

VIRUS WEST NILE: CARATTERIZZAZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI E POTENZIALE APPLICAZIONE NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO

Davide Lelli (a), Ana Moreno (a), Emiliana Brocchi (a), Enrica Sozzi (a), Elena Canelli (a), Gian Luca Autorino (b), Miguel Angel Jimenez-Clavero (c), Paolo Cordioli (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

(c) Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Spain

Introduzione. Dopo dieci anni dalla sua prima segnalazione, il *Virus West Nile* (WNV) è riapparso nell'Italia settentrionale nel 2008 causando 32 casi clinici negli equini e per la prima volta casi umani di malattia. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre Anticorpi Monoclonali (MAbs) nei confronti di WNV e caratterizzarli per il successivo utilizzo nella diagnosi di laboratorio.

Metodi. Per la produzione dei MAbs è stato utilizzato il ceppo WNV Egypt 101. Lo *screening* è stato eseguito mediante ELISA indiretta con antigene omologo e immunofluorescenza su cellule Vero infettate e non. La reattività dei MAbs è stata valutata in immunoperossidasi e in sieroneutralizzazione con diversi ceppi di WNV appartenenti ai *lineages* 1 e 2 e *Virus Usutu*. Alcuni MAbs sono stati testati in ELISA indiretta presso l'Istituto Pasteur per valutare l'eventuale *cross*-reazione con altri flavivirus quali DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, YF, TBE e JE. Ogni MAb è stato esaminato inoltre in *Western Blotting* (WB) con il virus omologo ed ELISA indiretta verso la proteina ricombinante E (dominio III) prodotta in *E. coli*. Saggi ELISA competitivi sono stati allestiti per valutare sia la competizione reciproca tra MAbs che verso sieri di polli SPF infettati sperimentalmente con WNV e sieri di equini immunizzati con vaccino inattivato. Quattro MAbs (due neutralizzanti e due non) sono stati coniugati con perossidasi ed utilizzati in tutte le possibili combinazioni, adsorbiti come anticorpi di cattura e coniugati come anticorpi traccianti, per l'allestimento di reazioni ELISA *sandwich*.

Risultati. Durante la fase di *screening* sono stati selezionati 37 MAbs dei quali 29 specifici per WNV e reattivi con tutti i ceppi testati e 8 *cross*-reattivi con altri flavivirus. Tredici MAbs presentano attività neutralizzante e di questi, 12 reattivi con la proteina E ricombinante competono reciprocamente. Tutti i MAbs sono risultati negativi in WB suggerendo la natura conformazionale degli epitopi *target*. Il MAb 3B2 ha dimostrato le migliori *performance* nei test diagnostici finalizzati alla dimostrazione di antigeni e anticorpi.

Conclusioni. I MAbs anti-WNV prodotti trovano largo impiego in diagnostica. Il MAb 3B2 (neutralizzante e specifico per la proteina E dominio III), può essere impiegato in ELISA *sandwich* per l'identificazione diretta di WNV e in ELISA competitiva per svelare anticorpi neutralizzanti anti-WNV in sieri equini e aviari. Inoltre, coniugato con perossidasi, trova impiego come tracciante anche nel test IgM-*capture* ELISA per la diagnosi di infezioni recenti da WNV nel cavallo.

Lavoro svolto nell'ambito della Ricerca Finalizzata 2005 (PRF2005301).