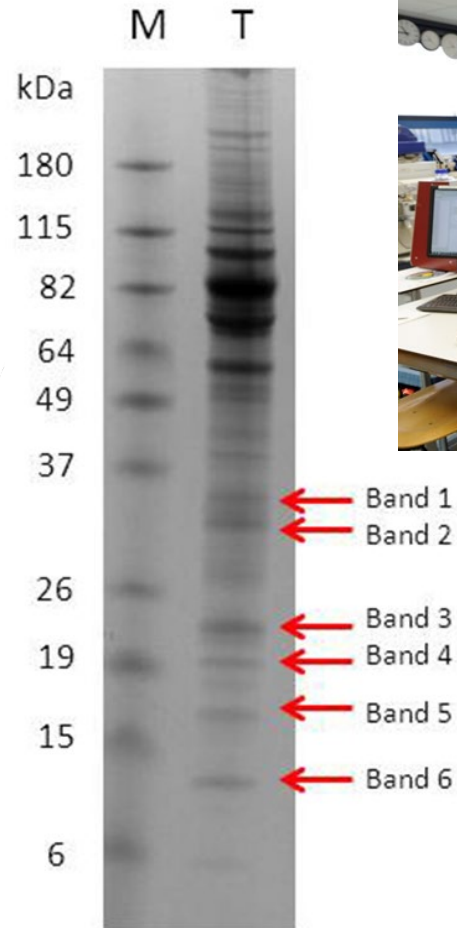
Antigene intero prodotto nei ratti!



Luciani M., Di Pancrazio C., Di Febo T., Tittarelli M., Podaliri Vulpiani M., Puglielli M.O., Naessens J., Sacchini F., 2013. IgG antibodies from dourine infected horses identify a distinctive *Trypanosoma equiperdum* antigenic pattern of low molecular weight molecules. Vet. Immunol. Immunopathol., 151: 140-146.

Identificazione di proteine immunogene mediante spettrometria di massa e analisi bioinformatica

Luciani, M., et al. 2018. *Trypanosoma equiperdum* low molecular weight proteins as candidates for specific serological diagnosis of dourine. *Front. Vet. Sci.* 5, 1-6.



Sviluppo ELISA indiretta e immunoblotting

3 proteine candidate utilizzate per l'attivazione delle micropiastre:

- A0A1G4I8N3
- A0A1G4I464
- A0A1G4I740 (solo prove preliminari con proteina prodotta su piccola scala (GenScript))

Pannello di sieri equini costituito da:

- Sieri di riferimento positivi e negativi per MCM
- 72 sieri negativi per MCM (allevamenti italiani)
- 15 sieri positivi provenienti da focolai italiani (anno 2013) e africani (Namibia) di MCM (infezione naturale)
- 6 sieri positivi per patogeni cross-reattivi (*Theileria equi* e *Babesia caballi*)

i-ELISA: determinazione cut-off, sensibilità e specificità diagnostiche mediante curve ROC (Receiver Operating Characteristic)

Immunoblotting: determinazione sensibilità e specificità diagnostiche mediante tabelle a doppia entrata (Manuale OIE)

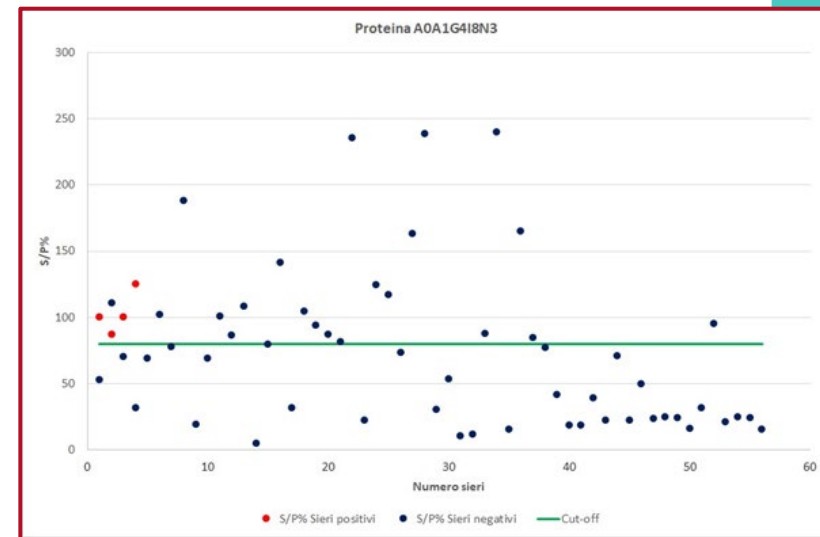
Sviluppo ELISA indiretta

• Proteina A0A1G4I8N3 (cut-off 50%)

	%	L.C.I. (95%)*	L.C.S. (95%)§
Sensibilità diagnostica	86.7	53.7	96.0
Specificità diagnostica	53.8	42.9	64.3
Accuratezza diagnostica	59.0	48.9	68.3

*Limite di confidenza superiore (probabilità del 95%)

§Limite di confidenza inferiore (probabilità del 95%)

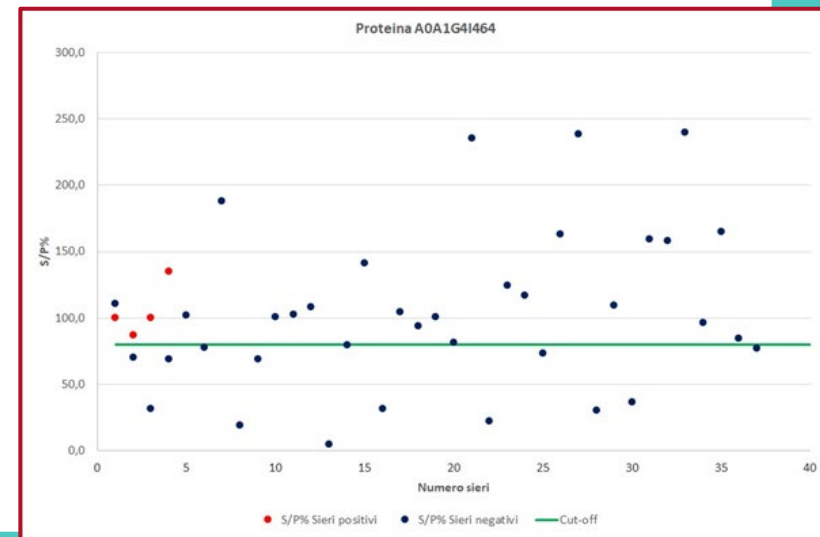


• Proteina A0A1G4I464 (cut-off 80%)

	%	L.C.I. (95%)*	L.C.S. (95%)§
Sensibilità diagnostica	53.3	23.6	75.3
Specificità diagnostica	58.7	47.8	68.9
Accuratezza diagnostica	57.9	47.8	67.3

*Limite di confidenza superiore (probabilità del 95%)

§Limite di confidenza inferiore (probabilità del 95%)



Sviluppo immunoblotting

- Proteina A0A1G4I8N3**

	%	L.C.I. (95%)*	L.C.S. (95%)§
Sensibilità diagnostica	86.7	61.7	96.0
Specificità diagnostica	92.5	84.6	96.5
Accuratezza diagnostica	91.6	84.2	95.6
*Limite di confidenza superiore (probabilità del 95%)			
§Limite di confidenza inferiore (probabilità del 95%)			

- Proteina A0A1G4I464**

	%	L.C.I. (95%)*	L.C.S. (95%)§
Sensibilità diagnostica	46.7	24.7	70.1
Specificità diagnostica	81.3	71.3	88.3
Accuratezza diagnostica	75.8	66.3	83.3
*Limite di confidenza superiore (probabilità del 95%)			
§Limite di confidenza inferiore (probabilità del 95%)			

- Utilizzo di un substrato chemiluminescente
- Diluizione d'uso dei sieri maggiore che in i-ELISA

Conclusioni (1)

- I risultati dell'analisi bioinformatica *in silico* delle proteine devono essere sempre confermati da opportuni test in laboratorio
- E' stata evidenziata una reazione aspecifica di una parte dei sieri negativi del pannello con le proteine ricombinanti selezionate
- Necessità di identificare altre proteine uniche di *T. equiperdum* da utilizzare come antigene nei test sierologici

Conclusioni (2)

- Studio innovativo: ad oggi pochissimi dati in letteratura relativi a produzione ed utilizzo di proteine ricombinanti di *T. equiperdum*
- In parallelo all'attività di selezione di proteine immunogene specifiche (U.O. 1), è in corso la produzione sperimentale *in vitro* del *T. equiperdum* (U.O. 2) al fine di ridurre l'uso di animali da esperimento nella produzione di prodotti diagnostici

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPOREALE"

Ringraziamenti

- **Dr. Romolo Salini**
(Scienze statistiche e GIS, IZSAM)
- **Dr. Laurent Hébert**
(ANSES – OIE Reference Laboratory for
Dourine, Maisons-Alfort, France)
- I **colleghi** dei Reparti Produzione Vaccini
Virali e Presidi Diagnostici e Immunologia e
Sierologia

... e tutti gli ascoltatori!



Xu Beihong
(1895-1953)