

Ricerca corrente IZS VE 11/16

Sviluppo di un test ELISA per la rivelazione del virus respiratorio sinciziale bovino in campioni ex-vivo

Responsabile scientifico: Nicola Pozzato

Il virus respiratorio sinciziale del bovino (BRSV), è uno dei principali agenti virali coinvolti nel complesso respiratorio del bovino (BRD). BRSV ha diffusione cosmopolita e appartiene al genere Pneumovirus (famiglia Paramyxoviridae). In seguito a infezione si osserva escrezione nasale elevata tra 2 ed 8 giorni. La pronta individuazione dell'infezione permette di applicare misure di controllo per ridurre il rischio di diffusione del virus negli e tra gli allevamenti. Una rapida diagnosi può essere eseguita mediante analisi RT-PCR su RNA estratto da tamponi nasali. Tale metodo ha elevati costi e procedure complesse che necessitano di laboratori attrezzati con personale addestrato. Il virus può essere inoltre rilevato mediante immunofluorescenza diretta (IF) ma la sensibilità è minore rispetto alla RT-PCR. Recentemente è entrato nel mercato un test ELISA commerciale a sandwich in formato bicupola che utilizza un siero policlonale anti-BRSV in combinazione con un anticorpo monoclonale che tuttavia presenta livelli accettabili di sensibilità solo su campioni di tessuto polmonare. La scarsa quantità di antigene virale a livello di campioni ex-vivo diluiti (tamponi nasali o tracheali) si riflette quindi in una scarsa sensibilità dei metodi immunologici diretti (ELISA, IF).

Tali limiti diagnostici in questa tipologia di campioni potrebbero essere superati qualora fosse disponibile un robusto test immunoenzimatico che permettesse una diagnosi precoce, rapida ed economica della presenza virale. A tal fine potrebbe essere utilizzato come marcatore virale specifico la proteina F (fusion protein) del BRSV. La proteina F è una delle più importanti glicoproteine dell'envelope virale la cui funzione è di causare la fusione tra la membrane del batterio e quella della cellula dell'ospite. Tale proteina ha le caratteristiche per essere un antigene ideale per scopi diagnostici e può essere espressa come proteina ricombinante in forma glicosilata in sistemi di espressione basati su cellule eucariotiche.

In questo progetto ci proponiamo di sviluppare un pannello di anticorpi monoclonali (mabs) in topi Balb/c immunizzati con ceppi di campo inattivati di BRSV e/o con proteina F ricombinante prodotta e purificata da linee cellulari di insetto trasfettate con baculovirus ricombinante, risultato di una recente ricerca sviluppata presso il nostro laboratorio. Gli anticorpi verranno caratterizzati mediante ELISA e Western blot per la reattività e specificità verso altri agenti virali che causano BRD. Il test BRSV-ELISA verrà messo a punto utilizzando una combinazione di due anticorpi anti-BRSV: uno di essi verrà usato come molecola di cattura dell'antigene sulla superficie del pozzetto e l'altro usato per rivelare il legame del virus/antigene al primo anticorpo. Questo approccio dovrebbe garantire un marcato aumento della specificità del metodo e della sensibilità analitica utilizzando un singolo pozzetto per campione e riducendo i costi di analisi. Qualora i sistemi tradizionali di sviluppo del segnale basati su avidina-biotina-perossidasi non fossero sufficientemente sensibili sui campioni in esame, sarà valutato l'impiego di metodi commerciali di amplificazione del segnale quali High sensitive Avidin-Nucleic-Acid-Nanoassemblies (ANANAS) (4) Tale prodotto si basa sull'uso di nanoparticelle rivestite da poli-avidina da utilizzarsi in alternativa alla avidina monomeric ed è usato in varie applicazioni diagnostiche. Le performance del metodo saranno valutate tramite comparazione con il metodo validato di biologia molecolare (RT-PCR) utilizzato nella routine diagnostica dell'IZSVe.