

## SINTESI - PRC IZS LER 01/2016

### SVILUPPO DI REAGENTI BIOTECNOLOGICI E TEST STRATEGICI PER COLMARE LACUNE NELLA DIAGNOSTICA DELLA LUMPY SKIN DISEASE (LSD)

La Lumpy Skin Disease (LSD) è una malattia infettiva dei bovini e bufali, inserita nella lista OIE per il carattere transfrontaliero, la rapida diffusione e l'elevato impatto economico e zootecnico. L'agente eziologico è un virus (LDSV) appartenente al genere Capripoxvirus, famiglia Poxviridae; la malattia è endemica in Africa e nel Medio Oriente (EFSA 2015). Nel 2015/2016 incursioni della LSD si sono verificate per la prima volta nella UE, causando focolai in Grecia e in Bulgaria, ed estendendosi in numerosi paesi dei Balcani, di regioni transcaucasiche, Kazakhstan e Russia (EFSA 2018). A partire dal 2019 la malattia si è ulteriormente diffusa verso l'Asia sud-orientale, dove è stata introdotta per la prima volta interessando vari paesi, tra cui India e Cina (EFSA 2020). Il controllo attraverso la vaccinazione è una misura essenziale di contenimento, mentre la sorveglianza attiva ha bisogno di metodi diagnostici pratici ed affidabili. Sebbene la diagnosi primaria mediante dimostrazione del virus sia oggi facilmente attuabile con test molecolari, la capacità di intraprendere programmi di siero-sorveglianza post-focolaio o una diagnosi retrospettiva a livello di allevamento, o per valutare la copertura vaccinale resta problematica, per la carenza di test sierologici validati, semplici, robusti e facilmente accessibili (DISCONTTOOLS website per gap analysis, EFSA 2015-2018-2020 per overview aggiornate). Vari test ELISA home-made per la ricerca di anticorpi anti-capripoxvirus sono stati descritti, ma nessuno ha ricevuto una validazione attendibile; lo scarso successo di questi test è stato attribuito a vari fattori, quali la scarsa resa e difficoltà nella produzione di virus purificato, l'instabilità degli antigeni ricombinanti prodotti, o la mancanza di sieri bovini noti, necessari per l'ottimizzazione e validazione dei test. Ma soprattutto, nessuno dei test ELISA descritti utilizza il virus LSD o proteine derivate dal virus LSD come sorgente di antigene, e a questo potrebbe essere attribuibile la scarsa sensibilità dei saggi. Solo durante il 2018, quindi successivamente alla presentazione di questo progetto, un kit ID-Vet è stato immesso in commercio, ma in assenza di completa validazione. È ben noto che saggi ELISA per l'identificazione di virus o di anticorpi traggono grande beneficio dall'uso di anticorpi monoclonali (AcM). Tuttavia, questi non sono mai stati descritti per il virus LSD.

Per quanto premesso, in sintesi gli **obiettivi** proposti con il progetto sono:

- Produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali (AcM) verso il virus della LSD, come reagenti strategici per lo studio delle componenti antigeniche del virus e per la messa a punto di test diagnostici;
- Sviluppo e validazione di test ELISA innovativi, basati sull'impiego di AcM, per l'identificazione del virus LSD e per la dimostrazione di anticorpi, al fine di colmare attuali lacune nella diagnostica e nella disponibilità di test.

Sintesi della **metodologia** e articolazione delle fasi di lavoro:

Task 1. Coltura, amplificazione, inattivazione, purificazione del virus LSD

- 1) *Produzione sulla linea cellulare selezionata di virus LSD e selezione del trattamento inattivante (in ambiente BSL3+), controlli di innocuità*
- 2) *Concentrazione e purificazione del virus inattivato, controllo delle rese*

Task 2. Produzione e caratterizzazione di Anticorpi Monoclonali

- 1) *Immunizzazione di due topi Balb/c*
- 2) *Fusione cellulare e screening degli ibridomi*
- 3) *Caratterizzazione degli AcM*
- 4) *Coltura in vitro di ibridomi selezionati in bio-fermentatori per ottenere concentrazioni idonee di AcM per successiva purificazione e coniugazione con perossidasi*

Task 3. Sviluppo e studio di fattibilità del test ELISA per la dimostrazione del virus LSD

- 1) *Valutazione di combinazioni di AcM utilizzati come anticorpi di cattura e di rilevazione (marcati con perossidasi) in test ELISA sandwich per identificazione di antigeni del virus LSD in terreni colturali di cellule infettate*

Task 4. Sviluppo e studio di fattibilità di test ELISA per la dimostrazione di anticorpi anti-LSD

- 1) *Disegno e ottimizzazione di un test ELISA indiretto, con utilizzo di AcM selezionati*
- 2) *Disegno e ottimizzazione di un test ELISA competitivo, con utilizzo di AcM selezionati*

Task 5. Validazione dei test prototipo

- 1) *Valutazione dei test sviluppati con sieri sperimentali e di campo*
- 2) *Studio di fattibilità per la trasformazione dei test sierologici home-made in kit pronto-uso, attraverso un processo di stabilizzazione dell'antigene virale pre-adsorbito su piastre ELISA e verifica della stabilità nel tempo.*

## RISULTATI

Attraverso la ricerca è stato prodotto un pannello di 75 AcM. Tra questi, particolarmente interessanti sono risultati quelli specifici per una proteina di peso molecolare 32-35 kDa che è nota essere tra le proteine immunogene del virus. Test di caratterizzazione hanno dimostrato che gli AcM anti-P35 riconoscono epitopi diversi espressi sulla proteina. Oltre che reagenti ideali per la messa a punto di test ELISA, alcuni AcM anti-P35 si sono dimostrati reagenti validi per la rilevazione del virus in test di immunofluorescenza e soprattutto di immunostochimica per studi di patogenesi nel corso di infezioni sperimentali condotte presso enti internazionali di ricerca. Gli AcM prodotti nell'ambito di questa ricerca sono i primi AcM anti-LSDV descritti nella comunità scientifica. La disponibilità di AcM caratterizzati fornisce una risorsa strategica per lo sviluppo di test diagnostici e per acquisire conoscenza sull'antigenicità dei capripoxviruses.

Infatti, un importante aspetto pratico-applicativo della ricerca consisteva nello sfruttamento degli AcM per lo sviluppo di test ELISA sierologici e virologici, finalizzati a colmare lacune esistenti nella diagnostica della LSD. Prodotti finali di questi obiettivi sono:

- Un test ELISA sandwich in grado di rilevare il virus. Il test sfrutta due AcM, uno fissato ai pozzetti di piastre ELISA come Ac di cattura dell'antigene, e un secondo marcato con perossidasi come Ac detector. Il test è stato valutato utilizzando come sorgente di virus il sovrantante di colture cellulari infettate, producendo una curva dose-risposta coerente con la concentrazione virale; gli AcM impiegati nel test ELISA sono candidati ideali anche per lo sviluppo di test antigenici rapidi basati sulla tecnologia Lateral Flow, idonei per diagnosi di campo.
- Due test ELISA sierologici, basati su principi diversi:
  1. un metodo competitivo, specie-indipendente, che sfrutta un AcM di cattura per presentare l'antigene LSD e un secondo AcM diretto verso la proteina immunogena P35, marcato con perossidasi, che identifica i sieri positivi attraverso la competizione generata da eventuali anticorpi omologhi presenti nei sieri in esame per il legame al virus;
  2. un metodo ELISA trapping-indiretta, che utilizza un AcM di cattura per presentare l'antigene LSD alla reazione con i sieri, e un anticorpo monoclonale anti-IgG di ruminanti marcato per rilevare le IgG legate al virus presenti nei sieri positivi.

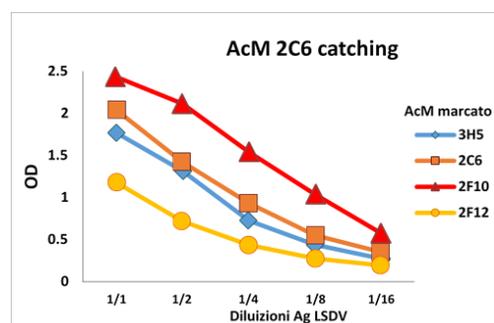
La validazione dei due nuovi test, utilizzando sieri noti negativi, sieri sperimentali e sieri di campo da focolai di LSD o da allevamenti vaccinati, ha dimostrato la capacità di entrambi i test di rilevare sierconversione tra 7 e 14 giorni post-infezione o vaccinazione, con sensibilità superiore rispetto al test di sieroneutralizzazione e rispetto all'unico kit commerciale disponibile. Nonostante il diverso principio delle reazioni, i due test ELISA sierologici hanno dimostrato la migliore concordanza tra risultati nel paragone con un terzo test corrispondente al kit ELISA commerciale, avvalorando l'affidabilità dei risultati prodotti. Entrambi i test identificano anche anticorpi in ovicapri infettati con sheep and goat poxvirus. Infine, lo

studio preliminare per verificare la trasferibilità dei test home-made in kit pronto-uso ha dato evidenza della stabilità delle piastre pre-sensibilizzate con l'antigene, anche in avverse condizioni di conservazione; questo è un presupposto essenziale per kit di lunga shelf-life, e pone le basi per disporre di kit semplici e robusti, la cui accessibilità permetterà di ampliarne lo spettro d'uso e acquisire sempre migliori conoscenze sulla risposta immunitaria, ancora poco conosciuta, verso il virus LSD.

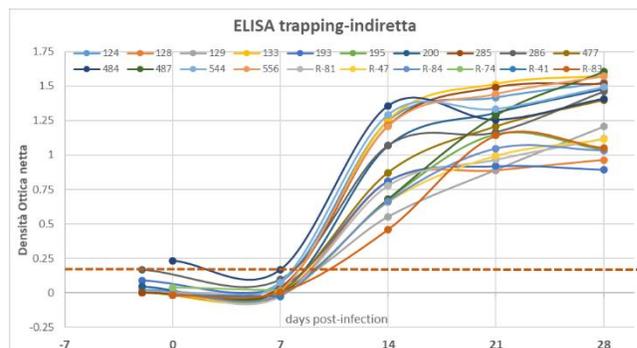
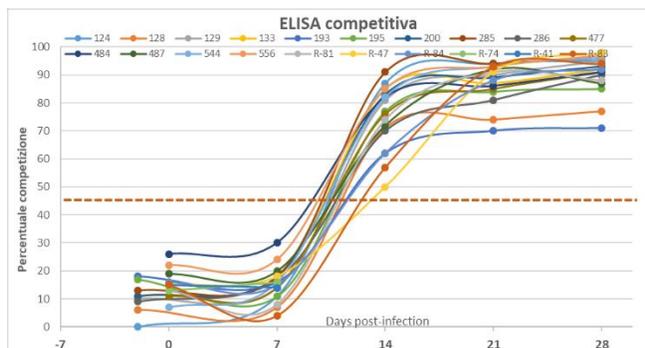
*ELISA sandwich con varie combinazioni di AcM (risultato espresso come massimo valore di Densità Ottica rilevata)*

		AcM marcato-PO			
		3H5	2C6	2F10	2F12
AcM catching	3H5	1,8	2	2,3	1,1
	2C6	1,8	2	2,7	1,2
	2F10	2,3	2,5	2	1,3
	2F12	2	2,1	2,3	0,5
	1D12	0	0	0	0
	6G10	0	0	0	0
	3H7	0	0	0	0

*ELISA sandwich: titolazione dell'antigene (LSDV inattivato grezzo) con diverse combinazioni di AcM (AcM 2C6 sulla fase solida combinato con 4 AcM marcati come detector)*



*Sieroconversione rilevata nei sieri di 20 bovini infettati o vaccinati sperimentalmente ed esaminati con i due nuovi test ELISA sviluppati: ELISA competitiva ed ELISA trapping-indiretta. La linea tratteggiata indica il cut-off delle rispettive analisi.*



## Bibliografia essenziale

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2015. Scientific Opinion on lumpy skin disease. EFSA Journal 2015; 13(1):3986

EFSA Journal 2018; 29 January 2018. Lumpy skin disease II. Data collection and analysis. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2018.5176>

Paolo Calistri, Kris De Clercq, Simon Gubbins, Eyal Klement, Arjan Stegeman, José Cortiñas Abrahantes, Drago Marojevic, Sotiria-Eleni Antoniou, Alessandro Broglia. Lumpy skin disease epidemiological report IV: data collection and analysis. EFSA Journal, Vol 18, issue 2. First published: 27 February 2020 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6010>

Discontools website, <http://www.discontools.eu>

**Parole chiave:** Lumpy Skin Disease, Anticorpi Monoclonali, ELISA per rilevazione antigene, ELISA per rilevazione anticorpi (indiretta, competitiva), validazione test.

Responsabile scientifico: Emiliana Brocchi

Email: [emiliana.brocchi@izsler.it](mailto:emiliana.brocchi@izsler.it); dopo il 31/12/2020: [emiliana.brocchi@gmail.com](mailto:emiliana.brocchi@gmail.com)