



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## **L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA: principali risultati e loro trasferibilità operativa**

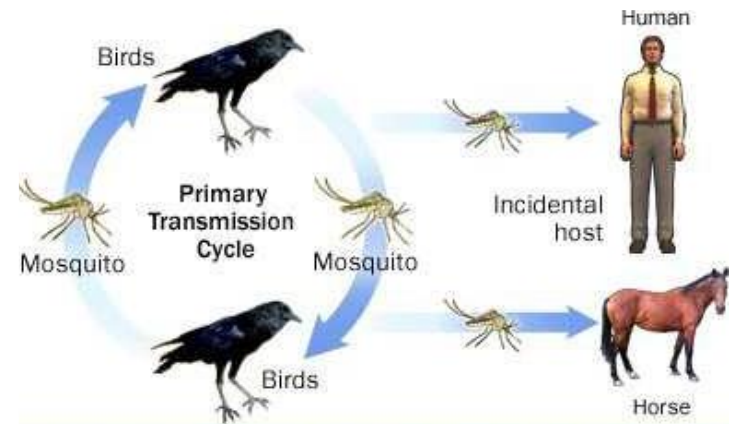
**Sviluppo di un saggio “DIVA”  
(Differentiating Infected from Vaccinated Animals) per la  
sierodiagnosi del Virus della West Nile (WNV)  
IZS LT 08/15**

Raniero Lorenzetti/ UOC Ricerca Innovazione e Cooperazione Internazionale



# Introduzione (1)

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



© Mayo Foundation for Medical Education and Research. All rights reserved.





## Introduzione (2)

### Sorveglianza sierologica condotta su equini sentinella: CRITICITA'

- false positività generate da cross-reazione con anticorpi diretti contro virus antigenicamente correlati al WNV
- sieropositività indotte da interventi di vaccinazione

Un **test sierologico D.I.V.A.** (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), consentirebbe il superamento della seconda criticità



I vaccini in uso per la prevenzione della WND sono essenzialmente di tipo ricombinante e sfruttano le proprietà immunogeniche delle proteine strutturali di superficie “E” ed “M”: la proteina non strutturale “NS5” del virus potrebbe quindi rivelarsi idonea per lo sviluppo di una saggio D.I.V.A.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Obiettivi

Clonaggio ed espressione della proteina ricombinante NS5 del WNV, da impiegare nell'allestimento di un saggio diagnostico D.I.V.A. per la sorveglianza sierologica della West Nile Disease





## Materiali e metodi

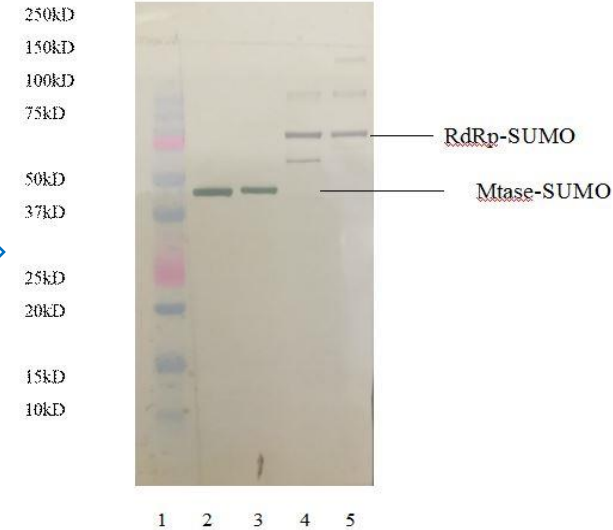
Metodologia impiegata: clonaggio ed espressione della NS5 in forma di subpolipeptidi (~30 e 70kDa), corrispondenti ai domini “MTasi” (N’ terminale) e “RpRd” (C’ terminale)

- adattamento delle sequenze codificanti al *codon* usage di *E.coli* (ospite prescelto per l’espressione) e sintesi mediante approccio di biologia sintetica
- clonaggio in 2 due diversi vettori di espressione
- espressione in sistema *cell free di E.coli*
- Immunoblotting e test ELISA per cimentare, le proteine ricombinanti ottenute, con sieri di cavallo positivi e negativi al virus della West Nile



## Risultati (1)

1° clonaggio in vettore di espressione per proteine di fusione con *partner* «SUMO» (Small Ubiquitin-like Modifier) →



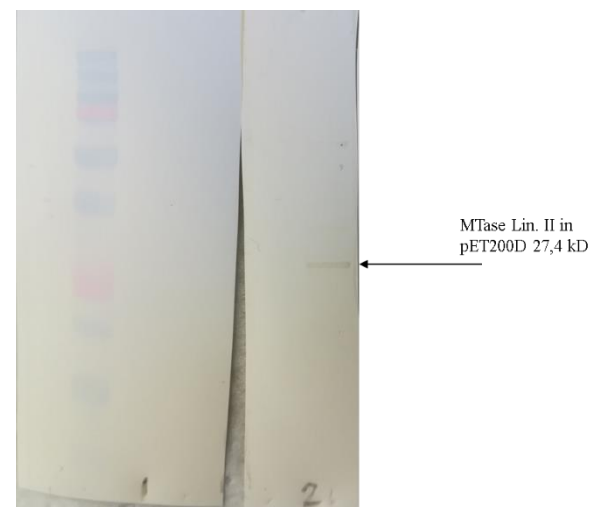
I saggi in *immunoblotting* hanno evidenziato una reattività dei sieri equini (negativi al WNV) nei confronti della porzione SUMO delle proteine di fusione, rendendole di fatto inutilizzabili per l'allestimento di un saggio DIVA (rischio di false positività al WNV)



## Risultati (2)

2° clonaggio in vettore di espressione per proteine «native» (assenza di *partner* di fusione)

I saggi in immunoblotting hanno evidenziato una sostanziale diminuzione nelle reazioni indesiderate, consentendo la produzione di risultati più nitidi e netti.



Immunoblotting con MTasi:  
1: siero negativo alla WND  
2: siero positivo alla WND





## Impatto e trasferibilità operativa

I dati ottenuti sono incoraggianti ma necessitano di ulteriori studi ed approfondimenti prima di poter essere «trasferiti» nei piani di sorveglianza delle West Nile. In particolare, è necessario confermare le *performance* diagnostiche dei polipeptidi espressi con il secondo sistema di espressione, rispetto alla loro capacità di distinguere le sieropositività naturali da quelle indotte da somministrazioni vaccinali.







## Conclusioni (1)

- I risultati preliminari conseguiti con la sperimentazione descritta confermano le caratteristiche di antigenicità della proteina non strutturale NS5, che si dimostra in grado di indurre una risposta anticorpale negli equini naturalmente esposti al virus;
- l'espressione della NS5 (sia del lineage I, sia del lineage II) è stata condotta non nella forma di polipeptide integro ma, piuttosto, in forma di due subunità di massa inferiore, corrispondenti al dominio N'-terminale con attività MTasi e al dominio C'-terminale con attività RpRd;
- i saggi in immunoblotting allestiti con i polipeptidi espressi con il secondo sistema di espressione e cimentati con i sieri di cavallo positivi e negativi al virus, hanno evidenziato una sostanziale diminuzione nelle reazioni antigene/anticorpo indesiderate e, quindi, la produzione di risultati più nitidi e netti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Conclusioni (2)

I dati preliminari ottenuti nella presente ricerca necessitano di essere ulteriormente approfonditi, in particolare allestendo nuovi saggi di immunoblotting da cimentare con sieri di equini vaccinati e positivi al virus della West Nile.

