

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2015”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 08 /15RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**  
**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sanità animale**

**Titolo del progetto:** Sviluppo di un saggio “DIVA”  
(Differentiating Infected from Vaccinated Animals) per la  
sierodiagnosi del Virus della West Nile (WNV)

**“ Ricerca finanziata dal Ministero della Salute”**

**Responsabile Scientifico: Dr. Raniero Lorenzetti**

## SINTESI

### ***Titolo: Sviluppo di un saggio “DIVA” (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) per la sierodiagnosi del Virus della West Nile (WNV)***

La “West Nile Disease” (WND) è un’infezione virale sostenuta da un arbovirus della famiglia *Flaviviridae* (WNV), la cui circolazione è attualmente segnalata in tutti i continenti del globo. La trasmissione del virus avviene principalmente attraverso vettori artropodi, essenzialmente del genere *Culex* e coinvolge diverse specie animali, in particolare suini e/o uccelli acquatici. L’uomo ed i cavalli sono invece considerati ospiti a fondo cieco, non contribuendo quindi alla diffusione dell’infezione.

La sorveglianza sierologica della West Nile, eseguita su equini sentinella, può essere affetta da criticità associate, in particolare, a “false positività” generate dalla cross-reattività di anticorpi diretti contro virus diversi antigenicamente correlati, ma diversi, da quello della West Nile oppure, da sieropositività indotte attraverso interventi di vaccinazione: rispetto a questo ultimo punto, per il superamento della problematica sarebbe necessario disporre, ad esempio, di un test sierologico in grado di distinguere le positività indotte da un’infezione di campo da quelle indotte dai presidi vaccinali. Un test sierologico con queste caratteristiche, definito D.I.V.A. (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), dovrebbe ovviamente basarsi sulle performance diagnostiche di antigeni virali non presenti nei preparati vaccinali in uso. A tale riguardo è importante notare che i vaccini oggi impiegati per la prevenzione della WNV sono essenzialmente di tipo ricombinante e, si basano sulle proprietà immunogeniche delle proteine strutturali di superficie “E” ed “M” del virus: la scelta della proteina non strutturale “NS5” per lo sviluppo di un saggio D.I.V.A. potrebbe quindi rivelarsi idonea. La “NS5”, la proteina più grande e più conservata nei Flavivirus, è coinvolta nella replicazione dell’RNA virale, con la porzione N-terminale dotata di attività metiltransferasica (MTase) e la porzione C-terminale di attività RNA polimerasi-RNA-dipendente (RdRp).

Oltre alla selezione dell’antigene, la definizione della metodologia di lavoro ha anche considerato il quadro epidemiologico nazionale, da cui si evince la circolazione di due diversi lineage virali: il “lineage 1”, come ad esempio il ceppo “Livenza” ed il “lineage 2”, come ad esempio il ceppo “Rovigo”. Il confronto delle sequenze polipeptidiche (905 amminoacidi) che nei due diversi lineage corrispondono alla “NS5” (905 amminoacidi), indica per queste una similarità di sequenza pari al 94% circa, con sostituzioni amminoacidiche omogeneamente distribuite sull’intera regione codificante. Per tale ragione, ed in assenza di dati relativi alle caratteristiche di immunogenicità dei due polipeptidi, è stato definito un piano di lavoro basato sul clonaggio e l’espressione della NS5 di entrambi i lineage, con una strategia che ha previsto l’espressione della NS5 in forma di due sub-polipeptidi, di dimensioni più contenute, pari a circa 30 e 70kDa e corrispondenti alla “MTasi” (all’N-

terminale) e alla “RNA polimerasi RNA dipendente” (RpRd; al C-terminale) rispettivamente. La sintesi delle sequenze codificanti i quattro polipeptidi, è stata affidata ad un servizio di *gene synthesis*, che offre l’indubbio vantaggio di rendere possibili modifiche della sequenza, in particolare adattandola al *codon* usage dell’ospite prescelto per la loro espressione, un sistema basata sul “macchinario” di sintesi proteica di *Escherichia coli*.

Le quattro sequenze (inviata in un vettore di archiviazione) sono state amplificate e quindi clonate in un primo vettore di espressione, il “pET/SUMO (Invitrogen): il *partner* di fusione SUMO codificato da questo vettore ha una massa pari a circa 11kDa ed è l’omologo fungino (*Saccharomyces cerevisiae*) del SUMO-1 espresso nei mammiferi; i dati in letteratura associano a questo polipeptide una particolare efficacia nel conferire caratteristiche di solubilità alle proteine “passeggero” coesprese (nella fatiscie, i subpolipeptidi della NS5), comportandosi in sostanza come un chaperone intramolecolare. Il costrutto ottenuto con il clonaggio delle sequenze, è stato quindi cimentato con un sistema di espressione *cell free*, per l’espressione di proteine ricombinanti in sistema acellulare, evitando in questo modo la creazione di un Microrganismo Geneticamente Modificato (MOGM), la cui manipolazione richiede la preventiva autorizzazione del Ministero della Salute. Le caratteristiche immunologiche delle proteine espresse sono state verificate mediante saggi di immunoblotting e test ELISA (circoscrivendo le attività, in un prima fase, alle proteine ricombinanti del lineage 2), utilizzando sieri di cavallo positivi e negativi al WNV. I saggi così condotti hanno evidenziato una reattività dei sieri (positivi e negativi) nei confronti della porzione SUMO: alla luce di questo dato, è stata avviata una seconda sperimentazione che ha previsto l’impiego di un diverso vettore di espressione, che consente la sintesi di proteine in forma nativa, ad esclusione della presenza di un piccolo polipeptide, l’”express epitope”, utile alle successive fasi di rilevamento dei prodotti di espressione; le criticità riscontrate nella prima parte della ricerca e la ristrettezza nei tempi ancora a disposizione per la sua conclusione, hanno determinato una limitazione delle successive sperimentazione, che sono state circoscritte ad un unico polipeptide, l’MTasi del lineage 2: i risultati preliminari ottenuti con questa nuova strategia, confermano la bontà della strategia avviata, in grado di ridurre sensibilmente la presenza di aspecifici, garantendo al contempo una buona resa del prodotto.

Parole chiave: west Nile virus, proteine ricombinanti, saggi DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)

