

INDIVIDUAZIONE DELLA NUCLEOPROTEINA DEL VIRUS INFLUENZALE TIPO A IN CAMPIONI PATOLOGICI AVIARI CON TECNICA ELISA-SANDWICH

A. Moreno-Martin, P. Cordioli, G. Sala, S. Rigola, A. Lavazza
Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" - Brescia

Parole chiave: influenza A, ELISA, ricerca antigene

ELISA test for Influenza A viral nucleoprotein detection in avian pathological samples

Keywords: influenza, ELISA, antigen detection

Summary: A sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay was developed to detect influenza A viral antigen, using a monoclonal antibody (Mab) directed against type-specific influenza A nucleoprotein. MAb anti-NP was used to coat ELISA plates as well as to prepare the peroxidase conjugate. Viral nucleoprotein was detected from organs homogenates of avian origin. This test is rapid and easy to perform but does not permit influenza A subtyping. Anyway the official test of viral isolation was performed in all the samples.

Correspondence: P.Cordioli, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" – Via Bianchi 9 25124 Brescia - diagnvir@bs.izs.it

Introduzione

Durante l'epidemia di influenza aviaria che ha interessato le regioni del nord Italia negli anni 1999 e 2000, sostenuta da un virus tipo A H7N1, si è evidenziata la necessità di disporre di metodiche diagnostiche rapide per una prima identificazione virale. La metodica diagnostica ufficiale di isolamento ed identificazione virale, che richiede tempi di risposta più lunghi, si basa sull'impiego di uova embrionate di pollo SPF (UEP) spesso di limitata disponibilità per i laboratori. Tuttavia, essa consente l'identificazione del sottotipo virale.

D'altra parte, da tempo è possibile utilizzare una tecnica Double Antibody Sandwich ELISA, con anticorpi monoclonali, per rilevare la presenza della nucleoproteina del virus influenzale tipo A nel liquido allantoideo di uova embrionate inoculate con materiale derivato da diverse specie animali (suino, equino, aviare), uomo compreso. Notoriamente questa tecnica assicura elevata sensibilità e specificità e presenta una relativa semplicità di esecuzione; non consente però di giungere alla diagnosi di sottotipo per la quale si deve ricorrere all'inibizione dell'emoagglutinazione con gli antisieri corrispondenti.

Al fine di ridurre i tempi di risposta si è testato il metodo ELISA, anche a partire direttamente da campioni di visceri di volatili di diverse specie con sintomatologia clinica o comunque sospetti di infezione influenzale.

E' comunque da sottolineare che gli esiti analitici al fine di una diagnosi di certezza, richiedono comunque la conferma tramite le metodiche ufficiali di isolamento ed identificazione virale.

Materiali e metodi

Anticorpo monoclonale: è stato utilizzato un anticorpo monoclonale nei confronti della nucleoproteina A del virus influenzale. Tale anticorpo è stato standardizzato da Yewdell *et al.* (1981) ed è distribuito dalla American Type Culture Collection (ATCC n. HB65, H16-L 10-4R5).

Campioni: la ricerca è stata condotta su estratti di polmone, trachea e tonsille ciecali ottenuti da 210 volatili di specie diverse (pollo 116, tacchino 73, altre 21), conferiti nell'ambito dei controlli eseguiti nel corso dell'epidemia influenzale 1999-2000 in Lombardia. La maggior parte degli animali esaminati presentava

sintomatologia clinica. I campioni, sospesi in Minimal Essential Medium 1/10 (MEM) antibiotato, sono stati utilizzati tal quale e diluiti 1:2 nel test ELISA e successivamente sono stati inoculati in UEP per l'isolamento e identificazione virale.

ELISA: la metodica eseguita è quella descritta da Siebinga e de Boer (1988). Brevemente, le micropiastre di polystirene vengono adsorbite una notte a 4°C con 50 µl della diluizione ottimale del MAb HB65 in tampone sodio carbonato (pH 9,6). Prima dell'uso si eseguono tre lavaggi delle piastre con tampone di lavaggio (PBS A con 0,5% Tween 20). Le diluizioni vengono fatte utilizzando tampone di lavaggio con 1% di lievito e 1% di siero di topo. Vengono quindi aggiunti in due repliche 50 µl di ogni campione sospeso 1:10 in MEM antibiotato e successivamente diluiti 1:2, e quindi il controllo positivo (liquido allantoideo di UEP inoculate con il ceppo A/tacchino/Italia/2676/1999) ed il negativo (liquido allantoideo di UEP SPF). Dopo incubazione per 60 minuti a 37°C e lavaggio, si aggiungono 50µl del MAb HB65 coniugato con perossidasi alla concentrazione d'uso e si incuba per altri 60 minuti a 37°C. Dopo un ulteriore lavaggio, si aggiunge il substrato cromogeno (OPD) attivato con H₂O₂ che viene bloccato dopo 10 minuti con 50 µl di H₂SO₄ 2M. La lettura viene fatta con uno spettrofotometro a 492 nm. Si considerano positivi i campioni che presentano un valore di densità ottica superiore a 0.250

Isolamento ed identificazione virale: Gli estratti, previamente filtrati (0,45 µm), sono stati inoculati in uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni. Il liquido allantoideo raccolto dagli embrioni morti è stato quindi sottoposto alle prove di emoagglutinazione ed inibizione della emoagglutinazione con l'antisiero H7. Il medesimo liquido allantoideo è stato saggiato anche con ELISA secondo la procedura sopra descritta per una prova comparativa.

Risultati e Discussione

Dei 210 campioni analizzati, 189 hanno fornito esito positivo con la metodica ufficiale di isolamento ed identificazione del virus influenzale. Sui campioni positivi, il test ELISA per la ricerca della nucleoproteina a partire dagli estratti d'organo, ha confermato la positività in soli 105 casi.

Complessivamente gli esiti ottenuti indicano che la tecnica ELISA presenta una specificità elevata e dello stesso ordine della metodica ufficiale di isolamento ed identificazione virale. A conferma di ciò è da rilevare che tutti i campioni ottenuti da volatili risultati negativi alla metodica ufficiale, e quindi "non infetti", sono risultati negativi, presentando valori di densità ottica nettamente inferiori al valore soglia di 0.250. Il limitato numero di questi campioni (collegabile al fatto che, nel periodo citato, la stragrande maggioranza dei campioni conferiti al laboratorio risultava positivo al virus influenzale), rende questo risultato, seppur significativo, meritevole di ulteriori conferme.

Dalle stesse prove si ottiene una sensibilità complessiva del test ELISA da estratti d'organo pari al 55,5%; valore relativamente limitato se valutato in senso assoluto, ma comunque interessante se valutato entro i limiti di una prima, e rapida, valutazione nel caso di conferimenti composti da elevati numeri di campioni in periodi di emergenza o da aree territoriali sospette.

Il livello di sensibilità ottenuto è attribuibile a limitate cariche virali nei visceri. A conferma di ciò è da sottolineare che, dopo il passaggio del materiale su UEP per incrementare il titolo virale, si è potuta evidenziare la positività di tutti i campioni di liquido allantoideo sottoposti alla medesima metodica analitica.

Conclusioni

Tabella 1: confronto dei risultati ottenuti con i tests utilizzati

Table 1: Comparison of the results obtained with the test used

	Numero campioni	Positivi		Negativi	
Metodica Ufficiale	210	189		21	
ELISA su LA	210	189		21	
ELISA su EO	210	+ 105	- 84	+ 0	- 21

LA: liquido allantoideo; EO: estratti d'organo

Il test ELISA risulta di facile e rapida esecuzione e soprattutto, quando eseguito sugli estratti di visceri, permette di ottenere esiti in tempi ridotti (fino a poche ore).

Tale aspetto, insieme alla ottimale specificità ottenuta, rende il test particolarmente adatto a far fronte alle particolari esigenze che si vengono a creare quando ci si trovi ad operare in condizioni particolari quali quelle verificatesi nelle regioni del Nord Italia nel periodo di massima diffusione dell'epidemia influenzale.

La possibilità di eseguire un elevato numero di analisi, con tempi di risposta brevi e di affermare con relativa certezza che i campioni positivi corrispondono effettivamente a campioni infetti, ha consentito, infatti, di fornire indicazioni utili agli operatori del Servizio Sanitario sul territorio.

E' tuttavia evidente che, anche in considerazione della sensibilità limitata del ELISA, gli esiti definitivi devono essere forniti soltanto attraverso la metodica ufficiale.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

- 1) Siebinga J.T., de Boer G.F. (1988) "Influenza A viral nucleoprotein detection in isolates from human and various animal species" Archives of Virology 100: 75-87.
- 2) Yewdell J.W., Frank E., Gerhard W. (1981) "Expression of influenza virus internal antigens on the surface of infected P815 cells" J Immunology 126: 1814-1819