

**Tabella 5:** Efficacia in vitro di Antec Virkon S® in presenza di 500X10<sup>9</sup> cfu/ml

**Table 5:** In vitro efficacy of Antec Virkon S® using 500X10<sup>9</sup> cfu/ml

Tem po	<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica
5 min	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 46 (1:1000)	0 (1:100) 5 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
15 min	0 (1:100) 9 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)

## COMUNICAZIONE 17

### METODICA ELISA PER L'EVIDENZIAMENTO DI ANTICORPI ANTI-INFLUENZA H7 IN SIERI SPERIMENTALI E DI CAMPO

**P. Cordioli, G. Sala, A. Moreno-Martin, A. Lavazza, S. Rigola, S. Grazioli, E. Brocchi**

*Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Brescia*

Parole chiave: ELISA, anticorpo monoclonale anti-H7, sierologia

#### ELISA Test for detection of influenza H7 antibodies in experimental and field sera

Key words: ELISA, Anti H7 monoclonal antibody, serology

Summary: Using a MAb specific for the H7 of the 2676 LPAI an ELISA test has been developed; the test is able to assess specific H7 antibodies in avian sera. The H7 ELISA has shown a 99% concordance of results with the classical HI test.

Correspondence: P. Cordioli, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" – Via A. Bianchi 9, 25124 Brescia - [diagnvir@bs.izs.it](mailto:diagnvir@bs.izs.it)

#### Introduzione

La recente epizoozia di Influenza da ceppi H7N1 ha determinato un consistente aumento di indagini virologiche e sierologiche. Si è di conseguenza evidenziata la necessità di avere a disposizione un'altra metodica sierologica da utilizzare parallelamente alla inibizione della emoagglutinazione, metodo normato descritto nel D.P.R. 656/96, per controllare sieri dubbi, emolitici o per evidenziare anticorpi nel tuorlo (materiale che prevede diluizioni maggiori per essere utilizzato in inibizione della emoagglutinazione)

#### Materiali e metodi

**Virus:** per la produzione di anticorpi monoclonali è stato utilizzato il ceppo di influenza H7N1 (2676) isolato nel marzo 1999 da un allevamento di tacchini da carne della Provincia di Verona e caratterizzato come ceppo a bassa virulenza dal Centro Europeo per i virus influenzali di Weybridge.

**Anticorpi Monoclonali:** il liquido allantoideo prelevato tra la 48<sup>a</sup> e la 72<sup>a</sup> ora dall'inoculazione è stato ultracentrifugato su cuscinio di saccarosio e inoculato in topi balb/c previa emulsione con adiuvante di Freund completo. Dopo un richiamo con Freund incompleto 4 settimane dopo il primo inoculo, gli animali sono stati richiamati con antigene non adiuvato per via intraperitoneale tre giorni prima della fusione degli splenociti con cellule NS0 secondo metodica standardizzata. Lo screening degli ibridomi è stato eseguito in ELISA su antigene H7N1, H3N2, Virus della Bronchite Infettiva ceppo Mass 41 e liquido allantoideo prelevato da uova SPF non inoculate. La specificità degli anticorpi è stata inoltre valutata in prove di competizione con sieri sperimentali di pollo monospecifici per H7, H5, H9, H6.

**Sieri sperimentali:** mediante infezioni sperimentali in animali SPF di età variabile dai 20 giorni ai 6 mesi sono stati prodotti sieri iperimmuni specifici per H7, H5, H6, H9. Per ciascun sierogruppo sono stati usati 8 animali SPF inoculati per via endovenosa con 0,5 ml di liquido allantoideo e richiamati con il doppio della dose per via intramuscolare 25 giorni dopo. Il salasso in bianco è stato effettuato circa 15 giorni dopo secondo richiamo.

Animali SPF di 20 giorni sono stati vaccinati con vaccino sperimentale H7N1; 4, 6 e 8 settimane dopo un'unica somministrazione di vaccino sono stati salassati e sottoposti a challenge per via intratracheale con ceppo omologo ad alta patogenicità (ceppo 13474). Dopo due settimane gli animali sono stati di nuovo salassati. In totale per la prova di vaccinazione sono stati utilizzati 100 animali SPF ed esaminati 248 sieri.

**Sieri di campo:** per la validazione del test sono stati utilizzati 820 sieri esaminati per la routine diagnostica dell'influenza aviaria presso il Laboratorio Virologia Specializzata dell'IZSLER. Tra questi vi erano anche 27 sieri di galline ovaiole sieropositive per infezione naturale con ceppi a bassa virulenza e, inoltre, 20 campioni di tuorlo proveniente dallo stesso allevamento.

**Test ELISA specifico per anticorpi H7:** piastre per ELISA Nunc maxisorp vengono adsorbite con antigene H7N1 parzialmente purificato alla diluizione d'uso in carbonato-bicarbonato pH 9,6 per una notte a 4°C. I sieri vengono esaminati in due diluizioni 1/5 e 1/10, aggiungendo in ogni piastra i sieri di controllo positivo e negativo e prevedendo dei pozzetti di reazione 100% in cui non viene aggiunto alcun siero; contemporaneamente ai sieri in esame viene aggiunto il monoclonale 3G1 opportunamente diluito. Dopo 1

ora di incubazione le piastre vengono lavate e viene aggiunto un siero anti-IgG di topo coniugato con perossidasi. Al termine di un'altra ora di incubazione viene aggiunto il substrato cromogeno OPD e la lettura viene effettuata tramite spettrofotometro con filtro a 492 nm. Un siero è considerato positivo se inibisce più del 50% il valore di densità ottica dei pozzetti di controllo della reazione.

Test ELISA per anticorpi anti-Nucleoproteina tipo A: per tale test si è utilizzato l'anticorpo monoclonale ATCC N°: HB 65, H16-L10-4R5 e la metodica descritta da de Boer *et al.* (1990)

#### **Risultati**

Anticorpi Monoclonali: con un unico procedimento di fusione sono stati prodotti due ibridomi specifici per il virus H7N1, denominati 2G1 e 3G1. Nessuno dei MAb mantiene la reattività in Western Blotting ma tramite prove di competizione con sieri H7, H5, H6, H9 si è verificato che mentre il MAb 2G1 riconosce tutti i virus esaminati, il MAb 3G1 viene inibito al legame all'antigene solo dal siero H7N1 risultando perciò specifico per tale ceppo. La reattività del MAb 3G1 è probabilmente diretta nei confronti della emoagglutinina H7, in quanto anche sieri immuni nei confronti di H7N3 (gentilmente forniti dalla Dr. I.Capua del Centro di Referenza Nazionale dell'Influenza aviare, IZS delle Venezie) inibiscono il suo legame all'antigene.

Sierologia: i risultati delle indagini effettuate in parallelo con l'ELISA H7 e l'inibizione dell'emoagglutinazione hanno portato ad una perfetta concordanza dei risultati tra le due metodiche come dimostrato in tabella 1.

I 7 sieri positivi all'HI e negativi in ELISA erano campioni che presentavano valori soglia in HI (1/16 - 1/32) e mantenevano il titolo anche dopo inattivazione. Tali sieri provenivano da 5 diversi allevamenti (2 di galline ovaiole e 3 di tacchini da carne) che sottoposti ad ulteriori campionamenti sono risultati sempre negativi. Gli stessi sieri, esaminati con il test ELISA npA sono risultati costantemente negativi.

#### **Conclusioni**

Pur esaminando un numero limitato di sieri la metodica ELISA H7 si è dimostrata altamente specifica e molto versatile anche con campioni di tuorlo, dimostrando i vantaggi tipici di una reazione immunoenzimatica:

- 1) Utilizzo di reagenti standardizzabili;
- 2) Automatizzazione e oggettività della lettura;
- 3) Possibilità di esaminare i sieri in un'unica diluizione;
- 4) Non necessitano trattamenti preliminari dei sieri, quali inattivazione o trattamento con globuli.

E' necessario comunque verificare su un numero ben più elevato di sieri e tuorli la rispondenza dei risultati con il test ufficiale e verificare la possibilità di coniugare direttamente il MAb 3G1 in modo da portare ad una sola ora i tempi necessari per l'esecuzione del test.

#### **Ringraziamenti**

Si ringraziano per la preziosa e costruttiva collaborazione la Dr.ssa D.Gamba e le Sig.re Daniela Bresciani, Francesca Adella e Sara Verzeletti

#### **Bibliografia**

- 1) de Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species". Arch. Virol., 115, 47-61

**Tabella 1:** Confronto dei risultati ottenuti in Inibizione dell'emoagglutinazione ed ELISA

**Table 1:** Comparison of the results obtained with haemoagglutination inhibition test and ELISA

		Inibizione della Emoagglutinazione	
		+	-
ELISA	+	<b>195</b>	<b>0</b>
	-	<b>7</b>	<b>866</b>