

RICERCA CORRENTE 2009

REPORT FINALE Progetto IZS LT109 RC

Valutazione di nuove strategie per la sorveglianza dell'infezione da virus West Nile (WNDV)

Area tematica: **Sanità animale**

linea di ricerca:

- Studio e valutazioni delle patologie considerate emergenti in Italia, nei paesi comunitari ed in quelli del mediterraneo, aspetti clinici ed epidemiologici, relativi fattori di rischio e prevenzione, con particolare riguardo a quelle malattie trasmesse da vettori biologici.
- Studio e messa a punto di nuovi protocolli e strumenti diagnostici caratterizzati da una facile applicabilità in allevamento, rapidità di esecuzione, affidabilità e costo contenuto, per migliorare i sistemi di sorveglianza sulle malattie infettive o sulle patologie di interesse della medicina veterinaria.

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

Struttura di appartenenza: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT), Via Appia Nuova 1411 ó 00178 Roma

e-mail gianluca.autorino@izslt.it

Data scadenza del progetto: 30.11.2013

õ Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimentiõ

Roma li, 13 Settembre 2014

INDICE GENERALE ED ELENCO DEGLI ALLEGATI

ELENCO DEI COLLABORATORI	3
SINTESI	8
INTRODUZIONE	12
WORK PACKAGE 1	
Individuazione sistemi di sorveglianza integrativi	
DISEGNO DELLO STUDIO TRASVERSALE RETROSPETTIVO NELLE SPECIE SUINA E CANINA E CALCOLO DEL CAMPIONE NECESSARIO ANCHE AI FINI DEL SUCCESSIVO STUDIO PILOTA	14
VALUTAZIONE DELLE ABITUDINI ALIMENTARI DI CULEX PIPPIENS E DI ALTRI POSSIBILI VETTORI RESPONSABILI DI TRASMISSIONE: SCELTA DEI SITI DI CATTURA E CENSIMENTO DELLE SPECIE OSPITI PRESENTI; CATTURE, TRIALS SUL CAMPO, IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E DEL GENOMA DI SPECIE SU CUI ABBIANO EFFETTUATO PASTI DI SANGUE MEDIANTE L'AMPIEGO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI	21
WORK PACKAGE 2	
Studio e sviluppo di prodotti utilizzabili come strumenti diagnostici innovativi	
RACCOLTA DI CAMPIONI DI SANGUE DA EQUINI RISULTATI NATURALMENTE INFETTI, DA SOGGETTI SIERONEGATIVI SOTTOPOSTI A VACCINAZIONE SECONDO PROTOCOLLI PREDEFINITI E DA SOGGETTI VACCINATI E SUCCESSIVAMENTE ESPOSTI AD INFEZIONE	28
SELEZIONE DELLE PROTEINE NON STRUTTURALI IN GRADO DI INDURRE UNA RISPOSTA IMMUNE: RICERCA BIBLIOGRAFICA, ACQUISIZIONE PRESSO DITTE SPECIALIZZATE DI PEPTIDI SINTETICI SELEZIONATI E SAGGIO DEI PEPTICI.	29
SELEZIONE E CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI LE PROTEINE NS2A, NS2B, NS5	42
AMPLIFICAZIONE DELLA NS5 MEDIANTE STRATEGIA PCR SOEING	47
ALLEGATO 1	
SCHEDA DI ACCOMPAGNAMENTO PER CAMPIONI DI SANGUE DI CANE PER WEST NILE DISEASE	50
ALLEGATO 2	
WEST NILE DISEASE ó PIANO PILOTA SORVEGLIANZA IN SUINI ó SCHEDA PRELIEVO	53
ALLEGATO 3	
SCHEDA D'ACCOMPAGNAMENTO PER I CAMPIONI DI SANGUE DA PRELEVARE NEL CORSO DELLE VACCINAZIONI PER LA WEST NILE DISEASE DEI CAVALLI DEL CENTRO MILITARE DI GROSSETO	54

ELENCO DEI COLLABORATORI

1. Unità Operativa n.1

IZSLT - Direzione operativa Diagnostica delle malattie virali e delle leptospirosi -

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Gian Luca Autorino

Collaboratori: Francesca Rosone

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

Coordinamento delle attività di Progetto

- disegno dello studio trasversale retrospettivo nelle specie suina e canina e calcolo del campione necessario. Elaborazione dei risultati dello studio pilota
- individuazione delle aree a rischio e definizione del campione di suini e cani sentinella
- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie
- Analisi comparativa dei risultati rispetto alle prevalenze sierologiche osservate nel corso dei Piani di sorveglianza e definizione di eventuali popolazioni da sottoporre a controllo ai fini della sorveglianza attiva
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione
- valutazione delle potenzialità diagnostiche dei prodotti ottenuti dal WP2 e stesura relazione finale
- Raccolta, elaborazione dati e stesura relazione finale

Unità operativa n. 2

IZSLT - Direzione operativa Diagnostica delle malattie virali e delle leptospirosi

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Maria Teresa Scicluna

Collaboratori: Andrea Caprioli, Giuseppe Manna, Roberto Nardini, Massimiliano Simula

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Disegno dello studio trasversale retrospettivo nelle specie suina e canina e calcolo del campione necessario. Elaborazione dei risultati dello studio pilota
- Individuazione delle aree a rischio e definizione del campione di suini e cani sentinella
- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie
- Analisi comparativa dei risultati rispetto alle prevalenze sierologiche osservate nel corso dei Piani di sorveglianza e definizione di eventuali popolazioni da sottoporre a controllo ai fini della sorveglianza attiva
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione
- Valutazione delle potenzialità diagnostiche dei prodotti ottenuti dal WP2 e stesura relazione finale
- Raccolta, elaborazione dati e stesura relazione finale

Unità operativa n. 3

IZSLT, Ufficio di Staff Biotecnologie

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Ugo Marchesi

Collaboratori: Raniero Lorenzetti, Antonella Cersini, Katia Barbaro, Pamela Bovini, Maurizio Zini

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione delle abitudini alimentari di *Culex pipiens* e di altri possibili vettori responsabili di trasmissione: Cature, trials sul campo, identificazione di specie e del genoma di specie su cui abbiano effettuato pasti di sangue mediante l'impiego di tecniche biomolecolari trasferimento materiale.
- Selezione delle proteine non strutturali in grado di indurre una risposta immune: ricerca bibliografica
- Acquisizione presso ditte specializzate di peptidi sintetici selezionati in base a quanto definito nel punto precedente
- Saggio dei peptidi di cui alla lettera c) con sieri di cui alla lettera a)
- Clonaggio di porzioni immunogene delle proteine non strutturali in differenti sistemi di espressione
- Verifica, in dot blot, del mantenimento dell'immunogenicità da parte delle proteine ricombinanti ottenute nella fase e), cimentandole con sieri di cui alla lettera a).
- Produzione degli anticorpi monoclonali mediante la tecnica degli ibridomi (da avviare contestualmente alla fase f)
- Caratterizzazione degli anticorpi monoclonali prodotti, attraverso la determinazione dell'isotipo ed eventuale valutazione della capacità di riconoscere epitopi conformazionali o lineari
- Valutazione delle potenzialità diagnostiche dei prodotti ottenuti e stesura relazione finale
- Raccolta, elaborazione dati e stesura relazione finale

Unità operativa n. 4

IZSLT ó Ufficio di Staff Osservatorio epidemiologico

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Marcello Sala

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Disegno dello studio trasversale retrospettivo nelle specie suina e canina e calcolo del campione necessario. Elaborazione dei risultati dello studio pilota
- Individuazione delle aree a rischio e definizione del campione di suini e cani sentinella
- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie.
- Analisi comparativa dei risultati rispetto alle prevalenze sierologiche osservate nel corso dei Piani di sorveglianza e definizione di eventuali popolazioni da sottoporre a controllo ai fini della sorveglianza attiva
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta, elaborazione dati e stesura relazione finale

Unità operativa n. 5

IZSLT ó Sezione di Latina

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Giorgio Saralli

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 6

IZSLT ó Sezione di Arezzo

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Dario Deni

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 7,

IZSLT ó Sezione di Grosseto

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Maira Guidoni

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 8,

IZSLT ó Laboratorio di parassitologia

Responsabile scientifico: Claudio Deliberato

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Censimento degli ospiti nelle aree di studio, delle catture di zanzare, della loro identificazione:
- Valutazione della tendenza delle zanzare a nutrirsi sulle specie ospiti prese in considerazione in diverse situazioni (polispecifiche e monospecifiche);
- Cattura sul campo in aziende zootecniche caratterizzate dalla presenza di diverse specie potenziali ospiti.
- Identificazione morfologica dei culicidi catturati, mediante esame microscopico. Dissezione delle femmine replete e trasferimento degli addomi contenenti sangue all'UO 9 per l'identificazione molecolare della specie su cui è stato effettuato il pasto di sangue.

Unità operativa n. 9

Istituto Superiore di Sanità ó Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale;
Responsabile scientifico: Luciano Toma

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- scelta dei siti ritenuti maggiormente idonei per la raccolta dei campioni di zanzare; per gli obiettivi 1 e 2 tra i siti con presenza di varie specie domestiche, verranno privilegiati gli allevamenti suini intensivi e i canili. Sulla base della letteratura consultata e dell'esperienza maturata sul campo, saranno presi in considerazione i siti con provata abbondante presenza di zanzare durante la stagione estiva;
- uso dei sistemi di cattura e identificazione di specie dei medesimi. L'attività di cattura verrà effettuata nei mesi da giugno ad ottobre, mediante aspirazione diretta delle zanzare nei siti di riposo potenziali. La UO 9 sarà presente alle operazioni di campo preliminari, a quelle iniziali e in generale su richiesta specifica della UO 8 secondo possibilità ed esigenze;
- consulenza tecnico-scientifica per l'identificazione dei campioni raccolti, con particolare attenzione alle specie competenti per la trasmissione del WNV.

Unità operativa n. 10

Esercito Italiano, Centro veterinario militare ó Grosseto
Responsabile scientifico: Marco reitano

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 11

ASL - Latina
Responsabile scientifico: Carlo Bernardi

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie.
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie
- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 12

ASL - Arezzo
Responsabile scientifico: Ettore Barneschi

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca:

- Valutazione della prevalenza dell'infezione da WNDV nel suino e nel cane mediante ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi in sieri di animali mantenuti in zone in cui sia stata accertata circolazione virale in altre specie.
- Sperimentazione e valutazione della sensibilità di un sistema di sorveglianza su altre specie

- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 13

IZS della Sicilia Area territoriale di Palermo

Responsabile scientifico: Domenico Vicari

Attività svolte nel corso del progetto di ricerca

- Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione

Unità operativa n. 14

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise ó Centro Studi Malattie Esotiche

Responsabile scientifico non individuato in quanto la direzione dell'istituto non ha ritenuto di partecipare a seguito di invito. (allegato)

SINTESI

Valutazione di nuove strategie per la sorveglianza dell'infezione da virus West Nile (WNDV)

Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti

Autore: Gian Luca Autorino
N. identificativo progetto: IZS LT109 RC
Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino
e-mail: gianluca.@izslt.it

Obiettivi generali del progetto:

- Verificare la propensione di *Culex. pipiens*, ed eventualmente di altre zanzare dello stesso genere, a nutrirsi sulle specie considerate come possibili sentinelle (cane, maiale), anche rispetto ad altre notoriamente attrattive nei confronti di questi culicidi, mediante catture, trials sperimentali sul campo e successive analisi dei pasti di sangue.
- Valutare la sensibilità delle specie suina e canina quali possibili mammiferi sentinella alternativi o complementari agli equidi nell'ambito dell'attività di sorveglianza sierologica della WND, dapprima verificando la sensibilità relativa rispetto agli equidi in aree con attiva circolazione virale, successivamente, sulla base delle stime degli indici epidemiologici, sperimentando un modello di sorveglianza parallelo a quello attualmente operativo, in aree pilota individuate sulla base del rischio. In tali aree valutare, sensibilità, specificità, precocità e Valori Predittivi del sistema di sorveglianza applicato sulle popolazioni Canine e Suine.
- Verificare la possibilità che sieri ottenuti da soggetti vaccinati e con infezione naturale reagiscano in modo differente con epitopi di proteine non strutturali di WNDV, essendo queste ultime associate alla replicazione attiva del virus.

Metodologia

WP1 ó Individuazione sistemi di sorveglianza integrativi

Sono state individuate le aree con attiva circolazione virale nel 2009, al fine di comparare i dati di prevalenza dei suini e dei cani con quelli osservati nella popolazione equina nelle zone sottoposte alle azioni di sorveglianza straordinaria a seguito di dimostrata circolazione virale. Per il Lazio è stata definita l'area della provincia di Latina (comuni di Pontinia, Sabaudia, San Felice Circeo, Pontinia, Terracina, Latina), per la Toscana l'area dei comuni di Castiglion Fiorentino, Cortona, Arezzo.

È stata effettuata la stratificazione della popolazione suina e canina al fine di individuare le classi di esposizione più idonee, assumendo valori di prevalenza attesa e precisione a priori delle stime di prevalenza tarate sulle sieroprevalenze osservate negli equidi nel corso del 2009.

Sono state dapprima predisposte le linee guida per il monitoraggio sierologico, quindi, le schede di accompagnamento campioni contenenti i campi necessari all'effettuazione delle considerazioni epidemiologiche sulla base del possibile rischio di esposizione ai vettori.

Parallelamente, si è richiesta l'esecuzione di un analogo campionamento presso aree del territorio della regione Emilia Romagna in cui la WNV aveva avuto prevalenze di gran lunga superiori.

A partire da fine 2009, presso le stesse aree, assieme alle azioni di sorveglianza attiva sugli equidi sentinella, previste dal piano di sorveglianza nazionale, è stato quindi attivato uno studio

prospettico sulle specie canina e suina per effettuare la stima dell'incidenza di sier conversionsi nel periodo a rischio.

I test di screening sono stati effettuati con un ELISA competitiva che, rispetto ad altri del commercio, consente l'impiego anche in differenti specie animali. Gli stessi campioni sono stati anche saggiati impiegando il metodo della sieroneutralizzazione.

In assenza di collaborazione da parte dei servizi Emiliani, ed essendo venuta meno la circolazione del WNV delle aree di nostra competenza, il monitoraggio è stato esteso su alcuni sieri di cane raccolti in provincia di Trapani, aree in cui rispettivamente nel 2010 e 2011 erano stati accertati casi di infezione/malattia.

Per gli studi entomologici sono stati selezionati i siti per le catture ai fini della verifica della propensione di *Culex pipiens*, a nutrirsi su cane e maiale, anche rispetto ad altre specie, effettuando trials sul campo, identificazione di specie e del genoma di specie su cui abbiano effettuato pasti di sangue mediante PCR e successivo sequenziamento.

I campionamenti sono stati condotti in due differenti situazioni ambientali polispecifiche (aziende agricole con presenza di più specie notoriamente attrattive) e monospecifiche (porcilaie e canili).

I ditteri della famiglia Culicidae sono stati identificati a livello di specie mediante esame morfologico dei caratteri diagnostici, seguendo le chiavi analitiche di Severini *et al.* Le femmine replete (con presenza di sangue non digerito visibile nell'addome), opportunamente identificate e preservate, sono state successivamente trasferite alla UO3 per l'identificazione molecolare della specie su cui era stato effettuato il pasto di sangue.

WP 2 Studio e sviluppo di prodotti utilizzabili come strumenti diagnostici innovativi

Per la verifica della risposta anticorpale nei confronti di proteine non strutturali del virus è stata costituita una banca di campioni che comprendeva equini sicuramente negativi, equini positivi a seguito di infezione naturale, soggetti negativi e sottoposti a vaccinazione con vaccini a virus intero e, infine, sieri di soggetti immunizzati con vaccino ricombinante contenente i soli geni codificanti per le proteine strutturali di superficie del virus.

Selezionati attraverso la ricerca bibliografica gli epitopi immunogenici in proteine strutturali e non strutturali di WNV. Sono stati selezionati 38 epitopi lineari di proteine non strutturali di WNV, di lunghezza variabile da 9 a 26 aminoacidi, potenzialmente immunodominanti, con i quali saggiare sieri equini positivi non vaccinali a WNV. Sono stati ordinati quindi 43 peptidi sintetici (5 da proteina envelope e 38 da proteine non strutturali). Uno dei 38 peptidi relativo alle proteine non strutturali non è risultato sintetizzabile dal fornitore e pertanto il relativo epitopo lineare è stato escluso dallo studio.

Le prove sperimentali per lo screening degli epitopi lineari immunodominanti di proteine non strutturali, avrebbe dovuto svolgersi, preferibilmente in un sistema ELISA (in subordine in Dot Blot), attraverso due fasi:

1. verifica del modello sperimentale mediante adsorbimento diretto su MaxiSorp (ELISA) di 5 peptidi riconducibili alla proteina dell'envelope, antigene di riferimento WNV, e challenge con sieri equini positivi a WNV, vaccinali e non vaccinali, e sieri negativi. Tali peptidi, se in grado di discriminare sieri negativi e sieri positivi, avrebbero rappresentato i controlli positivi del sistema di screening vero e proprio da effettuarsi nella seconda fase utilizzando i rimanenti 37 peptidi relativi a proteine non strutturali;

2. screening di epitopi lineari immunodominanti di proteine non strutturali utilizzando i rimanenti 37 peptidi relativi a proteine non strutturali alle condizioni sperimentali individuate in fase 1.

Nonostante i numerosi tentativi di messa a punto del sistema ELISA previsto per la fase 1, non è stato possibile distinguere i sieri positivi dai sieri negativi. Analoghi approcci effettuati in Dot Blot non hanno fornito miglior esito. Ciò considerato, al fine di evitare ulteriori ritardi, si è proceduto direttamente al passaggio successivo del WP2 (clonaggio di porzioni immunogene delle proteine non strutturali in differenti sistemi di espressione).

Non avendo ottenuto indicazioni dalla fase di screening sopra descritta, in considerazione delle marcate differenze esistenti tra le proteine non strutturali di WNV, per taglia (dai 14 ai 103 kDa), per complessità e per presenza di modificazioni post-trasduzionali (ponti disolfuro, fosforilazioni), per la fase di clonaggio ed espressione in vitro è stato acquisito un sistema basato sul vettore pQE-TriSystem (QIAGEN) in grado di esprimersi sia in sistemi procariotici che eucariotici.

In generale si è quindi proceduto a selezionare i primer per l'amplificazione dei tratti del genoma codificanti le tre proteine non strutturali di interesse. In particolare le proteine NS2A ed NS2B coinvolte nel processo di maturazione della polimerasi virale e la NS5 codificante la DNA polimerasi RNA dipendente virale. Le prime due di dimensioni modeste, rispettivamente 22KD e 14KD, mentre la terza di 103 KD.

Oltre alla selezione dei primer è stata anche effettuata la ricerca dei siti di taglio enzimatici da utilizzare per il clonaggio e compatibili al vettore d'espressione selezionato (pQE-TriSystem-QIAGEN).

Nonostante i numerosi tentativi effettuati, modificando di volta in volta le condizioni sia di amplificazione che di composizione delle miscele di reazione, mentre per NS2B non si è ottenuto alcun prodotto da impiegare per le successive fasi relative al clonaggio, per la NS2A è stato ottenuto un amplificato di 629bp e per l'NS5 un prodotto di amplificazione di 220 bp. Il sequenziamento di entrambi i prodotti di amplificazione mostrava omologie di sequenza 100% rispettivamente con quelle dei ceppi Egypt 101 e Italy 2009/j225677.

Pur essendo stata amplificata una porzione del genoma di NS5 notevolmente ridotta rispetto a quella attesa (2761bp), forse a motivo della inserzione dei siti di taglio che potrebbero aver modificato la specificità dei primer, si è inizialmente tentato il clonaggio di quest'ultima, in quanto ritenuta di maggiore interesse a motivo della provata immunogenicità in soggetti naturalmente infetti.

Sebbene siano stati rispettati tutti i parametri indicati dalla ditta e dai protocolli di clonaggio (defosforilazione del vettore e rapporti molarli adeguati tra vettore ed inserto), a causa della costante ricombinazione interna del vettore, non si è ottenuto nessun plasmide ricombinante.

Piuttosto che effettuare tentativi con lo stesso vettore anche sul prodotto di amplificazione di NS2A, considerato anche il fatto che non era possibile definire se alla porzione di 220 bp corrispondesse genoma codificante per l'espressione di epitomi immunogeni di NS5, si è deciso di proseguire il lavoro nel seguente modo:

1. ottenere l'intera sequenza della NS5 attraverso di amplificazione, nota con il nome di *SOEingö* (*In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes* (Horton RM) *Methods Mol Biol.* 1993;15:251-61) che consiste nella fusione di diversi amplificati attraverso la complementarietà della sequenza nucleotidica ad una delle loro estremità.
2. Selezionare nuovi vettori di espressione da impiegare per i successivi clonaggi degli amplificati di NS2A, della porzione di 220 bp di NS5 e di singoli frammenti o di tutto il genoma codificante per la stessa proteina ottenuti con la strategia di cui al punto 1.

Con la strategia SOEing sono stati ottenuti tre distinti frammenti di circa 900 bp, tra loro contigui e con estremità condivisa, che permette sia la loro coniugazione, sia la possibilità di impiego disgiunto.

Attraverso l'impiego di ligasi, la coniugazione dei frammenti di NS5 ha consentito di ottenere un prodotto equivalente all'intera porzione codificante la NS5 (2761 bp).

Il successivo sequenziamento dell'intera NS5 è risultato omologo rispetto allo stesso ceppo di origine (Italy 2009/j225677).

Il frammento codificante la NS5 è stato quindi clonato ed archiviato in un vettore plasmidico di mantenimento (TOPO-TA cloning ó Invitrogen), al fine di assicurarne la piena disponibilità per le successive fasi della ricerca, mirate alla produzione di proteine ricombinanti attraverso il subclonaggio di parte, o dell'intera sequenza, in vettori di espressione eterologhi, attualmente in fase di valutazione, una volta individuato un efficiente vettore di espressione.

INTRODUZIONE

La West Nile Disease (WND) è una malattia sostenuta dal virus West Nile (WNDV), un arbovirus della famiglia dei *Flaviviridae* composto da un RNA a singolo filamento. Vettori appartenenti a diversi generi della famiglia Culicidae sono in grado di diffondere l'infezione. Tra di essi il genere *Culex* è risultato essere il più rilevante dal punto di vista epidemiologico. Passeriformi, Caradriformi e rapaci sono riconosciuti come i principali reservoirs. Occasionalmente, può essere trasmesso ad altre specie animali; equini e uomo risultano ospiti accidentali, sviluppando occasionalmente sindromi neurologiche. In Italia il WNDV è stato identificato per la prima volta nel 1998 in Toscana ed è ricomparso successivamente nel 2008 in Emilia Romagna, diffondendosi poi in Veneto e Lombardia. La segnalazione nel 2009, di nuovi focolai indicherebbe la sua endemizzazione nella stessa area, anno in cui la circolazione virale è stata segnalata anche in Toscana e nel Lazio. Successivamente alla presentazione del presente progetto di ricerca, l'infezione si è diffusa anche in altri ambiti territoriali dell'Italia insulare (Sicilia e Sardegna) e, a partire dal 2012, risulta circolare a livello nazionale il ceppo 2 del virus di nuova introduzione.

In Italia è attivo dal 2002 un Piano di Sorveglianza volto a rilevare la presenza e la diffusione di WNDV. Tuttavia, alla luce della recente diffusione della malattia, si rendono necessarie l'acquisizione di maggiori informazioni sull'epidemiologia dell'infezione e la disponibilità di ulteriori strumenti per la sorveglianza e la diagnostica da integrare a quelli attualmente in uso.

Le esperienze condotte nel corso della sorveglianza hanno dimostrato l'utilità degli equini ai fini della rilevazione della circolazione virale. A causa delle elevate prevalenze osservate nelle aree dove l'infezione è divenuta endemica e dell'impiego della vaccinazione, anche in altre zone del territorio non interessate da circolazione di WNDV ma comunque sottoposte a sorveglianza, potrebbe venire meno la disponibilità di tale indicatore.

Per la sorveglianza della WND una specie animale sentinella ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche (CDC, 2003): a) essere sensibile all'infezione; b) sopravvivere all'infezione sviluppando anticorpi facilmente rivelabili; c) non costituire un rischio d'infezione per gli operatori con cui hanno contatti; d) non sviluppare mai una viremia sufficiente per infettare gli insetti vettori. Ad oggi, i cavalli sono stati per le caratteristiche sopra descritte, i mammiferi maggiormente impiegati in piani di sorveglianza. Indagini di prevalenza hanno messo in evidenza che circa il 30% della popolazione canina del Sud Africa aveva anticorpi sieroneutralizzanti nei confronti di WNDV ed anche ricerche condotte nel 1999 hanno messo in evidenza prevalenze superiori che nei cavalli residenti nelle aree limitrofe alla città di New York e che anche questa specie può essere considerata ospite terminale dell'infezione. Inoltre, le sier conversionsi nei cani precederebbero di circa 6 settimane la comparsa dei casi umani e, condividendo lo stesso habitat dell'uomo, potrebbe rappresentare una sentinella ideale da utilizzare in piani di sorveglianza. Minori sono le informazioni relative all'infezione nella specie suina in cui è stato comunque osservato che a seguito di infezione sperimentale, animali esposti al pasto di vettori infetti, tuttavia presentavano una modesta viremia e sier convertivano senza presentare sintomi di malattia.

Relativamente alle conoscenze di ordine entomologico, nel mondo, WNDV è stato isolato da zanzare appartenenti ad almeno 75 specie di 10 generi diversi. Per quanto riguarda l'Europa, il genere *Culex* è ritenuto quello epidemiologicamente più rilevante. In particolare 2 specie, *Cx. modestus* e *Cx. pipiens* (nelle sue 2 forme biologiche *Cx.p. pipiens* e *Cx. p. molestus*) sono risultate essere i principali vettori in diversi episodi epidemici verificatisi nel nostro continente. In Italia nel 1998 *Cx. impudicus* è stata ritenuta probabile vettore di trasmissione enzootica.

In letteratura sono descritti diversi metodi biomolecolari, basati sul sequenziamento del DNA, con cui è possibile identificare specie animali appartenenti ai diversi gruppi tassonomici. Un simile metodo è stato sviluppato in Istituto ed è stato impiegato per verificare la propensione alimentare dei differenti vettori sulle specie animali candidate come sentinelle.

Tra i test diagnostici, l'OIE riporta sia metodi di identificazione diretta, con tecniche molecolari, immunologiche, ed isolamento virale, sia differenti metodi indiretti, sierologici, prevalentemente in grado di rilevare anticorpi delle classi IgM ed IgG. Il plaque reduction neutralization test (PRNT) è considerato il gold standard e quindi sempre utilizzato per la conferma di risultati altrimenti ottenuti. In ogni caso, i test sierologici attualmente in uso permettono di rilevare gli anticorpi nei confronti delle proteine pericapsidiche virali, la glicoproteina E e la proteina M. Essi, tuttavia, non consentono di distinguere anticorpi vaccinali da anticorpi indotti da infezione naturale. L'impiego del vaccino ostacola, di conseguenza, la diagnosi dell'infezione e la sorveglianza della stessa.

Lo studio ed il confronto delle proprietà immunogeniche delle proteine non strutturali (NS) di WNDV rispetto a quelle, già note, delle proteine strutturali potrebbe costituire l'approccio per superare tale limite. Le proteine non-strutturali NS1, NS2a, NS2b, NS3 ed NS5 contengono sequenze aminoacidiche altamente conservate nei ceppi WNDV appartenenti al lineage 1 e 2. In letteratura sono riportate osservazioni che confermano la capacità di epitopi appartenenti a proteine non strutturali di indurre immunità sia cellulo-mediata, sia umorale.

Obiettivi principali del presente progetto sono:

- Verificare la propensione di *Cx. pipiens*, ed eventualmente di altre zanzare dello stesso genere, a nutrirsi sulle specie considerate come possibili sentinelle (cane, maiale), anche rispetto ad altre notoriamente attrattive nei confronti di questi culicidi, mediante catture, trials sperimentali sul campo e successive analisi dei pasti di sangue;
- Valutare la sensibilità delle specie suina e canina quali possibili mammiferi sentinella alternativi o complementari agli equidi nell'ambito dell'attività di sorveglianza sierologica della WND;
- Produrre proteine ricombinanti per verificare la possibilità che sieri ottenuti da soggetti vaccinati e con infezione naturale reagiscano in modo differente con epitopi di proteine non strutturali di WNDV, ai fini di un possibile, successivo sviluppo di metodi diagnostici innovativi alternativi/integrativi a quelli disponibili per la diagnosi dell'infezione in soggetti vaccinati.

WP1

INDIVIDUAZIONE SISTEMI DI SORVEGLIANZA INTEGRATIVI

Disegno dello studio trasversale retrospettivo nelle specie suina e canina e calcolo del campione necessario anche ai fini del successivo studio pilota.

Con l'obiettivo di individuare nuove specie animali da utilizzare come sentinelle nei piani di sorveglianza valutando la sensibilità per WNDV soprattutto in aree in cui si verificano infezioni sostenute da virus con caratteristiche di scarsa patogenicità nei confronti delle specie aviarie, è stata concentrata l'attenzione sul cane e sulla specie suina.

Lo studio ha inizialmente riguardato le aree del Lazio e della Toscana con circolazione virale attiva nel 2009, al fine di comparare i dati di prevalenza dei suini e dei cani con quelli osservati nella popolazione equina nelle zone sottoposte alle azioni di sorveglianza straordinaria a seguito di dimostrata circolazione virale nel corso della sorveglianza.

Per la Regione Lazio è stata definita l'area comprendente i comuni di Pontinia, Sabaudia, San Felice Circeo, Terracina e Latina, per la Regione Toscana l'area dei comuni di Castiglion Fiorentino, Cortona e Arezzo.

Il parametro considerato nel calcolo del campione per la definizione della prevalenza attesa (5%) è stato scelto in funzione delle evidenze relative alla sieroprevalenza osservata nelle due aree di studio sugli equidi nel 2009 e assumendo pari livelli di esposizione e sensibilità delle specie canina e suina alla infezione rispetto agli equidi.

In dettaglio, per l'Area Lazio nel 2009 a fronte di 390 equidi testati in ELISA IgM nell'ambito della sorveglianza, 11 sono risultati positivi ($p\% = 2,82\%$ - IC95% 1,49-5,14).

Per l'Area Toscana a fronte di 145 equidi testati in ELISA IgM nell'ambito della sorveglianza, 8 sono risultati positivi ($p\% = 5,51\%$ - IC95% 3-9,40).

Cani

Fase 1. Per la stima retrospettiva della sieroprevalenza per WNDV dei cani residenti è stato calcolato un campione statistico da sottoporre a prelievo ematico nel mese di maggio 2010 i cui assunti tenevano in considerazione una prevalenza attesa pari a 5%, un errore standard (precisione assoluta della stima) pari a 3% ed un livello di confidenza pari a 95%.

Il campione così calcolato è stato distribuito omogeneamente per i 5 comuni dell'area di studio del Lazio ed i 3 comuni della provincia di Arezzo.

La stima così ottenuta sarebbe stata posta a confronto con le prevalenze osservate negli equidi nel corso del periodo di circolazione virale del 2009.

Fase 2. A partire dal 2010, presso le stesse aree, assieme alle azioni di sorveglianza attiva sugli equidi sentinella, previste dal piano di sorveglianza nazionale, è stato quindi attivato uno studio prospettico sulle specie canina e suina, definendo il campione di suini e cani sentinella sieronegativi da testare e necessari a svelare, con una probabilità pari a 95, almeno un capo sieropositivo nel caso di una prevalenza periodiale uguale o superiore al 5% (Campione per detection of disease) Gli assunti del campionamento prevedevano una sensibilità (Se) e Specificità (Sp) del metodo sierologico utilizzato pari a 100%.

In base ai parametri sopra citati è stato calcolato un campione unico per ciascuna area di interesse (Lazio-Toscana), successivamente stratificato proporzionalmente alla stima della popolazione residente in ciascun comune.

A seguito di riunioni preliminari condotte con i Servizi Veterinari delle Aziende sanitarie competenti per territorio, anche al fine di verificare le migliori condizioni per soddisfare i requisiti del campionamento, sono state dapprima predisposte le linee guida per il monitoraggio sierologico, quindi, le schede di accompagnamento campioni contenenti i campi necessari all'effettuazione delle considerazioni epidemiologiche sulla base del possibile rischio di esposizione ai vettori (allegato 1).

Ai Servizi veterinari delle Asl che collaboravano al progetto sono state distribuite le linee guida per il monitoraggio che dei cui criteri avrebbero dovuto tenere conto ai fini della scelta dei cani da sottoporre a prelievo, operando una stratificazione della popolazione al fine di individuare le classi di esposizione più idonee:

1. cani presenti nelle aziende che detenevano equini ed erano state sottoposte a sorveglianza straordinaria nell'autunno 2009
2. privilegiare prevalentemente cani a pelo raso (maggiore superficie del corpo esposta alla puntura delle zanzare)
3. distribuzione del campionamento uniforme nel territorio considerato per lo studio (comuni in elenco)
4. prelevare prevalentemente cani mantenuti in ambiente rurale e non ricoverati nelle ore notturne
5. privilegiare i cani nati prima del mese di giugno 2009 e di età inferiore ad un anno, presenti nell'area sottoposta a sorveglianza nel periodo di circolazione virale le cui eventuali sieropositività sarebbero, almeno teoricamente, da riferire ad una esposizione al virus avvenuta a partire dal 2009 e, di conseguenza, in modo da ridurre la possibilità che le prevalenze osservate fossero attribuibili ad esposizioni precedenti.
6. accertarsi che i soggetti non fossero stati trattati con repellenti nei confronti di insetti vettori.
7. I prelievi su soggetti mantenuti nei canili, avrebbero dovuto essere stati effettuati su soggetti catturati/accalappiati esclusivamente nel territorio dei comuni con accertata circolazione virale e nel periodo compreso fra i mesi di settembre e dicembre 2009, riportando tali informazioni sulla scheda di invio campioni. .

Tabella 1 ó Popolazione di cani stimata (denominatore) Area di studio Lazio

Comuni	Popol. di riferimento (denominatore)
PONTINIA	2.500
LATINA	2500
SABAUDIA	500
SAN FELICE CIRCEO	500
TERRACINA	1000

Tabella 2 ó Distribuzione del campione ó Fase 1- stima prevalenza - Area di studio Lazio

Comuni	Campione
PONTINIA	56
LATINA	58
SABAUDIA	56
SAN FELICE CIRCEO	56
TERRACINA	56
totale campioni	282

Di seguito si riportano le tabelle relative ai 3 comuni della provincia di Arezzo

Tabella 3 ó Popolazione di cani stimata (denominatore) Area di studio Toscana

Comuni	Popol. di riferimento (denominatore)
CAST. FIORENTINO	500
CORTONA	500
AREZZO	1500
totale	2500

Tabella 4 ó Distribuzione del campione - ó Fase 1- stima prevalenza - Area di studio Toscana

Comuni	Campione
CAST. FIORENTINO	50
CORTONA	35
AREZZO	35
totale	120

Ai fini del successivo studio pilota, previsto dalla fase 2, è stato eseguito un secondo prelievo sui cani risultati negativi al primo, al fine di svelare almeno una sieroconversione nel periodo maggio ó ottobre 2010, tenendo in considerazione gli stessi criteri di campionamento. In particolare, per lo studio pilota, si richiedeva che i soggetti da campionare fossero risultati sieronegativi al primo campionamento di maggio e residenti stabilmente nell'area tra maggio e ottobre 2010

Tabella 5 ó Fase 2. Studio pilota, distribuzione del campione - Area di studio Lazio

Comuni	Campione
PONTINIA	10
LATINA	20
SABAUDIA	10
SAN FELICE CIRCEO	10
TERRACINA	10
totale	60

Tabella 6 ó Fase 2. Studio pilota, distribuzione del campione - Area di studio Toscana

Comuni	Campione
CASTI. FIORENTINO	30
CORTONA	20
AREZZO	20
totale	70

Suini

Raccolti i dati relativi a demografia delle specie suina dalla BDN, è stata effettuata la stratificazione della popolazione in funzione della numerosità di capi e dell'orientamento produttivo.

Tabella 7 ó Lazio: Distribuzione degli allevamenti suini in provincia di Latina e nell'area di studio

	INDIRIZZO PRODUTTIVO	Totale provincia	validi in zona
N° allevamenti	AUTOCONSUMO	24	8
	INGRASSO	18	7
	RIPRODUZ. CICLO APERTO	18	3
	RIPRODUZ. CICLO CHIUSO	12	4
	Totale	72	22

I campioni dovevano essere prelevati in allevamenti da ingrasso, riproduttori ciclo chiuso e riproduttori a ciclo aperto a condizione che si trattasse di soggetti possibilmente esposti all'infezione (cioè presenti in azienda almeno dal mese di agosto 2009).

Tabella 8 ó Lazio: Campionamento atteso e distribuzione per allevamento nell'area di studio

Ipotesi campionamento	Totale BDN (no autoconsumo)	Totale DBASE effettivi (no autoconsumo)
Popolazione capi di riferimento		20689
Allevamenti	22	12
Prevalenza attesa	5%	
Errore standard	3%	
LC	95%	
campione capi	203	
campione capi/allevamento	10	17

Tabella 9 ó Toscana: Distribuzione degli allevamenti suini in provincia di Arezzo e nell'area di studio

N° allevamenti	INDIRIZZO PRODUTTIVO	Totale provincia	validi in zona
	AUTOCONSUMO	996	200
	INGRASSO	230	76
	RIPRODUZ. CICLO APERTO	104	38
	RIPRODUZ. CICLO CHIUSO	18	5
	ND	4	2
	Totale	1352	321

Tabella 10 ó Toscana: Campionamento atteso e distribuzione per allevamento nell'area di studio

Ipotesi campionamento	Totale BDN (no autoconsumo)	Totale DBASE effettivi (no autoconsumo)
Popolazione capi di riferimento		11549
Allevamenti	121	46
Prevalenza attesa	5%	
Errore standard	3%	
LC	95%	
campione capi	203	
campione capi/allevamento	2*	3

Trattandosi di due specie animali per le quali non erano disponibili kit diagnostici del commercio e, soprattutto dovendo valutare la specificità delle reazioni osservate, è stato adottato un protocollo diagnostico che prevedeva l'impiego di due metodi in serie.

I sieri venivano dapprima saggiati mediante test di siero neutralizzazione in micrometodo, secondo la procedura descritta dall'OIE Terrestrial Manual for diagnostic tests and vaccines (Cap. 2.1.20 ó West Nile fever) effettuando uno screening alla diluizione di 1/10, impiegando come substrato cellulare la line continua di rene di scimmia (Vero) e come virus 100 TCID50 dello stipite di riferimento Egypt 101 al fine di verificare la specificità ed escludere possibili cross reazioni con il virus Usutu, la cui circolazione virale è stata dimostrata anche a livello nazionale, i sieri reattivi venivano quindi nuovamente cimentati, questa volta a titolo, impiegando in parallelo sia il ceppo Egypt 101, sia lo stipite di Usutu virus SAR 1776.

Inoltre, per valutarne la specificità e la sensibilità relativa ai fini di successive indagini sierologiche su specie differenti dagli equidi, è stato inoltre impiegato un test ELISA competitivo messo a punto nell'ambito di un precedente progetto di ricerca finalizzata dall'IZSLER in collaborazione con il nostro Istituto, sottoposto a successiva validazione. Il vantaggio di questo, rispetto ad altri del commercio, consiste nel suo possibile impiego anche per la determinazione di anticorpi nel siero di differenti specie animali (Lelli et al. Proceedings of 3rd National Workshop of Veterinary Virology. Valenzano - Bari, Italy, Jun 11-12, 2009) e da noi validato nel corso di un precedente progetto di ricerca (G. L. Autorino et al. 2nd Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Kazimierz Dolny, Poland, 1-4 July 2012).

In assenza di disponibilità a collaborare da parte dei servizi Emiliani, ma soprattutto essendo venuta meno la circolazione del WNV delle aree di nostra competenza, al fine di poter verificare le ipotesi di cui allo specifico obiettivo, il monitoraggio è stato esteso su alcuni sieri di cane raccolti

in provincia di Trapani area nella quale nel 2011 erano stati accertati casi di infezione/malattia negli equidi.

Infine, nel 2012 quelli dell'AZS delle Venezie, essendo stati registrati casi di malattia nel territorio Friulano. Nonostante la disponibilità di massima accordata, abbiamo ottenuto campioni solo dalla provincia di Trapani.

Risultati e considerazioni

L'assenza di circolazione virale nelle aree del Lazio e della Toscana nel 2010, confermata dalle attività di sorveglianza pianificate condotte in conformità a quanto previsto dal Piano nazionale, non ha consentito di valutare la sensibilità del sistema sentinella (cani) nel periodo maggio ó ottobre 2010, così come previsto dal progetto pilota disegnato.

Per lo stesso motivo, si è quindi deciso di soprassedere dall'esecuzione dei controlli sui suini delle due province da condurre previsto per il periodo dicembre 2010/gennaio 2011.

I risultati ottenuti si riferiscono alla Fase 1 del protocollo ed evidenziano nelle aree di studio Lazio e Toscana la presenza di sporadiche positività sierologiche al WNDV, peraltro individuate solo nel Lazio, nelle specie sentinella-candidate.

Va tuttavia segnalato che la proporzione complessiva di copertura del campione è risultata inferiore al 50% per i cani, mentre per i suini può essere considerata soddisfacente (83%).

A tale criticità si aggiunge anche un problema di randomizzazione del campione sulle categorie di rischio indicate, sia nei cani sia nei suini.

Nonostante, le sicure positività rilevate nel cane (2/186 ó 1,1% IC95% 0,34-2,94) e nei suini (2/339 ó 0,6% IC95% 0,1-2,35) confermano il loro possibile utilizzo come specie sentinella alternative, sebbene l'impossibilità di condurre lo studio longitudinale in concomitanza della circolazione virale (Fase 2) non abbia prodotto informazioni utili a definire la sensibilità ed il valore predittivo positivo (VPP) di un sistema di sorveglianza ed allerta precoce basato sulle 2 specie nel Lazio ed in Toscana.

I dati ottenuti in provincia di Trapani nel corso della stagione epidemica da WNDV 2010-2011, suggeriscono tuttavia un effettivo ruolo come target di sorveglianza sierologica dei cani in corso di epidemia, stante la significativa prevalenza grezza osservata (12%).

Relativamente alla provincia di Trapani gli 11 campioni positivi sono stati individuati in cani (N=63) sottoposti a prelievo nei comuni nei quali si erano verificati casi di WND nei cavalli (Trapani, Valderice, Erice). In dettaglio, 56 prelievi provenivano dal canile di Trapani dove sono state registrate 8 positività sierologiche (14,3%) mentre le restanti 3 sieropositività sono state individuate sui cani presenti in tre focolai accertati di infezione negli equini su 7 cani testati (42,9%).

Non essendo disponibile un dato di sieroprevalenza consolidato nella popolazione equina di riferimento relativo alla stesa stagione epidemica, non è stato possibile operare una valutazione comparata con il dato sierologico nei cani.

Nonostante il campione analizzato rispondesse a criteri di convenienza, ossia non fosse randomizzato né rispondente ai criteri di rappresentatività della popolazione canina di provenienza, tuttavia i risultati ottenuti suggeriscono evidenza di sensibilità della specie canina all'infezione in situazioni di circolazione virale ed indirettamente della sua validità come target per il trofismo del vettore dell'infezione.

Tabella 11. Fase 1 . sieroprevalenze osservate nei cani nell'ambito dello studio trasversale

Area	Campione atteso	N capi esaminati	% copertura campione atteso	N positivi	Prevalenza %
Toscana	120	84	70%	0	0/84
Lazio	282	102	36%	2	2/102 (1.96%)
Totale Lazio + Toscana	402	186	46,20%	2	2/186 (1,1%)
<i>Campioni Aggiuntivi Trapani</i>	<i>na</i>	<i>91</i>	<i>na</i>	<i>11</i>	<i>11/91 (12%)</i>
Totale complessivo	<i>na</i>	277	<i>na</i>	13	13/277 (4,7%)

Tabella 12. Fase 1 . sieroprevalenze osservate nei suini nell'ambito dello studio trasversale

Area	Campione atteso	N capi esaminati	% copertura campione atteso	N positivi	Prevalenza%
Toscana	203	71	35%	0	0/71 (0%)
Lazio	203	268	132%	2	2/268 (0.75%)
Totale	406	339	83,50%	2	2/339 (0,6%)

La sensibilità della specie canina all'infezione è stata anche confermata da analoghe osservazioni successivamente condotte dal CESME in altri ambiti territoriali. Su queste basi è stato infatti proposto nel 2012 dallo stesso Ministero della Salute un progetto di sorveglianza straordinaria da effettuare a livello nazionale nelle popolazioni canine residenti nei maggiori capoluoghi del territorio.

VALUTAZIONE DELLE ABITUDINI ALIMENTARI DI CULEX PIPPIENS E DI ALTRI POSSIBILI VETTORI RESPONSABILI DI TRASMISSIONE: SCELTA DEI SITI DI CATTURA E CENSIMENTO DELLE SPECIE OSPITI PRESENTI; CATTURE, TRIALS SUL CAMPO, IDENTIFICAZIONE DI SPECIE E DEL GENOMA DI SPECIE SU CUI ABBIANO EFFETTUATO PASTI DI SANGUE MEDIANTE L'IMPIEGO DI TECNICHE BIOMOLECOLARI

Sebbene WNDV sia stato isolato da 75 specie zanzare, in Europa, il genere *Culex* è ritenuto quello epidemiologicamente più rilevante. In particolare *Culex pipiens* (nelle sue 2 forme biologiche *Cx.p. pipiens* e *Cx. p. molestus*) ed anche *Culex impudicus* è considerato un probabile vettore di trasmissione.

In particolare, nelle zone della Lombardia e del Veneto in cui la circolazione del WNDV è da anni registrata ininterrottamente, *Cx. pipiens* è ritenuto epidemiologicamente rilevante.

Cx. pipiens è la zanzara più comune in Italia, ubiquitaria, dotata di notevole plasticità ecologica, di cui esistono due forme con caratteristiche differenti: 1) *Cx. pipiens pipiens* ornitofila, rurale, si riproduce in piccole raccolte d'acqua dolce sia permanenti che temporanee; 2) *Cx. pipiens molestus*, antropofila, adattata prevalentemente ad ambienti antropizzati, stenogama, autogena, endofila e omodinamica, in grado di riprodursi sia in acque con elevato carico organico che in micro focolai, anche sotterranei. La caratteristica di *Cx. pipiens* di svernare come adulti, ed in particolare della forma *molestus* di rimanere attiva anche durante l'inverno in ambienti chiusi, è stata segnalata come possibile meccanismo di overwintering del virus della WN nelle zone temperate.

Nel corso del presente progetto si è voluto verificare la propensione di *Cx. pipiens* a nutrirsi su cane e maiale, anche rispetto ad altre specie notoriamente attrattive nei suoi confronti (es. pollame, equini).

Al fine di valutare l'attitudine di *Cx. pipiens* a nutrirsi su cane e maiale, sono stati condotti campionamenti di zanzare in due differenti situazioni ambientali:

- 1) Polispecifiche - aziende agricole con presenza di più specie notoriamente attrattive nei confronti di questa zanzara (es. pollame, equini, ecc)
- 2) Monospecifiche - porcilaie e canili: i dati su presenza ed abbondanza di *Cx. pipiens* in queste situazioni potranno fornire un dato quantitativo assoluto sull'attitudine di questa zanzara a nutrirsi sulle specie oggetto della presente ricerca.

Scelta dei siti (2011-2012)

Nella primavera del 2011 sono stati effettuati 11 sopralluoghi nelle province di Roma, Viterbo e Latina, finalizzati all'individuazione di siti delle due tipologie (monospecifica e polispecifica), idonei per l'attività di campionamento dei culicidi. In un'area di 0.5 km di raggio intorno ai siti ispezionati è stato effettuato un censimento degli animali domestici presenti.

Oltre alla presenza delle diverse specie rilevanti ai fini della ricerca, altri criteri di scelta del sito sono stati:

- 1) presenza di ricoveri diurni per le zanzare facilmente ispezionabili per la cattura diretta mediante aspirazione;
- 2) disponibilità di prese elettriche per il posizionamento delle trappole;
- 3) presenza nelle vicinanze di raccolte d'acqua, possibili focolai larvali;
- 4) facile accessibilità;

- 5) percezione di fastidio legato alla punture di zanzare da parte delle persone (proprietari od operai delle aziende, operatori dei canili, ecc.);
- 6) uso infrequente di insetticidi per la disinfestazione da mosche, zanzare ed altri insetti infestanti.

Nella scelta dei siti polispecifici, è stata considerata discriminante la presenza di pollai; essendo, infatti, *Culex pipiens* specie ornitofila, sarà particolarmente rilevante poter valutare l'attrattività di cane e maiale nei suoi confronti rispetto a quella del pollame.

Nella scelta dei siti monospecifici è stata posta particolare attenzione a che non vi fossero nel raggio di 500m altre specie animali in numerosità tali da rendere non significativi i risultati del campionamento.

Per i siti polispecifici sono state ispezionate per lo più aziende agricole a conduzione familiare di media/piccola dimensione; per i siti monospecifici, canili ed allevamenti di suini intensivi e rurali. Alcuni siti, inizialmente considerati idonei, sono stati successivamente scartati dopo 2-3 sessioni di cattura il cui esito negativo non aveva avuto successo. Un sito è stato campionato una sola volta, a causa della successiva mancanza di disponibilità del proprietario.

Nel corso del 2011, i siti selezionati per le catture sono stati i seguenti:

- 1) Canile Rifugio Roma: sito monospecifico, con presenza di circa 100 cani ricoverati in box e recinti in rete metallica;
- 2) Porcilaia Viterbo: sito monospecifico con porcilaia isolata con presenza di 5-7 suini, ricoverati in casotti in pietra con annesso recinto esterno;
- 3) Azienda polispecifica Viterbo 1: presenza di 2 pollai (per un totale di circa 100 polli), porcilaia con 3 suini, recinti con 20 cani e capannone per ricovero notturno di circa 300 ovini. Nelle strette vicinanze dell'azienda è presente un focolaio larvale attivo anche nei mesi estivi;
- 4) Azienda polispecifica Viterbo 2: con presenza di pollaio (circa 30 polli), recinti con cani da caccia (15 soggetti), porcilaia (3 suini), stalla con bovini, recinzione con ovini e box con 3 cavalli.

Nel 2012 sono stati effettuati ulteriori sopralluoghi, per sostituire il canile e l'azienda polispecifica Viterbo 2, siti in cui erano intervenuti problemi di ordine logistico. In loro sostituzione sono stati scelti:

- 1) Pensione/Clinica cani Viterbo: sito monospecifico con presenza di 20 cani in box in muratura con tetto in lamiera;
- 2) Canile Pistoia: sito monospecifico con presenza di 250 cani ricoverati in box e recinti in rete metallica;
- 3) Azienda polispecifica Viterbo 3: azienda agricola con porcilaia con 5-7 suini, recinti con circa 20 cani, recinti esterni con cavalli e bovini e un grosso appezzamento di terreno recintato con cinghiali.

Catture

I campionamenti dei culicidi sono stati effettuati, con periodicità quindicinale, per due anni consecutivi (2011-2012) nella stagione di massima attività dei vettori (periodo Giugno-Ottobre nel 2011 e maggio-settembre nel 2012).

Al fine di catturare il maggior numero di esemplari, in coincidenza con picchi di attività delle zanzare del genere *Culex*, in alcuni siti la frequenza delle catture è stata intensificata. Per le catture sono state utilizzate trappole di tipo CDC e IMT innescate con CO₂, BG Sentinel innescate con attrattivo odoroso e mediante aspirazione diretta nei siti di riposo. CDC e IMT sono note in letteratura come particolarmente efficaci nella cattura delle zanzare del genere *Culex*. La BG Sentinel, specificamente ideata per la cattura di zanzare del genere *Aedes* (in particolare *Ae. albopictus*, la zanzara tigre), è stata adottata in seguito ai buoni risultati di cattura di *Cx. pipiens* registrati durante il piano nazionale di sorveglianza per la WND.

Nel 2012 la IMT è stata preferita alla CDC per la maggior semplicità di utilizzo e per i migliori risultati ottenuti nel corso del 2011.

Il numero e la tipologia di trappole utilizzate in ciascun sito variavano secondo il numero e della diversità dei ricoveri animali presenti e dell'estensione areale del sito stesso. A titolo esemplificativo, nel canile in provincia di Roma è stata posizionata solo una trappola CDC/IMT, mentre nell'azienda mista Viterbo 1 hanno operato contemporaneamente due BG Sentinel e due CDC/IMT. Nei siti polispecifici in cui hanno operato più trappole contemporaneamente, al fine di verificare la diversa attrattività delle varie specie animali presenti, le trappole venivano posizionate in prossimità dei ricoveri delle diverse specie (es. pollaio, recinti cani, ecc.). Le catture sono state opportunamente identificate in base alla localizzazione della trappola. In questo modo è stato possibile elaborare i dati relativi alle catture di ciascuna localizzazione.

Nel corso del presente studio sono state effettuate complessivamente nei diversi siti di campionamento 74 catture: 36 nel 2011 e 38 nel 2012 (vedi Tabella).

Identificazione Culicidae

I ditteri della famiglia Culicidae sono stati osservati allo stereomicroscopio ed identificati a livello di specie mediante esame morfologico dei caratteri diagnostici, seguendo le chiavi analitiche di Severini *et al.* (Severini, Toma, Di Luca, Romi. 2009 Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti. *Fragmenta Entomologica*, 41 (2): 213-372). L'identificazione delle femmine è stata effettuata sugli esemplari *in toto*, mentre per i maschi è stato necessario l'allestimento di preparati microscopici, previa dissezione e successiva chiarificazione in lattofenolo dei genitali.

Le femmine replete (con presenza di sangue non digerito visibile nell'addome), opportunamente identificate e preservate, sono state successivamente sottoposte ad esami per l'identificazione molecolare della specie su cui era stato effettuato il pasto di sangue.

Identificazione del pasto di sangue

L'identificazione della specie di sangue contenuto nell'addome delle zanzare è stato effettuato mediante PCR e successivo sequenziamento.

Il bersaglio di PCR è rappresentato da un frammento del gene ribosomale 16S dal lavoro di Karlsson e Holmund del 2007, modificando il primer reverse in modo da amplificare una regione di circa 210 nucleotidi.

L'addome delle zanzare replete è stato trattato con un kit di estrazione di DNA e successivamente amplificato mediante PCR. Le sequenze dei prodotti di amplificazione sono state effettuate mediante metodo di Sanger ed elettroforesi capillare.

Estrazione del DNA dal sangue di zanzare replete

Per l'estrazione del DNA dal sangue delle zanzare replete è stato utilizzato un kit di estrazione (DNA extraction all lysis reagent, Life Technologies) che consta di 3 fasi:

- soluzione di lisi
- incubazione a 95°C di temperatura
- soluzione stabilizzante

Sono di seguito riportati i dati relativi alla PCR 16S per l'identificazione di specie (oligonucleotidi, miscele di reazione e cicli di amplificazione):

Primer F 16S- GAC GAG AAG ACC CTA TGG AGC

Primer R 16S- GATTGCGCTGTTATCCCT

Reagente	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
DNA		5
H ₂ O sterile		24,75
Buffer 5X	1	10
dNTPs mix (10 mM)	0.4mM	2
MgCl ₂ (25mM)	3mM	6
Primer F 16S (30 µM)	0.6µM	1
Primer R 16S (30 µM)	0.6µM	1
Taq Gold (5U//µl)	0,025	0,25
	tot	50

95°Cx10ø

94°Cx30ø

55°Cx1 min

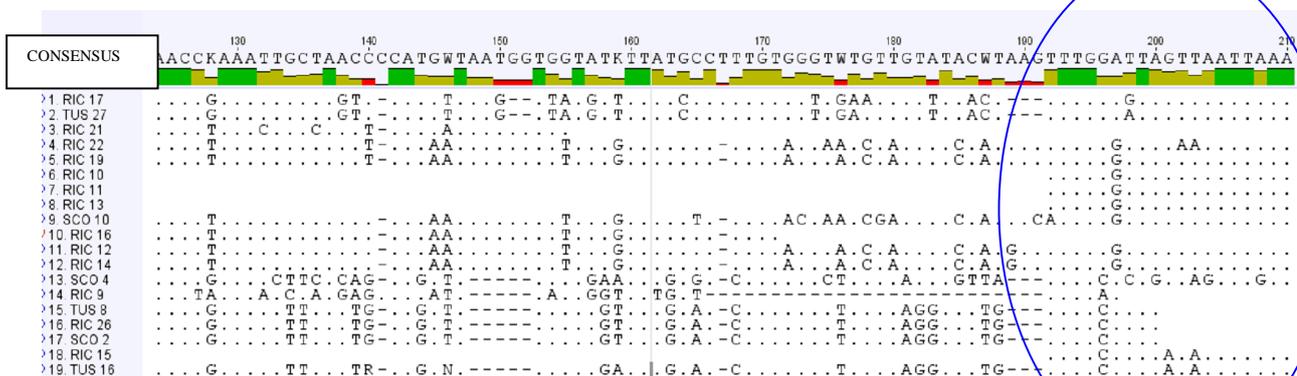
35cicli

72°Cx2ø0ö

72°Cx10ø

Sequenziamento di DNA

Dal lavoro di Karlsson et a. (Karlsson AO, Holmlund G. Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. Forensic Sci Int. 2007 Nov 15;173(1):16-20), la regione significativa ai fini dell'identificazione di specie è rappresentata dai primi 20-25 nt circa dopo il primer forward. Quindi per l'analisi delle sequenze si è tenuto conto in particolare di questa porzione. Le sequenze che presentavano problemi di lettura dell'elettroferogramma, proprio in questa porzione, sono state cimentate in banca dati, mediante BLAST (Basic Local Alignment



Search Tool), considerando un frammento di sequenza di almeno 80 nucleotidi (eccetto ric21 accettata con riserva). Per l'attribuzione della specie è stata considerata una similarità di sequenza, con le sequenze depositate, pari ad almeno il 95% d'identità. Nella figura viene mostrato l'allineamento delle sequenze ottenute: nel cerchio è evidenziata la regione (di 20-25 nucleotidi circa) sufficiente a distinguere le varie specie.

Il sequenziamento è stato eseguito mediante metodo di Sanger ed elettroforesi capillare ABI 310 (Applied).

La strategia per il sequenziamento automatizzato sviluppata dalla PE Applied Biosystems utilizza dideossinucleotidi trifosfati marcati al 3' (denominati dye terminators) e va a rilevare la fluorescenza dei quattro diversi coloranti che sono usati per marcare ed identificare i quattro dideossinucleotidi (A, C, G e T) incorporati all'estremità 3' della catena di DNA crescente. Ciascun colorante emette luce a diverse lunghezze d'onda quando è eccitato da un laser ad argon ionizzato. Tutti e quattro i colori e quindi tutte e quattro le basi possono essere rilevate e distinte mediante corsa elettroforetica che avviene all'interno di un apposito capillare. Naturalmente, i dideossinucleotidi, marcati all'estremità 3' vengono inseriti mediante un apposito ciclo di amplificazione, denominato "ciclo di sequenziamento" che porta ad una miscela di prodotti di estensione in cui, ogni filamento di DNA prodotto, termina in un proprio e specifico nucleotide.

I prodotti di PCR purificati e quantificati (con concentrazioni standard di appositi pesi molecolari) sono stati sottoposti al ciclo di sequenziamento utilizzando il Gene Amp PCR System 9700.

La miscela di reazione è composta da: x ng di amplicone purificato (3-10 ng di DNA stampo totale), 3 pmol di ciascun primer, 4 µl di Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix V 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 4 µl di Big Dye Terminator v 1.1 5X Sequencing buffer ed x µl di H₂O Grado Reagente fino ad un volume finale di 20 µl.

Il ciclo di amplificazione applicato è il seguente:

- 96°C per 2 minuti
- 25 cicli costituiti da: 96°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi, 60°C per 4 minuti
- 60°C per 4 minuti

Al termine del ciclo di sequenziamento, i Big Dye Terminators non incorporati sono stati rimossi tramite l'impiego del Big Dye Terminator X-Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Le sequenze ottenute con l'ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) sono registrate dal Software Sequencing Analysis (versione 5.3.1) che garantisce la raccolta dati e la visualizzazione dell'elettroferogramma.

Risultati

Sono state effettuate 74 catture, per un totale di 661 zanzare identificate.

Cx. pipiens è risultata la specie dominante in tutti i siti di campionamento (62,9% delle zanzare catturate), con l'eccezione del Canile PT, dove la dominante è risultata *Aedes albopictus* (zanzara tigre). I risultati relativi alla specie *Cx. pipiens* sono riassunti in Tabella

Tab. Catture della specie *Culex pipiens*, divisi per anno e per sito di cattura.

<i>Sito Cattura 2011</i>	N. Catture	Culicidae	<i>Culex pipiens</i>	<i>Cx. pipiens replete</i>
Canile RM	11	73	67	0
Porcilaia VT	8	81	72	12
Polispecifica VT1	8	136	70	21
Polispecifica VT2	9	72	27	8
Totale 2011	36	362	236	41
<i>Sito Cattura 2012</i>	N. Catture	Culicidae	<i>Culex pipiens</i>	<i>Cx. pipiens replete</i>
Canile VT	8	61	42	5
Canile PT	12	146	57	0
Polispecifica VT1	10	80	70	12
Polispecifica VT3	8	12	11	0
Totale 2012	38	299	180	18
Totale 2011-2012	74	661	416	59

Siti monospecifici: *Cx. pipiens* è stata catturata con numerosità paragonabili in tutti i siti monospecifici.

Siti polispecifici: nel sito VT1 nel 2011 la trappola in prossimità dei recinti dei cani ha catturato 42 *Cx. pipiens*, contro le 28 catturate da quella posizionata in prossimità del pollaio. Nel 2012 nella stessa azienda è stata posizionata un'ulteriore trappola, in prossimità di un ricovero di maiali, trappola che ha catturato lo stesso numero di esemplari di quella in prossimità dei recinti dei cani.

Nel sito VT2 la trappola posta tra porcilaia e recinti dei cani ha catturato un numero poco superiore di *Cx. pipiens* rispetto a quella posizionata in prossimità del pollaio (17/10).

Fra i 661 esemplari catturati, le femmine replete trasferite per l'identificazione dei pasti di sangue erano 93, di cui 59 della specie *Cx. pipiens*.

Circa la metà degli elettroferogrammi non erano ben leggibili, probabilmente per l'eccessiva degradazione del DNA nell'addome delle zanzare, e nonostante siano stati ripetuti si sono ottenuti i medesimi risultati.

L'identificazione dell'ospite su cui è stato effettuato il pasto di sangue è stata quindi ottenuta per 19 esemplari.

Il cane è risultato l'ospite più frequente, con il 52,4%, seguito dall'uomo, con il 28,6%; un unico esemplare (4,8%) si era nutrito sul maiale. Dato il ridotto numero di pasti di sangue identificati, non

è stata effettuata alcuna elaborazione statistica. Si è comunque confermato che *Cx. pipiens* su nutre su entrambe le specie (cane e maiale) prese in considerazione nella presente ricerca.

Discussione e Conclusioni

Per le finalità della ricerca, è interessante il dato quantitativo ottenuto nelle due stagioni di studio nei tre siti monospecifici (canili RM e VT e porcilaia), in cui *Cx. pipiens* è risultata la specie dominante.

Pur non trattandosi di alte numerosità, il dato indicherebbe che le due specie prese in considerazione (cane e maiale) attraggono *Cx. pipiens*, anche in assenza di altre specie animali nelle vicinanze.

Nel canile PT, sebbene questa specie non sia risultata la più numerosa, è stata in ogni caso presente in tutte le 12 catture effettuate nel periodo aprile-ottobre.

Al diverso numero di potenziali ospiti presenti nelle differenti strutture (canili e porcilaia) non hanno corrisposto catture significativamente diverse dal punto di vista quantitativo. Al contrario, è interessante notare come le catture più abbondanti siano state ottenute presso la porcilaia di VT dove più esiguo era il numero di animali mantenuti.

Più interessanti ancora sono alcuni dei risultati ottenuti nei siti polispecifici: in particolare nel sito VT1 nel 2011; la trappola posizionata in prossimità delle recinzioni con i cani da caccia ha catturato un numero maggiore di *Cx. pipiens* (42 esemplari) rispetto a quella posizionata nelle vicinanze del pollaio (28 esemplari).

Ciò è particolarmente importante e, considerata la nota ornitofilia di questa specie di zanzara, il dato è incoraggiante nell'indicare il cane come specie idonea ad un utilizzo per la sorveglianza sierologica della WND.

Nello stesso sito nel 2012 l'attrattività di maiali e cani è risultata assolutamente identica.

Anche nel sito VT2 (2011) i risultati ottenuti sono interessanti, dato che la trappola posizionata tra porcilaia e ricoveri dei cani ha catturato più *Cx. pipiens* di quella posizionata in prossimità del pollaio; sebbene la differenza quantitativa sia minima, questo risultato è un'ulteriore indicazione dell'attrattività di cani e maiali nei confronti del principale vettore del WND.

Sebbene le basse numerosità di zanzare catturate non abbiano permesso l'elaborazione statistica dei dati ottenuti, i risultati preliminari delle ricerche entomologiche condotte nel corso della ricerca sono incoraggianti e costituiscono un'importante premessa per l'approfondimento ai fini dell'impiego delle specie suina e canina ai fini della sorveglianza attiva sulla circolazione del virus WN.

WP 2

Studio e sviluppo di prodotti utilizzabili come strumenti diagnostici innovativi

Raccolta di campioni di sangue da equini risultati naturalmente infetti, da soggetti sieronegativi sottoposti a vaccinazione secondo protocolli predefiniti e da soggetti vaccinati e successivamente esposti ad infezione .

Per la verifica della risposta anticorpale nei confronti di proteine non strutturali del virus, differenti dai target comunemente impiegati attraverso i test attualmente disponibili, si è costituita una banca di campioni di tre differenti tipologie:

a) equini sicuramente negativi al test di riferimento mantenuti in zone indenni da infezione ó allo scopo sono stati acquisiti 50 sieri prelevati ad altrettanti soggetti nati e mantenuti in zone montane del territorio nazionale a dimostrata assenza di circolazione virale;

b) equini positivi a seguito di infezione naturale ó i 50 campioni collezionati erano stati prelevati a soggetti risultati positivi nel corso degli episodi di circolazione virale accertati nel 1998 in Toscana, a partire dal 2008 in Emilia Romagna e nel 2009 in provincia di Arezzo;

c) soggetti negativi e sottoposti a vaccinazione con il prodotto costituito da virus intero inattivato, secondo i protocolli indicati dal produttore (Duvaxin WND ó Fort Dodge Laboratories), autorizzato sul territorio nazionale. ó per lo scopo, presso il Centro veterinario militare di Grosseto dell'Esercito Italiano, sono state sottoposte a vaccinazione 60 fattrici, effettuando alle stesse 6 differenti prelievi di sangue: 1° prelievo (giorno 0), in occasione del primo intervento di vaccinazione; 2° prelievo (giorno 30) al momento del richiamo; 3° prelievo (giorno 60) a tre settimane dopo il richiamo; 4° prelievo (giorno 150) in occasione del richiamo annuale; 6° prelievo (giorno 170) a tre settimane dal richiamo annuale;

d) 5 campioni in 25 aliquote, resi disponibili dalla ditta Merial (Lione ó Francia), prelevati a soggetti vaccinati per WNV con il prodotto òRecombitek WNVö (vaccino ricombinante che impiega come vettore il canaripoxvirus che esprime i soli geni codificanti le proteine strutturali E ed M del virus); 5 campioni in 25 aliquote, prelevati a soggetti immunizzati con un vaccino a DNA sperimentale.

Ad esclusione dei campioni di controllo negativi (sieri di cui alla lettera a) e 1° prelievo di cui alla lettera b)), gli altri campioni hanno fornito esito positivo al test ELISA per la ricerca degli anticorpi totali, che reagisce anche nei confronti delle proteine strutturali.

I test ELISA diretti verso di anticorpi nei confronti di proteine non strutturali del virus WN avrebbero dovuto fornire reazioni negative quando cimentati con i sieri di cui alla lettera d).

SELEZIONE DELLE PROTEINE NON STRUTTURALI IN GRADO DI INDURRE UNA RISPOSTA IMMUNE: RICERCA BIBLIOGRAFICA, ACQUISIZIONE PRESSO DITTE SPECIALIZZATE DI PEPTIDI SINTETICI SELEZIONATI E SAGGIO DEI PEPTICI.

Fra i diversi lavori di caratterizzazione degli epitopi immunogeni delle proteine strutturali e non strutturali di WNV, ai fini del presente progetto, sono stati selezionati due lavori:

1) Epitope discovery in West Nile virus infection: Identification and immune recognition of viral epitopes. Curtis P. McMurtrey, Alina Lelic, Paolo Piazza, Ayan K. Chakrabarti, Eric J. Yablonsky, Angela Wahl, Wilfried Bardet, Annette Eckerd, Robert L. Cook, Rachael Hess, Rico Buchli, Mark Loeb, Charles R. Rinaldo, Jonathan Bramson and William H. Hildebrand. PNAS (2008); Volume 105; N° 8; pp.: 2981-2986

2) Rapid Determination of HLA B*07 Ligands from the West Nile Virus NY99 Genome. Anne S. De Groot, Caitlin Saint-Aubin, Andrew Bosma, Hakima Sbai, James Rayner and William Martin. Emerging Infectious Diseases (2001) ; Vol.7 ; N° 4.

Da Curtis P. et al. (2008), sono stati selezionati 4 epitopi sugli 8 della proteina NS1, 2 epitopi su 4 della proteina NS2B, 6 epitopi sui 25 della proteina NS3, 6 epitopi per la proteina NS4B ed 8 epitopi su 30 della proteina NS5.

Inoltre, da Anne S. et al. (2001), sono stati selezionati: 1 epitopo per la NS1 localizzato nella porzione della proteina compresa tra gli aminoacidi 338-352; 2 epitopi per la NS2A, di cui uno compreso tra l' aminoacido 1337 e l' aminoacido 4011 ed il secondo compreso tra l' aminoacido 1306 e 3918; 3 epitopi per la NS3 compresi tra l' aminoacido 1680 e l' aminoacido 5040, tra l' aminoacido 2098 e l' aminoacido 6288 e tra l' aminoacido 1777 e l' aminoacido 5331; 1 solo epitopo per la NS4A compreso tra l' aminoacido 2223 e l' aminoacido 6669 e 3 epitopi per la NS5 compresi tra l' aminoacido 2895 e l' aminoacido 8685, l' aminoacido 2895 e l' aminoacido 8686, l' aminoacido 3112 e l' aminoacido 9336.

Nel corso del 2011 sono stati condotti degli esperimenti preliminari al fine di valutare la possibilità di utilizzare i peptidi sintetici acquistati, per individuare quelli corrispondenti agli epitomi delle proteine non strutturali più idonei ai fini della successiva realizzazione di antigeni ricombinanti. Per problemi occorsi in fase di sintesi, il peptide 29 non è pervenuto.

In totale sono stati acquisiti 43 peptidi (5 da proteina envelope e 38 da proteine non strutturali - tabella 1).

Tabella 1: Elenco dei peptidi acquistati, loro sequenza aminoacidica e numero di aminoacidi

n ID	PROTEINA	SEQUENZA AMINOACIDICA	N. AA	n ID	PROTEINA	SEQUENZA AMINOACIDICA	N. AA
1	E	GCGLFGKGSIDTCA	14	23	NS3	RPRWIDARVY	10
2	E	LKGTTYGVC	9	24	NS3	SPHRVFNPNYL	10
3	E	ELEPPFGDSYIV	12	25	NS3	YTMDGEYRL	9
4	E	LFGGMSWITQGL	12	26	NS4A	VPGTKIAGML	10
5	E	SVGGVFTSV	9	27	NS4B	PATAWSLYA	9
6	NS1	TWKLERAVLGEVKSCTWPETHLWG	25	28	NS4B	TSLSINVQASAL	13
7	NS1	DFDYCPGTTVT	11	29	NS4B	VTLWEENGASSVWNATTAIGLCH	23
8	NS1	CRSCLPPLR	10	30	NS4B	SLFGQRIEV	9
9	NS1	GCWYGMERIP	10	31	NS4B	SLTSINVQA	9
10	NS1	RPQRHDEKTL	10	32	NS5	TCIYNMMGKREK	12
11	NS2A	AAKKKGASLL	10	33	NS5	GSRAMFMMWLGARFLEFEALGFLNEDHWL	29
12	NS2A	TPGLRCLNLD	10	34	NS5	ISREDQRGSGQVVTYALNTFTNL	23
13	NS2B	GWPATEVMTA	10	35	NS5	VQLVRMMEGEGV	12
14	NS2B	SAYTPWAILPS	11	36	NS5	GWYDWQQVPPFCSNHFTL	18
15	NS2B	RLDDDGNFQL	10	37	NS5	GRARISPGAGWNVNVRTACLAKSYAQMWW	27
16	NS3	GGVLWDTFSP	10	38	NS5	LLYFHRRDLRLMANAICSAVP	21
17	NS3	TTKGAALMSG	10	39	NS5	WVPTGRTTWSIH	12
18	NS3	EDRLCYGGPW	10	40	NS5	EPPEGVKYVL	10
19	NS3	DVIGLYGNVIMP	13	41	NS5	KPTGSASSLV	10
20	NS3	YISAIVQGERM	11	42	NS5	RPAADGRTVM	10
21	NS3	VLDLHPGAGKTR	12	43	NS5	ATWAENIQV	9
22	NS3	IPAGFEPPEML	10				

Legenda: E=envelope; NS=non strutturale

I peptidi liofilici sono stati inizialmente ricostituiti in PBS, portandoli ad una concentrazione di 5 mg/ml. I peptidi 4 e 5 sono risultati insolubili in tali condizioni, e, in base a linee guida sigma, si è proceduto alla solubilizzazione mediante aggiunta di DMSO.

A solubilizzazione completa tutti e 5 i peptidi sono stati diluiti ad una concentrazione finale di 1mg/ml. In considerazione di eventuali problemi di solubilità anche gli altri peptidi sono stati risospesi tutti in DMSO 10% alla concentrazione finale di 5 mg/ml e conservati a 620°C.

Si è deciso di iniziare le varie prove con i primi 5 peptidi (envelope) che avrebbero dovuto costituire il nostro controllo positivo su cui mettere a punto il protocollo ELISA per lo screening degli epitopi NS5.

Per lo sviluppo della prova dovevano essere definite le condizioni di bloccaggio delle piastre, a tal fine è stata effettuata una prova con il seguente protocollo:

- **ADSORBIMENTO:** dispensare 50 μ l di antigene e peptidi 1,2,3 (5 μ g/ml) precedentemente diluito alla diluizione d'uso in tampone carbonato/bicarbonato in una piastra NUNC Maxisorp da 96 pozzetti, fondo piatto.
- **INCUBAZIONE:** 37°C per 3 h
- **LAVAGGIO:** 3 volte con PBS +TWEEN allo 0,02%
- **BLOCCAGGIO:** dispensare BIOGRAD ® Blotting-Grade Blocker al 5% p/v nelle file 1-4 e 9-12 nelle file 5-8 dispensare PBS. Conservare a +4°C overnight.
- **LAVAGGIO:** lavare la piastra per 3 volte con PBS +TWEEN allo 0,02%
- **DISPENSAZIONE TAMPONE DILUENTE (PBS+Tween0,02%+1% di estratto di lievito):** dispensare 100 μ l di TD in tutti i pozzetti dei controlli antigene. Dispensare 50 μ l di TD nei pozzetti in cui verranno dispensati i sieri.
- **DISPENSAZIONE TAMPONE DILUENTE SIERI (TDS) (PBS+Tween0,02%+1% di estratto di lievito+ siero di topo 1%):** dispensare 100 μ l di TDS in tutti i pozzetti dei controlli antigene. Dispensare 50 μ l di TDS nei pozzetti in cui verranno dispensati i sieri.
- **DISPENSAZIONE SIERI IN ESAME:** dispensare 50 μ l di sieri in esame.
- **INCUBAZIONE:** 90' a 37°C.
- **LAVAGGIO:** lavare la piastra per 6 volte con PBS +TWEEN allo 0,02%
- **DISPENSAZIONE HRP:** prima del termine dell'incubazione preparare la soluzione di HRP diluendo l'HRP in TD 1:100. Dispensare 50 μ l di HRP. Incubare per 90' a 37°C.
- **LAVAGGIO:** lavare la piastra per 6 volte con PBS +TWEEN allo 0,02%
- **DISPENSAZIONE SUBSTRATO CROMOGENO:** durante l'incubazione scongelare un flacone di OPD per ogni piastra esaminata. Al termine del lavaggio attivare il cromogeno aggiungendo ad ogni flacone di OPD 4 μ l di H₂O₂. Dispensare 50 μ l di substrato in tutti i pozzetti. Incubare per 10-15 minuti a temperatura ambiente controllando periodicamente lo sviluppo del colore.
- **STOP DELLA REAZIONE:** al termine dell'incubazione dispensare 50 μ l di H₂SO₄ per fermare la reazione.
- **LETTURA:** leggere la piastra con un filtro a 492 nm con il bianco contro aria.

I risultati sono mostrati in tabella 2.

Tabella 2: risultati della prova di definizione dei metodi di bloccaggio

		DRY MILK				SIERO TOPO				DRY MILK+SIERO DI TOPO			
		HRP 1:100											
siero +	A	2,756	2,756	2,746	2,718	2,756	2,628	2,675	2,614	2,808	2,643	2,746	2,787
	B	2,81	2,721	2,713	2,647	2,737	2,647	2,661	2,737	2,763	2,729	2,781	2,791
siero -	C	2,485	2,646	2,706	2,661	2,613	2,619	2,489	2,661	2,53	2,826	2,683	2,758
	D	2,564	2,767	2,683	2,626	2,683	2,6	2,514	2,564	2,587	2,683	2,723	2,757
controlli antigene	E	0,18	0,07	0,071	0,081	0,166	0,181	0,179	0,185	0,178	0,097	0,2	0,121
	F	0,177	0,089	0,101	0,1	0,179	0,171	0,188	0,196	0,181	0,116	0,134	0,127
	G	0,182	0,091	0,152	0,099	0,183	0,164	0,17	0,196	0,187	0,106	0,127	0,123
	H	0,173	0,189	0,077	0,098	0,181	0,165	0,168	0,197	0,187	0,107	0,163	0,128
		AG	P1	P2	P3	AG	P1	P2	P3	AG	P1	P2	P3
		TD				TD+SIERO DI TOPO							

I controlli antigene dei vari metodi di bloccaggio sono risultati pressoché identici anche se il Blotting-Grade Blocker sembra essere il migliore dello stesso Blotting-Grade Blocker contenente il siero di topo.

Non essendo rilevabile differenza in termini di OD tra i sieri positivi e i sieri negativi è stato deciso di effettuare una cross titolazione con varie diluizioni di sieri, di hrp e di antigene secondo il seguente protocollo, al fine di identificare quello migliore da utilizzare come parametro di confronto.

La procedura seguita è la seguente:

- **ADSORBIMENTO** : Diluire l'antigene WND 1:5,1:10,1:20 in Tampone carbonato bicarbonato. Dispensare 50 l a pozzetto. Conservare a +4°C overnight.
- **LAVAGGI**: 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **SIERI**: È stata allestita una prepiastra con 192 microlitri di diluente (PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20) nella prima fila, a cui aggiungere 48 microlitri per raggiungere 240 (1:5). Per le diluizioni in base due successive si sono prelevati 150 microlitri dalla prima fila e aggiunti a 150 microlitri presenti nelle fila successiva. I sieri utilizzati sono un siero da animale naturalmente infetto come positivo e siero fetale equino come negativo
 - **INCUBAZIONE: 1h a 37°C**
 - **LAVAGGI**: 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **DISPENSAZIONE DEL CONIUGATO**: Horse Anti-IgG (Sigma) a tre diluizioni 1:2000 ; 1:4000 e 1:6000, 100 l a pozzetto
 - **INCUBAZIONE: 1h a 37°C**
- **LAVAGGI**: 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **DISPENSAZIONE DEL SUBSTRATO**: o-Phenylenediamine (OPD) 100 l a pozzetto
- **INCUBAZIONE**: Al riparo dalla luce per 8-10'

- STOP DELLA REAZIONE: al termine dell'incubazione dispensare 50 μ l di H₂SO₄ per fermare la reazione.
- LETTURA: leggere la piastra con un filtro a 492 nm con il bianco contro aria.

I risultati sono mostrati in tabella 3 e nei grafici 1-3.

Tabella 3: Risultati della prova di titolazione

	ANTIGENE 1:5						ANTIGENE 1:10						
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
5	2,935	1,947	2,565	0,934	2,818	0,303	3,055	1,961	2,906	1,311	2,142	1,104	5
10	2,813	0,829	2,617	0,595	2,349	0,574	2,994	1,033	2,793	1,013	1,432	0,555	10
20	2,262	0,472	2,099	0,388	1,866	0,294	2,873	0,708	2,311	0,506	1,999	0,402	20
40	1,606	0,365	1,394	0,26	1,305	0,26	2,059	0,467	1,765	0,345	1,57	0,308	40
80	1,2	0,287	0,949	0,205	0,902	0,207	1,404	0,393	1,233	0,275	1,07	0,227	80
160	0,749	0,239	0,584	0,16	0,622	0,17	1,227	0,27	0,845	0,211	0,711	0,176	160
320	0,542	0,215	0,42	0,142	0,382	0,131	0,709	0,238	0,534	0,172	0,515	0,151	320
CR	0,171	0,159	0,105	0,107	0,105	0,097	0,183	0,188	0,12	0,109	0,09	0,087	CR
	HRP 2000		HRP 4000		HRP 6000		HRP 2000		HRP 4000		HRP 6000		

	ANTIGENE 1:20					
	+	-	+	-	+	-
5	2,857	2,126	2,432	1,398	1,665	0,634
10	2,928	1,195	2,696	0,924	2,464	0,451
20	2,801	0,729	1,941	0,572	1,98	0,382
40	2,449	0,566	1,852	0,433	1,459	0,358
80	1,675	0,417	1,118	0,338	0,955	0,275
160	1,176	0,334	0,78	0,26	0,657	0,211
320	0,708	0,266	0,58	0,199	0,516	0,17
CR	0,151	0,15	0,098	0,097	0,083	0,083
	HRP 2000		HRP 4000		HRP 6000	

Grafico 1: Risultati della prova di titolazione : HRP 1:2000

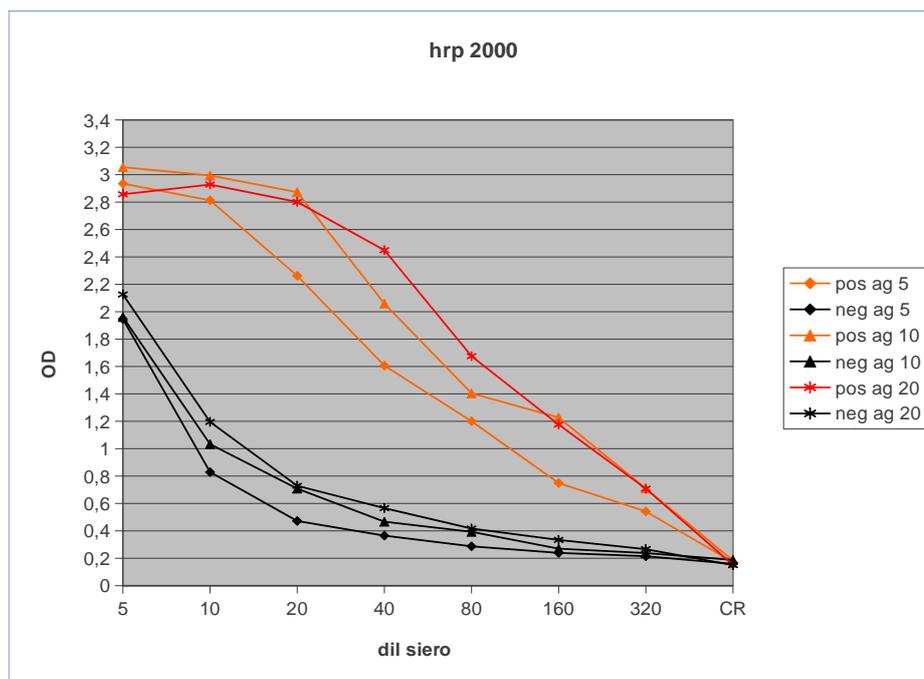
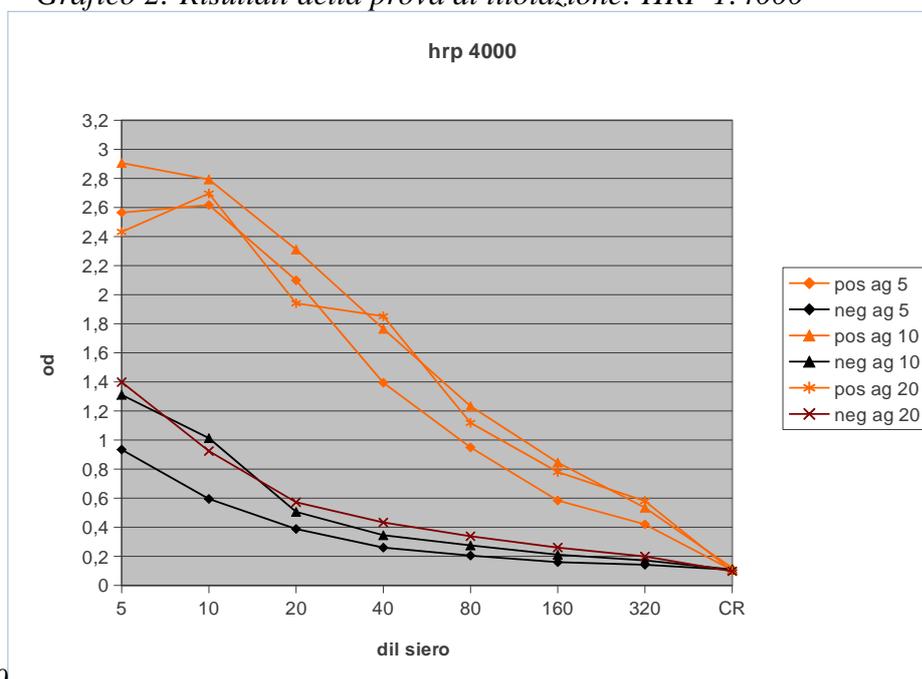
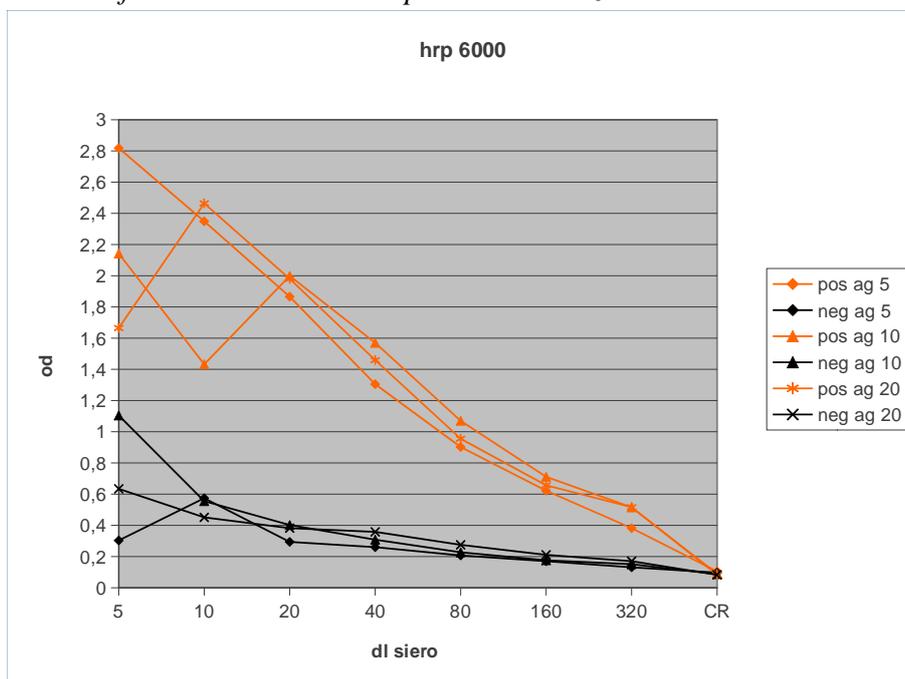


Grafico 2: Risultati della prova di titolazione: HRP 1:4000



11:4000

Grafico 3: Risultati della prova di titolazione: HRP 1:6000



Sono state scelte le seguenti diluizioni: Antigene 1:10, siero 1:80 e HRP 1:4000.

Con questi valori si sono ritestati i peptidi diluiti 2,5 e 10 g/ml con la seguente procedura:

- **ADSORBIMENTO:** Antigene intero WND diluito 1:10 in Tampone carbonato bicarbonato, 100 l a pozzetto. Conservare a +4°C overnight. Peptidi ricombinanti: diluiti a 2, 5 e 10 g/ml in Tampone carbonato bicarbonato.
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **SIERI:** Sono state allestite delle provette per i 3 sieri (vaccinato, infetto, negativo) alle diluizioni 1:40, 1:80, 1:160. Il diluente è PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20
 - **INCUBAZIONE a 37°C per 90'**
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **DISPENSAZIONE DEL CONIUGATO:** Horse Anti-IgG (Sigma) 1:4000 in PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20, 100 l a pozzetto.
- **INCUBAZIONE a 37°C per 90'**
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **DISPENSAZIONE DEL SUBSTRATO:** o-Phenylenediamine (OPD) 100 l a pozzetto
- **INCUBAZIONE:** Al riparo dalla luce per 8-10'
- **STOP DELLA REAZIONE:** al termine dell'incubazione dispensare 50 l di H₂SO₄ per fermare la reazione.
- **LETTURA:** leggere la piastra con un filtro a 492 nm con il bianco contro aria.

Tabella 4: Risultati della prova con i peptidi utilizzando HRP 1: 4000.

PEP1												
	40	80	160	40	80	160	40	80	160	AG BRESCIA	K HRP	
POSITIVO	1,136	0,918	0,775	0,531	0,831	0,754	0,473	0,86	0,704	1,233	1,12	0,253
INFETTO	0,979	0,857	0,731	0,695	0,761	0,696	0,807	0,797	0,633	0,963	0,933	3,085
POSITIVO	1,088	0,907	0,707	0,726	0,868	0,697	0,809	0,77	0,65	0,398	0,403	
VACCINATO	1,105	0,901	0,679	1,007	0,912	0,67	0,885	0,791	0,618	0,167	0,149	
NEGATIVO	1,297	1,156	0,905	0,838	1,16	0,971	0,792	1,1	0,926			
	1,553	1,151	0,95	1,138	1,048	1,058	0,742	1,109	0,926			
CONTROLLO	0,262	0,267	0,269	0,255	0,265	0,264	0,243	0,245	0,257			
PEPTIDE	0,252	0,275	0,262	0,258	0,263	278	0,259	0,251	0,256			
	2			5			10					

PEP2												
	40	80	160	40	80	160	40	80	160	AG BRESCIA	K HRP	
POSITIVO	0,96	0,916	0,713	0,967	0,821	0,653	0,746	0,68	0,629	1,389	1,405	3,617
INFETTO	0,947	0,884	0,687	0,928	0,82	0,619	0,872	0,754	0,608	0,92	0,929	3,276
POSITIVO	1,107	0,908	0,65	0,987	0,786	0,629	0,923	0,769	0,599	0,344	0,384	
VACCINATO	1,114	0,892	0,629	0,941	0,825	0,582	0,96	0,753	0,566	0,139	0,148	
NEGATIVO	1,388	1,146	0,848	1,03	1,041	0,773	1,293	1,013	0,795			
	1,219	1,147	0,855	1,306	1,078	0,791	1,087	1,271	0,781			
CONTROLLO	0,23	0,231	0,231	0,211	0,215	0,219	0,21	0,212	0,227			
PEPTIDE	0,234	0,26	0,247	0,232	0,233	0,232	0,229	0,234	0,235			
	2			5			10					

PEP3												
	40	80	160	40	80	160	40	80	160	AG BRESCIA	K HRP	
POSITIVO	1,251	1,109	0,832	1,308	1,08	0,836	1,186	1,017	0,799	1,213	1,339	0,65
INFETTO	1,372	1,072	0,811	1,378	1,084	0,807	1,298	1,015	0,755	0,87	0,877	2,674
POSITIVO	1,285	0,971	0,713	1,167	1,049	0,741	1,2	0,881	0,711	0,3	0,315	
VACCINATO	1,241	0,969	0,738	1,225	0,939	0,716	1,286	0,919	0,681	0,132	0,131	
NEGATIVO	1,646	1,303	1,015	1,575	1,286	0,971	1,673	1,27	0,963			
	1,63	1,343	1,011	1,578	1,26	0,955	1,523	1,234	0,979			
CONTROLLO	0,211	0,207	0,208	0,203	0,206	0,205	0,222	0,213	0,217			
PEPTIDE	0,216	0,226	0,22	0,215	0,224	0,226	0,208	0,22	0,216			
	2			5			10					

Sono risultate delle discrepanze tra i controlli dell'HRP ed i sieri negativi sono risultati ancora reattivi quanto i positivi. Si è ripetuta la prova utilizzando un solo peptide, il numero uno, costituito da 14 aa a 2 e 5 g/ml, aggiungendo un altro siero negativo di controllo, il siero negativo della C-ELISA messa a punto dall'Istituto zooprofilattico di Brescia, il siero fetale bovino ed il siero di topo.

Inoltre, sono stati confrontati due metodi di adsorbimento.

Metodo A: ADS con tampone bicarbonato per l'adsorbimento e poi PBS+Blotting-Grade Blocker per gli altri step.

Metodo B: PBS+Blotting-Grade Blocker in ogni fase della prova. Inserito il controllo peptidi (solo TD) e il controllo HRP (solo Tampone Carbonato Bicarbonato o TD).

Allo scopo, è stata seguita la seguente procedura:

- **ADSORBIMENTO:** Antigene intero WND diluito 1:10 in Tampone carbonato bicarbonato e PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20, 100 l a pozzetto. Conservare a +4°C overnight. Peptidi ricombinanti: diluiti a 2 e 5 g/ml in Tampone carbonato bicarbonato e PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20.
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **BLOCCAGGIO** piastra A con PBS+Blotting-Grade Blocker a 37°C per 120'.
- **SIERI:** Sono state allestite delle provette per i 5 sieri (vaccinato, infetto e negativo, per cui si usa il siero fetale bovino, negativo controllo WND BS, siero fetale bovino e siero di topo) e per le diluizioni 1:40,1:80,1:160. il diluente è PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20; 100 l a pozzetto.
- **INCUBAZIONE a 37°C per 90'**
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **DISPENSAMENTO DEL CONIUGATO:** Horse Anti-IgG (Sigma) 1:4000 in PBS, 3% Blotting-Grade Blocker, 0.05% Tween 20, 100 l a pozzetto.
- **INCUBAZIONE a 37°C per 90'**
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra i lavaggi.
- **DISPENSAMENTO DEL SUBSTRATO:** *o*-Phenylenediamine (OPD) 100 l a pozzetto
- **INCUBAZIONE:** Al riparo dalla luce per 8-10'
- **STOP DELLA REAZIONE:** al termine dell'incubazione dispensare 50 l di H₂SO₄ per fermare la reazione.
- **LETTURA:** leggere la piastra con un filtro a 492 nm con il bianco contro aria.

I risultati sono mostrati in tabella 5.

Tabella 5: Risultati della prova 27-9-11 (N1: Controllo negativo Kit Brescia; N2: Siero fetale equino; SFB: Siero Fetale Bovino, SM: siero di topo

PEP1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
METODO A	40		80		160		40		80		160	
INFETTO	1,084	0,584	0,723	1,149	0,879	0,62	0,381	0,312	1,033	1,034	0,845	0,901
N1	1,406	1,329	1,147	1,166	0,865	0,865	1,328	1,015	0,976	0,898	0,864	0,918
N2	1,742	1,747	1,462	0,936	1,017	1,006	0,913	1,289	1,3801	1,428	1,038	1,072
SFB	0,225	0,219	0,227	0,265	0,231	0,222	0,214	0,251	0,235	0,248	0,237	0,262
SM	0,27	0,239	0,238	0,291	0,271	0,241	0,221	0,263	0,238	0,28	0,234	0,274
K PEP E K HRP	0,248	0,237	0,237	1,109	1,099	1,073	0,225	0,231	0,241	1,046	1,05	0,961
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	1,475	0,273	0,248	0,073	0,078	0,071	1,469	0,26	0,243	0,094	0,087	0,098
	1,321	0,265	0,259	0,067	0,074	0,072	1,459	0,304	0,247	0,109	0,096	0,1
	INFETTO	N1	N2	SFB	SM	KAGBS	INFETTO	N1	N2	SFB	SM	KAGBS
	2						5					

PEP1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
METODO B	40		80		160		40		80		160	
INFETTO	0,279	0,289	0,156	0,162	0,152	0,16	0,316	0,265	0,234	0,212	0,183	0,203
N1	0,157	0,143	0,112	0,116	0,093	0,104	0,17	0,17	0,15	0,152	0,122	0,13
N2	0,223	0,198	0,147	0,149	0,114	0,114	0,217	0,247	0,178	0,194	0,148	0,155
SFB	0,058	0,092	0,059	0,065	0,079	0,073	0,077	0,126	0,115	0,147	0,109	0,1
SM	0,089	0,065	0,094	0,09	0,146	0,093	0,093	0,1	0,067	0,103	0,125	0,133
K PEP E K HRP	0,06	0,057	0,053	0,065	0,084	0,082	0,076	0,08	0,171	0,102	0,107	0,107
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	0,209	0,137	0,175	0,123	0,082	0,086	0,229	0,14	0,251	0,109	0,112	0,16
	0,197	0,136	0,166	0,07	0,089	0,084	0,237	0,166	0,202	0,11	0,095	0,124
	INFETTO	N1	N2	SFB	SM	KAGBS	INFETTO	N1	N2	SFB	SM	KAGBS
	2						5					

Sulla base di questa prova sono state fatte le seguenti considerazioni:

- Il metodo B non risulta valido: da capire se ci sono problemi di eccessivo bloccaggio, se il latte interferisce con l'adsorbimento del peptide o se il pH della soluzione inibisce l'adsorbimento. È possibile che il latte interferisca con l'adsorbimento dei peptidi perché potrebbe provocare cambiamenti di pH. A pH bassi, un aminoacido è presente come catione e, a pH elevato, come anione..
- Le condizioni migliori di adsorbimento dei peptidi dovrebbero verificarsi nei valori di pH in cui gli aminoacidi presentano una carica netta (ione dipolare). (Cap. n.1: Principi generali della ricerca biochimica; Paragrafo 1.2.1: Effetti del pH sulle attività biologiche. Keith Wilson and Kennet H. Goulding. In Biochimica Applicata Raffaello Cortina Editore; pag.7-12.
- riguardo al controllo antigene intero (Brescia): le diluizioni dai noi scelte si sono rivelate ancora una volta ottime. I sieri non equini hanno lo stesso OD del controllo antigene. I sieri equini negativi e positivi sono ben distinguibili.
- il controllo peptide rimane stabile con un OD di 0.24
- il controllo hrp invece presenta un OD di 1 circa
- i due sieri non equini hanno lo stesso OD del controllo peptide
- i sieri equini hanno una particolarità: i negativi hanno un OD maggiore del positivo, dobbiamo ragionare sui motivi. È forse possibile che i peptidi non siano stati perfettamente adsorbiti per cui piccole porzioni possano essere riconosciuti da anticorpi WNV-Non specifici presenti nei sieri negativi. In letteratura esistono esempi di falsi positivi che vengono attribuiti al cattivo adsorbimento dei peptidi ed alla presenza di anticorpi specifici per piccolissimi apteni composti da ~ 5 aminoacidi presenti proprio sui peptidi utilizzati come antigeni. Bibliografia. Principi e metodi per la ricerca degli anticorpi dell'epatite C nel siero. Marianna Renis. Biologi italiani; Giugno 2014; pag.39-51.

- la diluizione del peptide non sembra influenzare gli OD, almeno per quanto riguarda i sieri non equini. Per gli equini ci sono delle discrepanze nelle differenti diluizioni

Si è deciso quindi di testare nuovamente i primi tre peptidi con la seguente procedura:

- **ADSORBIMENTO:** Peptidi 1,2,3 e (1+2+3) diluiti in Tampone carbonato bicarbonato a 15,45,50 g/ml Adsorbite quattro piastre, identiche a coppie (vedi layout nei risultati). 100 l a pozzetto. Antigene intero WND diluito 1:10 in Tampone carbonato bicarbonato, 100 l a pozzetto. Conservare a +4°C overnight.
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **BLOCCAGGIO** Una coppia di piastre bloccata con PBS+Tween+ Estratto di lievito al 1%p/v+ BSA al 3%, l'altra con PBS+Tween+ Estratto di lievito al 1%p/v+ siero di topo al 1%. 37°C 60'.
- **SIERI:** PBS+Tween per le piastre con BSA (BSA esaurito altrimenti si sarebbe usato anche per i sieri); PBS+Tween+ Estratto di lievito al 1%p/v per le altre. 100 l per pozzetto di sieri diluiti come da layout.

- ***INCUBAZIONE a 37°C per 90'***

- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **DISPENSAZIONE DEL CONIUGATO:** Horse Anti-IgG (Sigma) 1:4000 (diluenti usati uguali a quelli dei sieri per ogni coppia di piastre), 100 l a pozzetto.
- **INCUBAZIONE a 37°C per 90'**
- **LAVAGGI:** 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
- **DISPENSAZIONE DEL SUBSTRATO:** *o*-Phenylenediamine (OPD) 100 l a pozzetto
- **INCUBAZIONE:** Al riparo dalla luce per 8-10'
- **STOP DELLA REAZIONE:** al termine dell'incubazione dispensare 50 l di H₂SO₄ per fermare la reazione.
- **LETTURA:** leggere la piastra con un filtro a 492 nm con il bianco contro aria.

I risultati sono mostrati nelle tabelle 6 e 7.

Tabella 6: Risultati delle piastre bloccate con PBS+Tween+ Estratto di lievito al 1%p/v+ siero di topo all'1%.

T

SIERO DI TOPO													
PEP 1+2+3							PEP 1						
15		30			45		15		30			45	
INFETTO 20	1,84	1,875	1,826	1,963	1,816	1,889	1,976	1,999	1,783	1,809	1,855	1,982	INFETTO 20
INFETTO 40	1,364	1,341	1,286	1,325	1,274	1,331	1,527	1,437	1,288	1,335	1,331	1,371	INFETTO 40
N1 20	1,801	1,773	1,749	1,788	1,685	1,768	1,859	1,832	1,729	1,794	1,741	1,817	N1 20
N1 40	1,269	1,267	1,191	1,386	1,224	1,913	1,391	1,358	1,257	1,239	1,243	1,259	N1 40
KAG	0,097	0,086	0,124	0,105	0,12	0,109	2,037	2,006	1,841	1,885	1,862	1,939	N2 20
KHRP	0,108	0,101	0,099	0,106	0,105	0,104	1,935	1,985	1,82	1,92	1,793	1,82	N2 40
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	2,765	2,052	0,534	0,348	0,097	0,108	0,113	0,113	0,105	0,112	0,117	0,137	KAG
	2,743	2,257	0,608	0,403	0,089	0,124	0,132	0,109	0,108	0,115	0,126	0,129	KHRP
	INFETTO 20	INFETTO 40	N1 20	N1 40	KAG	KHRP							
PEP 2							PEP 3						
15		30			45		15		30			45	
INFETTO 20	2,114	2,183	2,205	1,984	2,087	2,038	2,306	1,767	1,608	1,741	1,753	1,741	INFETTO 20
INFETTO 40	1,746	1,6	1,664	1,66	1,587	1,531	1,846	1,241	1,371	1,346	1,338	1,457	INFETTO 40
N1 20	1,905	1,856	1,958	1,881	1,814	1,808	2,343	1,769	1,714	1,661	1,72	1,803	N1 20
N1 40	1,426	1,348	1,428	1,465	1,273	1,261	1,831	1,228	1,181	1,158	1,239	1,315	N1 40
KAG	0,074	0,07	0,107	0,075	0,09	0,066	2,488	1,731	1,652	1,742	1,779	1,886	N2 20
KHRP	0,173	0,073	0,081	0,079	0,074	0,071	2,466	1,77	1,768	1,764	1,868	1,932	N2 40
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	3	2,311	0,601	0,393	0,093	0,076	0,086	0,072	0,084	0,077	0,087	0,111	KAG
	2,702	2,448	0,625	0,379	0,082	0,87	0,093	0,077	0,072	0,072	0,084	0,083	KHRP
	INFETTO 20	INFETTO 40	N1 20	N1 40	KAG	KHRP							

Tabella 7: Risultati delle piastre bloccate con PBS+Tween+ Estratto di lievito al 1%p/v+ BSA 3%.

BSA													
PEP 1+2+3							PEP 1						
15		30			45		15		30			45	
INFETTO 20	1,626	1,694	1,521	1,683	1,62	1,632	1,778	1,317	1,245	1,339	1,333	1,326	INFETTO 20
INFETTO 40	1,24	1,196	1,159	1,173	1,156	1,178	1,276	1,262	1,159	1,154	1,162	1,14	INFETTO 40
N1 20	1,668	1,544	1,889	1,491	1,522	1,525	1,626	1,914	1,139	1,528	1,527	1,048	N1 20
N1 40	1,104	1,027	1,075	1,004	0,0939	0,98	1,044	1,074	0,954	1,019	0,995	1,037	N1 40
KAG	0,099	0,091	0,099	0,084	0,092	0,098	1,897	1,838	1,667	1,674	1,78	1,881	N2 20
KHRP	0,106	0,092	0,078	0,102	0,1	0,097	1,57	1,555	1,37	1,433	1,536	1,545	N2 40
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	2,436	1,788	0,573	0,392	0,115	0,104	0,099	0,112	0,103	0,104	0,1	0,102	KAG
	2,427	1,898	0,599	0,408	0,105	0,088	0,153	0,154	0,104	0,102	0,11	0,107	KHRP
	INFETTO 20	INFETTO 40	N1 20	N1 40	KAG	KHRP							
PEP 2							PEP 3						
15		30			45		15		30			45	
INFETTO 20	1,169	1,803	1,495	1,543	1,521	1,145	1,566	1,381	1,697	1,74	1,422	1,341	INFETTO 20
INFETTO 40	1,4	1,379	1,316	1,276	1,31	1,284	1,619	1,609	1,553	1,907	1,557	1,599	INFETTO 40
N1 20	2,08	1,703	1,798	1,735	1,71	1,642	1,908	1,957	1,841	2,3	1,92	1,915	N1 20
N1 40	1,163	1,107	1,071	1,082	1,012	1,047	1,339	1,371	1,252	1,589	1,3	1,328	N1 40
KAG	0,082	0,083	0,074	0,069	0,072	0,096	2,12	2,046	2,073	2,533	2,112	1,905	N2 20
KHRP	0,101	0,092	0,098	0,098	0,101	0,114	1,805	1,853	1,789	2,195	1,723	1,79	N2 40
CONTROLLO ANTIGENE BRESCIA	2,71	1,404	0,682	0,445	0,119	0,105	0,1	0,096	0,102	0,102	0,093	0,14	KAG
	2,909	1,855	0,636	0,565	0,107	0,098	0,099	0,108	0,105	0,109	0,061	0,118	KHRP
	INFETTO 20	INFETTO 40	N1 20	N1 40	KAG	KHRP							

Dalla prova si desume che il bloccaggio con BSA è migliore del Siero di topo anche se entrambi hanno reso la DO del K HRP <0,3.

Per verificare l'effettivo adsorbimento dei peptidi alla piastra, di cui ancora non c'è evidenza certa, si è proceduto a prova in parallelo utilizzando il kit WND Brescia, il kit WND Pasteur, e il KIT ELISA CTB AIE per verificare se i peptidi causano una diminuzione dell'OD.

La procedura seguita è la seguente:

- 1 ADSORBIMENTO: Peptidi 1 diluito in Tampone carbonato bicarbonato a 10,40 g/ml Adsorbite tre piastre ognuna con due colonne di pozzetti per ogni diluizione di peptide, come da

layout. 100 l a pozzetto. Conservare a +4°C overnight.

- 2 LAVAGGI: 3 lavaggi con PBS + 0.05% Tween 20 con 10' di attesa tra un lavaggio e l'altro.
 - 3 ADSORBIMENTI SECONDARI: 1 Piastra adsorbita con catcher anemia infettiva diluito come da Mr; 1 Piastra adsorbita con ads WND BS diluito come da Mr, 1 Piastra adsorbita con Ag BS 1:10 per la WND Pasteur.
 - 4 Ogni piastra ha poi seguito la procedura relativa.
- I risultati sono mostrati nelle tabelle 8-10.

Tabella 8: Risultati della verifica adsorbimento con il kit WND PASTEUR

WND PASTEUR							VARIAZIONE DI OD IN % VS CONTROLLO PROVA	
	10		40		CONTROLLO PROVA		10	40
INFETTO 40	2,852	2,906	2,721	2,721	2,878	2,721	2,8	-2,8
INFETTO 80	3,044	3,178	3,074	3,074	3,442	3,375	-8,7	-9,8
N1 40	1,225	1,174	1,174	1,536	0,588	0,666	91,3	116,1
N1 80	0,76	0,735	0,823	0,786	0,275	0,295	162,3	182,3
N2 40	1,635	1,601	1,72	1,787	0,632	0,619	158,7	180,3
N2 80	1,217	1	1,053	1,234	0,693	0,448	94,3	100,4
KAG	0,144	0,126	0,142	0,13	0,121	0,127	8,9	9,7
KHRP	0,135	0,134	0,137	0,141	0,133	0,137	-0,4	3,0

Tabella 9: Risultati della verifica adsorbimento con il kit CTB AIE

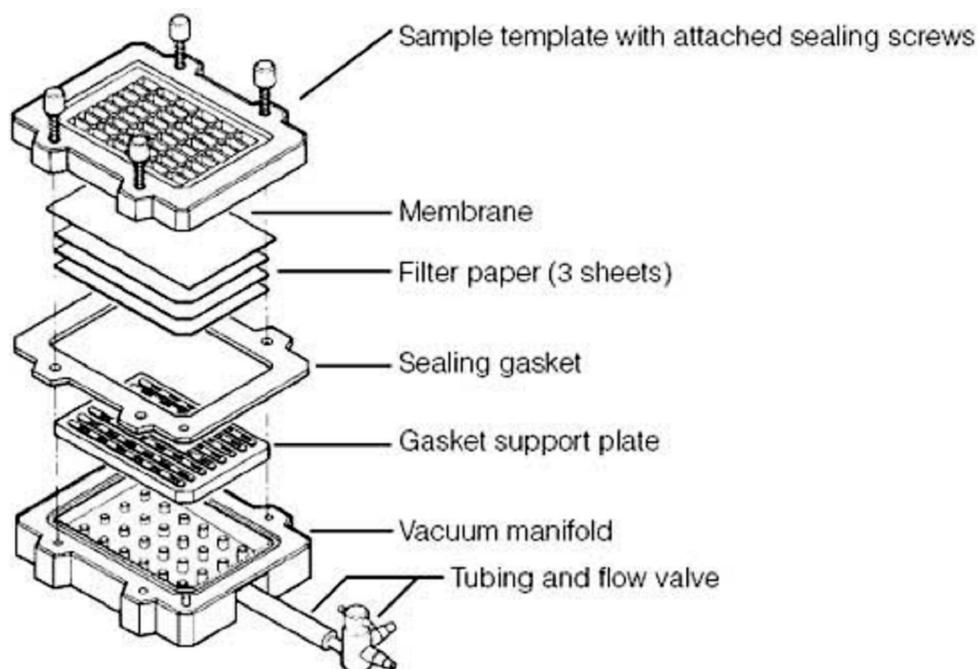
CTB AIE							VARIAZIONE DI OD IN % VS CONTROLLO PROVA	
	10		40		CONTROLLO PROVA		10	40
CR	0,081	0,08	0,081	0,089	2,583	2,654	-96,9	-96,8
CR	0,057	0,06	0,057	0,06	2,592	2,592	-97,7	-97,7
B	0,067	0,069	0,071	0,072	0,099	0,097	-30,6	-27,0
B	0,056	0,06	0,061	0,061	0,093	0,092	-37,3	-34,1
K-	0,066	0,064	0,073	0,066	2,229	2,515	-97,3	-97,1
K-	0,079	0,081	0,084	0,083	2,216	2,508	-96,6	-96,5
K+	0,066	0,067	0,073	0,063	0,079	0,075	-13,6	-11,7
K+	0,074	0,07	0,069	0,071	0,089	0,08	-14,8	-17,2

Tabella 10: Risultati della verifica adsorbimento con il kit WND BS

WND BS	WND BS						VARIAZIONE DI OD IN % VS CONTROLLO PROVA	
	10		40		CONTROLLO PROVA		10	40
INFETTO 40	0,082	0,088	0,082	0,076	0,235	0,24	-64,2	-66,7
INFETTO 80	0,072	0,075	0,07	0,064	0,318	0,341	-77,7	-79,7
N1 40	0,322	0,269	0,396	0,313	2,333	2,26	-87,1	-84,6
N1 80	0,441	0,426	0,555	0,456	2,385	2,27	-81,4	-78,3
N2 40	0,186	0,195	0,238	0,202	2,361	2,265	-91,8	-90,5
N2 80	0,196	0,298	0,276	0,207	2,373	2,32	-89,5	-89,7
KAG	0,151	0,166	0,173	0,154	2,203	2,215	-92,8	-92,6
KHRP	0,162	0,192	0,208	0,179	2,161	2,238	-92,0	-91,2

Non essendo i risultati soddisfacenti abbiamo testato i peptidi in DOTBLOT secondo il protocollo Ren Lab Peptide Dot Blot Specificity Screening (Figura 1).

Figura 1: Apparecchiatura per DOTBLOT



Oltre ai 5 peptidi (envelope) è stato esaminato anche l'antigene virale WND, secondo il seguente protocollo:

1. Dispensare 1ml di peptide su membrana di nitrocellulosa con uso di Biomek robot, in piastre da 96 pozzetti (Per un totale concentrazione 0.2 g peptide per punto peptide.)
2. Consentire ai peptidi di asciugare sulla membrana.
3. Bloccaggio per 1 ora con il 5% di latte scremato in TBS-T.
4. Lavare una volta con TBS-T.
5. Incubare con anticorpo primario in 5% di latte scremato in TBS-T notte a 4 ° C.
6. Lavare tre volte con TBS-T, cinque minuti ciascuno.
7. Incubare con anticorpo secondario in 5% di latte scremato in TBS-T, per 1 ora a temperatura ambiente.
8. Lavare tre volte con TBS-T, cinque minuti ciascuno.
9. Sviluppare con ECL. (Usato Substrato OPD di anemia infettiva)

Il risultato è stato un leggero background presente peraltro su tutti gli spot compresi quelli trattati con siero negativo.

Conclusioni

In fase di progettazione si era pensato che se l'approccio attraverso l'impiego dei peptidi sintetici avesse fornito indicazioni utili relativamente alle caratteristiche di immunogenicità dei rispettivi epitopi, ciò avrebbe comportato un considerevole vantaggio rispetto alla successiva fase di selezione e produzione delle proteine ricombinanti.

Questa fase, a causa delle difficoltà incontrate, non solo non ha prodotto risultati utili per il prosieguo del lavoro, ma ha anche comportato un considerevole dispendio di energie e risorse, causa i ripetuti tentativi effettuati per valutare l'efficacia della metodologia, modificando di volta in volta ogni variabile e le relative condizioni operative.

I ritardi accumulati per questi motivi (circa 12 mesi) hanno di conseguenza causato ripercussioni rispetto ai tempi ed alla conclusione dell'intera ricerca, così come indicato nella iniziale proposta di progetto.

Pertanto, per la successiva fase di produzione di proteine non strutturali ricombinanti, si è pertanto proceduto seguendo l'approccio tradizionale che avrebbe previsto l'amplificazione delle rispettive porzioni del genoma ed il clonaggio di porzioni immunogene in differenti sistemi di espressione.

SELEZIONE E CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI LE PROTEINE NS2A, NS2B, NS5

La scelta delle proteine non strutturali NS2A, NS2B e NS5 è stata effettuata tenendo presente la persistenza degli anticorpi specifici per queste stesse proteine negli animali infettatisi con WNV.

In particolare la NS5 risulta essere abbondantemente espressa negli animali infetti ed è stato dimostrato che test sierologici mirati alla ricerca di IgM dirette contro la stessa NS5 sono in grado di discriminare infezioni pregresse ed infezioni in corso o recenti (Harry E. Prince, Mary Lapè-Nixon, Cindy Yeh, Lesile H. Tobler, Michael P. Buschö-Persistence of antibodies to West Nile virus nonstructural protein 5ö (2008)- Persistence of antibodies to West Nile virus nonstructural protein 5- *Journal of Clinical Virology* (2008) Volume 43; pp.: 102-106).

Le sequenze codificanti per le proteine non strutturali öNS2Aö, öNS2B e öNS5ö del virus della West Nile, sono state selezionate per l'espressione in sistema eterologo: la scelta di questi polipeptidi si basa sulle informazioni ricavate, in particolare, dal lavoroöJunko Maeda, Hirotaka Takagi, Shingo Hashimoto, Ichiro Kurane, Akihiko Maeda (2008) - A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons - *Journal of Virological Methods* (2008) Volume 148; pp: 244-252ö.

La öNS2Aö, la cui sequenza codificante si estende dal nucleotide 3526 al nucleotide 4218 (Egypt 101, Accession Number EU081844.1), è una proteina idrofobica di 22kD ed è coinvolta nell'assemblaggio del virione e nel meccanismo di apoptosi indipendente da interferonö.

La öNS2Bö, la cui sequenza codificante si estende dal nucleotide 4219 al nucleotide 4611, è anch'essa una proteina idrofobica, di 14kD, che interagisce col dominio proteasico di öNS3ö, agendo come cofattore di proteasi..

La öNS5ö si estende dal nucleotide 7681 al nucleotide 10395 (Egypt 101, Accession Number EU081844.1) ed è una proteina di 103 kD dotata sia di attività metiltransferasica che di RNA-polimerasi-RNA dipendente virale.

Una prima strategia di clonaggio delle sequenze sopra descritte, ha previsto lo sviluppo dei seguenti primer di amplificazione: per la proteina öNS2ö sono stati disegnati: il primer öNS2A forwardö, 5ö GGAGATCTTACAACGCTGATATG-3ö (dal nucleotide 3526 al nucleotide 3548) e öNS2A Reverseö: 5öTAGGTACCTCGTTTACGGTTG-3ö (dal nucleotide 4210 al nucleotide 4189). L'amplificato atteso è di 629bp.

Per la proteina öNS2Bö sono stati sviluppati i primer NS2B Forward: 5ö TAAGATCTGGATGGCCCGC-3ö (dal nucleotide 4612 al nucleotide 4631bp) e NS2B Reverse: 5öGGGGTACCTCTCTTTGTGTATTGGA-3ö (dal nucleotide 5006 al nucleotide 5030), che conducono ad un amplificato di 392bp.

Per la proteina öNS5ö sono stati infine sviluppati i primer öNS5 Forwardö: 5ö GGAGATCTGGTGGGGCAAAG-3ö (dal nucleotide 7681 al nucleotide 7700) e öNS5 Reverseö: 5öTAGGTACCCAGTACTGTGTCCTCAACC-3ö (dal nucleotide 10377 al nucleotide 10358) con i quali si amplifica l'intera regione di circa 2716nt.

I primer selezionati per le tre le proteine non strutturali sono stati modificati per l'inserzione dei seguenti siti di restrizione: sequenza obbligatoria öGG + sito di taglio enzimatico per BgIII ö GGAGATCT e sequenza obbligatoria ö TA + sito di taglio enzimatico per KpnI ö GGTACC, utili per le successive fasi di clonaggio.

Lo schema di amplificazione delle proteine non strutturali selezionate che è stato seguito comprende diversi passaggi: a) estrazione dell'RNA virale; b) sintesi del cDNA; c) PCR per NS2A, NS2B ed NS5 impiegando i primer specifici per ciascuna proteina strutturale opportunamente

modificati mediante l'inserimento di apposite code stabilizzanti e dei siti di taglio enzimatici indicati nel periodo precedente.

Per l'estrazione dell'RNA virale è stato impiegato il QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Cat. N° 52906)

Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il kit High Capacity cDNA reverse Transcription (Applied Biosystems, Cat. N° 4368814), allestendo la miscela nel seguente modo: 6 µl di 10X Random primer, 6 µl di 10X RT Buffer, 2,4 µl di dNTPs mix 25mM, 3 µl di 5U Multiscribe Reverse Transcriptase, 12,6 µl di H₂O_{G.R.} e 30 µl di RNA. Le condizioni di amplificazione sono state: 10 minuti a 25°C e 45 minuti a 37°C.

Per le amplificazioni, sono state allestite delle miscele utilizzando il kit Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Cat. N° 11708-013). In particolare, lo schema di reazione, identico per le tre miscele, ha previsto: 5 µl di cDNA, 5 µl di Platinum Taq Buffer 10X, 0,2 µM sia per il primer Forward che per il primer reverse, 2,5 µl di dNTP mix 10mM, 2 µl di MgSO₄ 50mM, 0,5 µl Platinum® Pfx DNA Polymerase e 34,4 µl di H₂O_{G.R.} in modo tale da arrivare al volume finale di 50 µl. Il profilo termico di amplificazione, anch'esso identico per le tre miscele, è stato così impostato: 94°C per 10 minuti, 35 cicli costituiti da 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57,6°C, 1 minuto a 72°C ed infine 10 minuti a 72°C.

Le successive fasi di clonaggio sono state condotte utilizzando il pQE-TriSystem Vector (Qiagen, Cat. N° 33903), dotato di promotore del fago T5 e di due sequenze dell'operatore lac, che ne assicurano la repressione. Sono inoltre presenti, in particolare, un sito per l'ingresso ribosomiale (RBSII), in grado di assicurare un'elevata efficienza di traduzione dell'mRNA; un tag di 8 istidine al 3° della sequenza eterologa; due terminatori forti (T7) della trascrizione; una sequenza Kozak come facilitatore per l'inizio della traduzione del transgene.

VALUTAZIONE DELLE CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE E DEL FUNZIONAMENTO DEI PRIMER NS2B.

Con i primer NS2B sono state condotte alcune prove di PCR mirate all'individuazione delle migliori condizioni di amplificazione. In particolare sono stati impiegati due diversi kit (Platinum® Pfx DNA Polymerase di Invitrogen, Cat. N° 11708-013; iProof® High Fidelity Master Mix di Biorad, Cat N° 172-5310), con diverse temperature di annealing (55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C e 62°C) e con diverse concentrazioni di MgSO₄ (2mM, 2,5mM e 3mM).

Nel dettaglio, le master mix sono state allestite impiegando: 5 µl di cDNA, 5 µl di Platinum Taq Buffer 10X, 0,2 µM sia per il primer NS2B forward che per il primer NS2B reverse, 2,5 µl di dNTP mix 10mM, x µl di MgSO₄ 50mM tenendo presente le diverse concentrazioni finali testate e sopra riportate, 0,5 µl Platinum® Pfx DNA Polymerase e x µl di H₂O_{G.R.} in modo tale da arrivare al volume finale di 50 µl. Le condizioni di amplificazione sono state: 94°C per 10 minuti, 35 cicli costituiti da 1 minuto a 94°C, 1 minuto alla T_m da testare (55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C e 62°C), 1 minuto a 72°C ed infine 10 minuti a 72°C.

Con il kit iProof® High Fidelity Master Mix sono state invece utilizzate le seguenti condizioni: 10 µl di 2X I Proof Master mix, 0,6 µl di 100% DMSO, 0,6 µl di sia per il primer NS2B forward che per il primer NS2B reverse, 5 µl di DNA e 3,74 µl di H₂O_{G.R.} fino ad arrivare ad un volume finale di reazione di 20 µl. Il profilo termico di amplificazione è stato impostato come di seguito descritto: 98°C per 3 minuti, 35 cicli costituiti da 10 secondi a 98°C, 2,50 minuti alla T_m da testare (55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C e 62°C), 1,30 minuti a 72°C ed infine 10 minuti a 72°C.

L'impiego di questi primer non ha tuttavia condotto a risultati apprezzabili per il prosieguo lavoro. La causa di ciò è probabilmente da attribuire all'alterazione della specificità dei primer verso il target per l'inserimento nelle estremità 5' terminali degli stessi.

VALUTAZIONE DELLE CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE E DEL FUNZIONAMENTO DEI PRIMER NS5.

Con i primer NS5 è stata effettuata una prima prova di amplificazione alla T_m di 57,6°C ed impiegando il kit Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Cat. N° 11708-013) con le condizioni sopra riportate.

Poiché questo primo tentativo non ha condotto a risultati apprezzabili, sono state eseguite otto ulteriori prove in cui sono stati impiegati due diversi kit (Platinum® Pfx DNA Polymerase ó Invitrogen, Cat. N° 11708-013; iProof® High Fidelity Master Mix ó Biorad, Cat N° 172-5310), diverse temperature di appaiamento dei primer (55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 57.6°C, 58.4°C, 62.6°C, 63.4°C) e diverse concentrazioni di $MgSO_4$ (2mM, 2,5mM e 3mM).

Con i primer NS5 si è riusciti ad amplificare una banda di 220bp, in particolare mediante l'impiego del kit iProof® High Fidelity Master Mix (Biorad, Cat N° 172-5310). La composizione della master mix ha previsto: 10 μ l di 2X iProof Master mix, 0,6 μ l di 100% DMSO, 0,6 μ l sia per il primer NS5 forward che per il primer NS5 reverse, 5 μ l di DNA e 3,74 μ l di H_2O G.R. fino ad arrivare ad un volume finale di reazione di 20 μ l.

La banda di 220bp è stata sequenziata e le omologie di sequenza riscontrate sono del 100% rispettivamente con quelle dei ceppi Egypt 101 (Accession Number AF260968) ed Italy 2009/J225677 (Accession Number JF719068).

Va sottolineato che l'impiego dei primer NS5 ha portato all'amplificazione di una piccola porzione della stessa NS5 rispetto a quella attesa (2761nt) e questo risultato è dovuto all'inserimento dei siti di taglio nelle estremità 5' terminali che alterano la loro specificità nei confronti del loro target .

È stato constatato che il prodotto di 220bp è altamente conservato tra i ceppi WNV europei per cui si è proceduto al clonaggio nel vettore pQE-TriSystem (Qiagen, Cat. N° 33903) nonostante non fosse stato possibile stabilire se nella stessa porzione di 220bp corrispondesse genoma codificante per l'espressione di epitopi immunogeni di NS5, ma tenendo in considerazione il fatto che la NS5 è dotata di proprietà immunogene in soggetti naturalmente infetti.

CLONAGGIO DEL FRAMMENTO DA 220bp DELLA NS5

Il clonaggio del frammento di NS5 (220bp) ha richiesto 10 fasi sperimentali qui di seguito descritte.

1) estrazione del vettore pQE-TriSystem (Qiagen, Cat. N° 33903), mediante kit NucleoSpin® Plasmid Macherey, Cat. N° 740588.50);

2) digestione del vettore pQE-TriSystem con gli enzimi di restrizione BglII e KpnI.

La digestione con KpnI (BioLabs, Cat. N° R0142M) è stata condotta secondo le indicazioni della casa produttrice, in particolare miscelando 5 μ l del 10X Buffer 1; 1 μ l di 10mg/ml BSA; 2 μ l di 5000 U/ml KpnI; 40 μ l di plasmide pQE-TriSystem (150 ng), 2 μ l di H_2O G.R. fino ad arrivare al volume finale di 50 μ l. L'incubazione della digestione ha avuto luogo per 3 ore a 37°C al termine delle quali, alla miscela di reazione, è stata aggiunta H_2O G.R. fino 100 μ l finali. Sono stati quindi aggiunti 10 μ l di 3M Acetato di Sodio e 2 volumi di Etanolo puro, miscelando delicatamente ed incubando per ulteriori 14 ore, a 68°C. Al termine dell'incubazione la miscela è stata centrifugata a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti. Il DNA plasmidico precipitato è stato quindi lavato con 500 μ l di etanolo al 70% (mantenuto a 62°C) e nuovamente centrifugato a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti. Eliminato nuovamente il surnatante, il pellet è stato lasciato ad asciugare sotto cappa a flusso laminare per 10' circa. Successivamente a questa fase, il pQE-TriSystem-KpnI è stato sottoposto alla seconda digestione con l'enzima BglII (BioLabs, Cat. N° E0144M), anche in questo caso seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In particolare sono stati miscelati 5 μ l del 10X Buffer 3, 1 μ l di 10mg/ml BSA, 2 μ l di 5000 U/ml BglII, 42 μ l di plasmide pQE-TriSystem (150 ng totali) precedentemente risospeso con H_2O G.R. fino ad arrivare ad un volume finale pari a 50 μ l. La digestione enzimatica è stata eseguita per 3 ore a 37°C al termine delle quali, alla miscela di

reazione, è stata aggiunta H₂O_{G.R} fino ad arrivare al volume di 100 μ l. Sono stati quindi aggiunti 10 μ l di 3M Acetato di Sodio e 2 volumi di etanolo puro, miscelando delicatamente e, quindi, incubando per 14 ore a 680°C. Al termine dell'incubazione è stata effettuata una prima centrifugazione a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti. Anche in questo caso è stato eliminato il supernatante ed il pellet plasmidico risospeso con 500 μ l di etanolo al 70% (mantenuto a 620°C). Dopo centrifugazione a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti, è stato nuovamente eliminato il supernatante ed il pellet lasciato asciugare facendo evaporare l'etanolo residuo, in modo da recuperare il DNA plasmidico completamente digerito con i due enzimi di restrizione ;

3) Defosforilazione del vettore di clonaggio

Al termine della doppia digestione, il vettore pQE-TriSystem linearizzato è stato defosforilato, impiegando a tale scopo la FastAPTMThermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, Cat. N° #EF0651) e utilizzando le seguenti condizioni di reazione: 10 μ l di plasmide linearizzato (100ng), 2 μ l di 10X FastAPTM Buffer, 1 μ l di FastAPTMThermosensitive Alkaline Phosphatase e 7 μ l di H₂O_{G.R} fino a 20 μ l finali. La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 10 minuti e subito dopo la FastAPTMThermosensitive Alkaline Phosphatase è stata disattivata a 75°C per 5 minuti. Al termine della digestione enzimatica, alla miscela di reazione è stata aggiunta H₂O_{G.R} fino ad arrivare al volume di 100 μ l e, quindi, 10 μ l di Acetato di Sodio 3M e 2 volumi di etanolo puro. Dopo aver miscelato delicatamente ed incubato per 14 ore a 680°C, è stata condotta una centrifugazione a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti al termine dei quali è stato eliminato il il surnatante. Il pellet plasmidico così ottenuto è stato lavato con 500 μ l di etanolo al 70% (mantenuto a 620°C) e centrifugato nuovamente a 4°C, a 13200 rpm per 10 minuti. Eliminato nuovamente il surnatante, il pellet è stato lasciato asciugare sotto cappa a flusso laminare per 10 ϕ circa. Il pellet così ottenuto è stato infine risospeso con 10 μ l di H₂O_{G.R};

4) quantificazione del vettore pQE-TriSystem trattato con gli enzimi BglII e KpnI e defosforilato. La quantificazione è stata eseguita mediante comparazione con specifico ladder (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Cat. N° 10068-013) ;

5) digestione della banda NS5 di 220bp (inserto) con gli enzimi dsi restrizione BglIII e KpnI.

Le condizioni di digestione sono identiche a quelle impiegate per il plasmide pQE-TriSystem, precedentemente descritte. Occorre tenere in considerazione che la quantità di amplificato della ϕ NS5 ϕ , sottoposta a digestione, è stata di circa 100ng. Anche in questo caso, la quantificazione è stata eseguita mediante comparazione con specifico ladder (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Cat. N° 10068-013) ;

5) allestimento della reazione di ligazione ϕ vettore-inserto ϕ NS5 ϕ .

Sono state allestite 4 reazioni di ligazione nel rapporto molare di 1:1; 1:2, 1:3 ed 1:5 tra vettore ed inserto, rispettivamente. Tutte le reazioni di ligazione sono state condotte impiegando il kit T4 DNA Ligase (Roche, Cat. N° 10 716 359 001) ed impiegando le condizioni di reazione di seguito descritte: a 1,5 μ l (50 ng) di vettore linearizzato e defosforilato, sono stati aggiunti 3 μ l di 10X ligation buffer, 3 μ l di T4 DNA ligase, x μ l di inserto (100ng, 250ng, 350ng) ed H₂O_{G.R} fino ad arrivare al volume finale di 30 μ l. Le miscele di ligazione sono state incubate a 20°C per 18 ore al termine delle quali sono state diluite, ciascuna, con 8 μ l di H₂O_{G.R} ;

6) preparazione del ceppo di mantenimento SG13009 di *Escherichia coli* (Qiagen, Cat. N° 1000922).

Le cellule batteriche sono state preparate lavandole e risospingendole ad una concentrazione finale pari a 10⁶ cellule/ml, utilizzando a tale scopo una soluzione composta da 100mM CaCl₂ e 15% glicerolo.;

7) trasformazione del ceppo di mantenimento SG13009

Le reazioni di ligazione, sia tal quali che alla diluizione 1:10, sono state utilizzate per la trasformazione delle cellule batteriche, mediante shock termico.

8) selezione dei plasmidi ricombinanti

A tale scopo sono state impiegate piastre con terreno Luria Broth (Sigma, Cat. N° L3522) Agar (Biolife, Cat. N° 2014-10) in presenza degli antibiotici Ampicillina (50 µg/ml) e Kanamicina (25 µg/ml), su cui sono state seminate e lasciate crescere le colture trasformanti.

9) analisi dei plasmidi ricombinanti

È stata condotta mediante riamplicazione, seguita da sequenziamento, dell'inserto da 220bp della NS5. Per l'amplicazione è stato impiegato il kit Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cat. N° 10966-034), allestendo la miscela come di seguito descritto: 5 µl di DNA plasmidico ricombinante, 1 µl di 10mM dNTPs mix, 3 µl di 25mM CaCl₂, 5 µl di 10X Buffer, 0,8 µM sia per il primer PQE-Tri Forward che per il primer PQE-Tri Reverse, 0,5 µl di 5U/µl di Platinum Taq DNA Polymerase e 33,9 µl di H₂O G.R. fino ad arrivare al volume finale di 50 µl. Le condizioni di amplificazione sono state: 95°C per 10 minuti, seguiti da 35 cicli composti da 95°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto ed una estensione finale di 72°C per 10 minuti. Le dimensioni di amplificazione attese sono di 727bp (507bp derivanti dalla sequenza plasmidica fiancheggiante il sito di clonaggio e 220bp appartenenti al transgene clonato);

10) analisi dei sequenziamenti ottenuti.

Le analisi di sequenza condotte hanno mostrato omologie del 100% con le sequenze del vettore impiegato per il clonaggio.

Sebbene siano stati rispettati tutti i parametri indicati dalla ditta e dai protocolli di clonaggio (defosforilazione del vettore e rapporti molarli adeguati tra vettore ed inserto), a causa della costante ricombinazione interna del vettore, non si è ottenuto nessun plasmide ricombinante.

VALUTAZIONE DELLE CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE E DEL FUNZIONAMENTO DEI PRIMER NS2A.

Con i primer NS2A sono state condotte le stesse prove di PCR mirate all'individuazione delle migliori condizioni di amplificazione effettuate per la NS2B, impiegando i due differenti kit (Platinum® Pfx DNA Polymerase o Invitrogen, Cat. N° 11708-013; iProof® High Fidelity Master Mix o Biorad, Cat. N° 172-5310), con diverse temperature di annealing (55°C, 56°C, 56,5°C, 58°C, 58,9°C, 60°C, 61°C e 62°C) e con diverse concentrazioni di MgSO₄ (2mM, 2,5mM e 3mM).

Alla stessa stregua le master mix sono state allestite impiegando gli stessi reagenti e gli stessi volumi descritti per NS2B sia per il primer NS2A forward che per il primer NS2A reverse.

Anche i profili termici di amplificazione, impiegando il kit iProof® High Fidelity Master Mix erano corrispondenti a quelli in precedenza riportati.

Alla T_m di 58,9°C è stato ottenuto un amplificato di 629bp il cui prodotto di sequenziamento ha mostrato omologie del 100% sia rispetto al ceppo Egypt 101 (Accession Number AF260968), sia con lo stipite Italy 2009/J225677 (Accession Number JF719068).

Nonostante il funzionamento dei primer specifici per NS2A, sono stati sospesi i tentativi di clonaggio della banda di 629bp con il vettore pQE-TriSystem, in considerazione delle difficoltà in precedenza riscontrate per il clonaggio della porzione di 220bp di NS5.

Pertanto, considerato anche il fatto che non era possibile definire se alla stessa porzione di 220 bp corrispondeva genoma codificante per l'espressione di epitomi immunogeni di NS5, si è deciso di proseguire il lavoro nel seguente modo:

3. ottenere l'intera sequenza della NS5 attraverso di amplificazione, nota con il nome di *SOEing* (*In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes* (Horton RM) *Methods Mol Biol.* 1993;15:251-61) che consiste nella fusione di diversi amplificati attraverso la complementarità della sequenza nucleotidica ad una delle loro estremità.

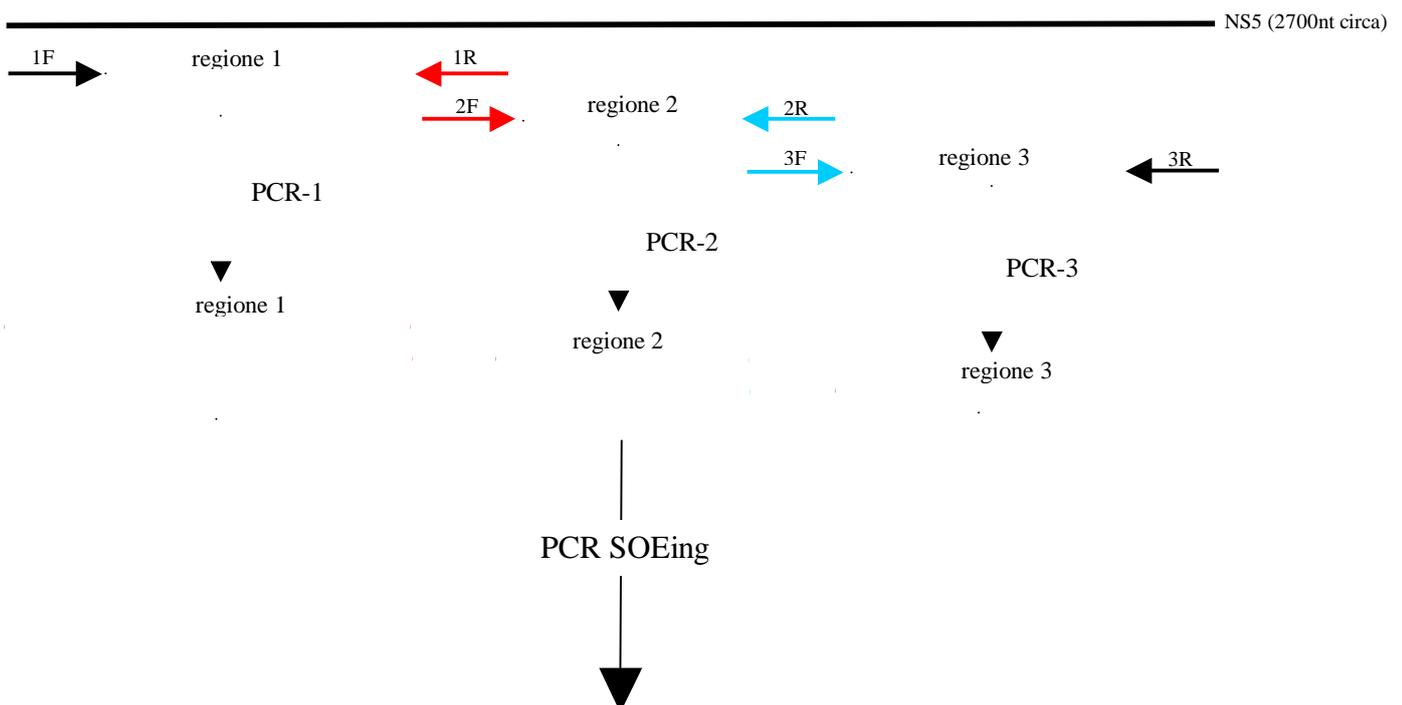
4. Selezionare nuovi vettori di espressione da impiegare per i successivi clonaggi degli amplificati di NS2A, della porzione di 220 bp di NS5 e di singoli frammenti o di tutto il genoma codificante per la stessa proteina ottenuti con la strategia di cui al punto 1.

AMPLIFICAZIONE DELLA NS5 MEDIANTE STRATEGIA PCR SOEING

Come descritto nei paragrafi precedenti, il ricorso ad un approccio di PCR classico non ha consentito di amplificare la regione codificante la NS5. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella lunghezza della sequenza d'interesse, pari a circa 2700nt, che potrebbe determinare la formazione di strutture secondarie termodinamicamente stabili, difficilmente risolvibili anche dalle polimerasi "Long Range" utilizzate nelle miscele di amplificazione. Una ulteriore spiegazione potrebbe essere il cambiamento di specificità dei primer nei confronti del loro specifico target quando vengono inseriti i siti di taglio enzimatico alle loro estremità 5'. Per superare tale "impasse", si è quindi optato per una particolare strategia di amplificazione, nota con il nome di "SOEing" (*In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes* (Horton RM) *Methods Mol Biol.* 1993;15:251-61) che, brevemente, consiste nella "fusione" di diversi amplificati attraverso la complementarietà della sequenza nucleotidica ad una delle loro estremità.

Nel caso specifico, la strategia SOEing utilizzata ha previsto la suddivisione dell'amplificazione della NS5 in tre distinti frammenti, di circa 900bp ciascuno, tra loro contigui e con estremità con sequenza condivisa: questa ultima caratteristica è stata introdotta disegnando primer di amplificazione perfettamente complementari: in particolare; il reverse della "regione 1" con il forward della "regione 2" (in rosso in figura); il reverse della "regione 2" con il forward della "regione 3" (in azzurro in figura).

La sequenza dei primer utilizzati è riportata nella seguente tabella:



WNV-1F	nt7672 ¹ - CTAAAAAGAGGTGGGGCAAAG	906bp
WNV-1R	GTTCTCATCGTGGTGCCACGTTGAACTGTA	
WNV-2F	TACAGTTCAACGTGGCACCACGATGAGAAC	933bp
WNV-2R	ATCTTCTCTGGAGATGACATCCATGACAGT	
WNV-3F	ACTGTCATGGATGTCATCTCCAGAGAAGAT	951bp
WNV-3R	nt10401 ¹ -TATTACAGTACTGTGTCCTCAACCAAAGT	

¹ Posizione delle estremità 5' e 3' della sequenza amplificata, rispetto al genoma con *accession number* AF260968. Sulla destra è riportata la dimensione dei singoli amplificati

L'amplificazione delle tre regioni è stata condotta con un kit commerciale (OneStep RT-PCR, Qiagen cat. n° 210212), seguendo le indicazioni della casa produttrice ed utilizzando, in particolare, 600nM di ciascun *primer*. Il profilo termico di amplificazione è stato impostato come di seguito descritto:

50°Cx40'

95°Cx15'

94°Cx1' } 40 cicli

52°Cx1' }

72°Cx1' }

72°Cx10'

Al termine delle amplificazioni, i prodotti di PCR sono stati purificati con kit commerciale (QIAGEN, PCR purification kit) seguendo le indicazioni della casa produttrice e, quindi, sottoposti ad una prima analisi della sequenza, mediante metodo di Sanger ed elettroforesi capillare (ABI 310-Life Technologies), al fine di confermarne l'identità.

Al termine di questa fase, si è quindi proceduto con la PCR *SOEing* impiegando un kit di PCR *Long Range* commerciale (iProof[®] High Fidelity Master Mix- BIORAD cat. n°172-5310) seguendo le indicazioni della casa produttrice. In particolare, sono stati trasferiti, nella medesima miscela di amplificazione, 2,5ng/μl di ciascuno dei tre amplificati e 0,6μl di DMSO. Da sottolineare l'assenza, in questa miscela, dei *primer* di amplificazione. Il profilo termico impostato per la coniugazione dei tre frammenti è di seguito descritto:

98°Cx3'

98°Cx1' } 10 cicli

52°Cx3' }

72°Cx4' }

Al termine di questa fase, 2μl della miscela di *coniugazione* sono stati trasferiti in una miscela di amplificazione, allestita sempre col medesimo kit commerciale, dove sono stati aggiunti anche i *primer* esterni di amplificazione; *WNV 1F* e *WNV 3R*; la miscela è stata infine trasferita in un amplificatore e sottoposta al seguente profilo termico:

98°Cx3'

98°Cx1ø }
 52°Cx3ø } 30cicli
 72°Cx2ø0ö }
 72°Cx10ø

Al termine della coniugazione, è stata condotta una nuova analisi della sequenza del prodotto di amplificazione, utilizzando sia gli stessi *primer* di amplificazione sia *primer* appositamente disegnati (tabella di seguito) per scoprire anche i punti di coniugazione.

FGAP1	GGTGCTCTGCCCCTATATGCC
RGAP1	GAGAGCACATTCTGGGACGTTT
FGAP2	GCTTGGGCCTCCAAAACTG
RGAP2	GCTGCCAGTCATACCATCCA

La sequenza ottenuta, elaborato con l'ausilio del software Geneious Pro è di seguito riportata:

CAACCAGATGACAAAAGAAGAGTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGT
 CGATCGCTCAGCAGCAAACACGCCAGGAAAGAAGGCAATGTCACTGGAGGGCATCC
 AGTCTCTAGAGGCACAGCAAAGCTGAGATGGCTGGTTCGAGCGGAGGTTTCTCGAACCG
 GTCGGAAAAGTGATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTACATGGCAA
 CCCAAAAAGAGTCCAAGAGGTCAGAGGGTACACAAAGGGTGGTCCC GGACATGAAG
 AGCCCCAACTGGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGCGGAGTGGA
 TGTGTTCTACAGACCTTCTGAGTGCTGCGATACCCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCTT
 CATCAAGTGCTGAGGTTGAAGAGCATAGGACGATCCGGGTCTTGAATGGTTGAGGA
 CTGGCTGCACCGAGGGCCAAAGGAATTTTGTGTGAAGGTGCTCTGCCCTATATGCCA
 AAAGTCATAGAAAAGATGGAGCTGCTCCAGCGCCGGTATGGGGGGGGACTGGTCAGA
 AACCCACTCTCGCGGAATTCACGCACGAGATGTATTGGGTAAGTCGAGCTTCGGGCA
 ATGTGGTACACTCAGTGAACATGACCAGCCAGGTGCTTCTGGGAAGAATGGAGAAAAG
 GACCTGGAAGGGACCCCAATACGAGGAAGATGTGAACTTGGGAAGTGGAACCAGGGC
 GGTGGGAAAACCCCTACTCAACTCAGACACTAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACG
 ACTCAGGCGTGAGTACAGTTCAACGTGGCACCACGATGAGAACCACCCATATAGAACC
 TGGAACTATCACGGCAGTTATGATGTGAAACCTACAGGCTCCGCCAGCTCGCTGGTCA
 ATGGAGTGGTTAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAACGTTACCACCAT
 GGCCATGACTGACACTACTCCCTTCGGACAGCAGCGGGTGTTTAAAGAGAAGGTGGAC
 ACGAAAGCTCCTGAACCGCCAGAAGGAGTGAAGTATGTGCTCAATGAAACCACCAACT
 GGTTGTGGGCGTTTCTGGCCAGAGAAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATT
 CATAAAAAGGTCAATAGCAATGCAGCTCTGGGTGCCATGTTTGAAGAGCAGAACCAA
 TGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAGGATCCAAAATTTTGGGAGATGGTGGATGAG
 GAGCGCGAGGCACACCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATCTACAACATGATGGGGA
 AGAGAGAGAAGAAACCTGGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATATGGT
 TCATGTGGCTCGGAGCTCGCTTCTGGAGTTCGAAGCTCTGGGCTTTCTTAACGAAGAC
 CACTGGCTTGAAGAAAGAACTCAGGAGGCGGGGTCGAGGGCTTGGGCCTCCAAAAA
 CTGGGTTATATTCTGCGTGAAGTTGGCACCCGACCTGGAGGCAAGATCTATGCTGATG
 ACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATTACGAGAGCTGACCTGGAAAATGAAGCTAAGGT
 TCTTGAGTTGCTGGATGGGGAACATCGGCGTCTTGCTAGGGCCATCATTGAGCTCACCT

ATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGATGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACTGTCATGGA
TGTCATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCTCTAAAC
ACCTTCACCAACCTGGCCGTCCAGTTGGTGAGGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGATTG
GCCAGATGATGTGGAGAACTCACAAAGGGAAAAGGACCTAAAGTCAGGACCTGGC
TGTTTGAGAATGGGGAGGAAAGACTCAGCCGCATGGCTGTCAGCGGAGATGACTGTGT
GGTAAAGCCCCTAGATGACCGCTTCGCCACCTCTCTCCACTTCCTCAACGCCATGTCAA
AGGTTTCGCAAAGATATCCAGGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGACTGGCAGCA
GGTTCCATTCTGCTCGAACCATTTCACTGAATTAATCATGAAAGATGGAAGAACA
GTGGTTCCATGCCGAGGACAGGACGAACTGGTAGGCAGAGCTCGCATTTCTCCAGGGG
CCGGATGGAACGTCCGTGACACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCCAGATGTGGCTG
CTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCGGCTAATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGT
CCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTCCATCCATGCCGGAGGGGAG
TGGATGACAACAGAAGACATGCTGGAGGTCTGGAACCGTGTTTGGATAGAGGAGAAT
GAATGGATGGAAGACAAAACCCCAAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATACTCAGGA
AAACGGGAGGACATCTGGTGTGGCAGCTTGATTGGCACAAGAACCCGAGCCACGTGG
GCAGAAAACATCCAGGTAGCCATCAACCAAGTCAGAGCAATCATTGGAGATGAGAAG
TATGTGGATTACATGAGT

Il frammento codificante l'intera NS5 (2761bp), i tre distinti frammenti della NS5 di circa 900bp ciascuno e, infine la porzione di 629bp di NS2A sono stati clonati ed archiviati in un vettore plasmidico di mantenimento (TOPO-TA Clonino, Invitrogen), al fine di assicurarne la piena disponibilità per le successive fasi della ricerca, mirate alla produzione di proteine ricombinanti attraverso il subclonaggio della NS2A (629bp), di parte (i tre distinti frammenti da circa 900bp) della NS5, o dell'intera stessa sequenza NS5, in vettori di espressione eterologhi, attualmente in fase di valutazione.

11									
12									
13									

¹Mantello: Corto (S) Medio (M) Lungo (L)

²Attitudine: Compagnia (C) Caccia (K) Guardia (G) Altro (A)

³Ambiente in cui vive il cane: Urbano (U) Periurbano (P) Rurale (R)

⁴Trattamenti antiparassitari effettuati (bagni e/o collari): Regolarmente (R) Occasionalmente (O) Mai (M)

⁵Comune di custodia del cane negli ultimi due anni, se diversa dall'indirizzo del proprietario e/o detentore, nel caso di soggetti mantenuti in canili indicare data, comune e località di cattura

IL PRELIEVO DEVE ESSERE EFFETTUATO SU CANI ALL'APERTO NELLE ORE NOTTURNE, prioritariamente cani nati prima del mese di giugno 2009 e di età inferiore ad un anno

Firma del Veterinario operatore

Data .. / .. / ..

pg _____
/ _____

Allegato 2

WEST NILE DISEASE
PIANO PILOTA SORVEGLIANZA IN SUINI
SCHEDA DI PRELIEVO
Sorveglianza Sierologica in Suini
Scheda di accompagnamento campioni

AZIENDA USL: _____

COMUNE: _____ SIGLA PROVINCIA: _____

DATI RELATIVI ALL'ALLEVAMENTO

ALLEVAMENTO SUINO
Cod. Aziendale* _____ / _____ / _____ Specie _____
Coordinate geografiche: Latitudine: [][] . [][][][][][][][] N Longitudine [][] . [][][][][][][][] E
Via/Frazione: _____
Proprietario dell'Allevamento: _____
Codice Fiscale del proprietario: _____
Tipologia Allevamento: AUTOCONSUMO <input type="checkbox"/> INGRASSO <input type="checkbox"/> Ripr. Ciclo Chiuso <input type="checkbox"/> Ripr. Ciclo Aperto <input type="checkbox"/>

N° Prog. Camp.	MARCHIO AURICOLARE	Data Introduzione in Allevamento (sbarrare se animale è nato in azienda)	Codice Aziendale Allevamento di Origine**	SESSO M/F	Mese/Ann o di nascita
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

* Qualora trattasi di Allevamento registrato in BDN

** Allevamento dove il suino è nato/svezzato

Data del prelievo _____

Firma (leggibile) Veterinario Prelevatore

