

COMUNICAZIONE 20

SVILUPPO, VALIDAZIONE E STANDARDIZZAZIONE DI UN TEST ELISA COMPETITIVO PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE

A. Toffan, A. Zuin, D. Buson, B. Tramontan, I. Capua

Area Sanità Animale, Laboratorio di virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: ELISA competitivo, NDV, HI, SN

Development, validation and standardization of a competitive ELISA for the detection of antibodies against Newcastle disease

Key words: competitive ELISA, NDV, HI, SN

Summary: Newcastle disease (ND) is regarded throughout the World as one of the most important disease of poultry and for this reason is included as an OIE list A disease. In the present paper 680 sera of chicken and 690 sera of turkey were tested for ND by inhibition of haemoagglutination test (gold standard for these two species) and by ELISA and 326 sera of ostrich were tested by seroneutralization test (gold standard for this species) and by ELISA. The results of the different tests were compared in order to detect the test with best specificity and sensibility. The data obtained show that ELISA has good values of sensibility and specificity, moreover ELISA is fast and easy to perform and for these reasons it could be very useful for routinely diagnostic use.

Correspondence: Anna Toffan, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD) e-mail: virologia@izsvenezie.it

Introduzione

La malattia di Newcastle (ND) o pseudopeste aviare è una delle patologie più diffuse a livello mondiale nonché una delle maggiori cause di perdite per le specie aviarie, raggiungendo nelle specie sensibili picchi di mortalità superiori al 50%. Il virus responsabile della malattia è un *Paramyxovirus* tipo 1 appartenente al genere *Avulavirus*, famiglia dei *Paramyxoviridae* ordine dei *Monegavirales*.

La malattia è inclusa nella Lista A dell'Office International des Epizooties (OIE) e al riguardo sono state emanate specifiche misure di legge in tutta la comunità europea (92/66/CEE), recepite in Italia dal DPR 657/96.

L'indagine sierologica è il principale metodo utilizzato per evidenziare la presenza di anticorpi specifici nel siero, in particolare con i test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) e di siero neutralizzazione (SN). Il test ELISA in esame si propone come valida alternativa ai tradizionali test anche per specie diverse da pollo e tacchino.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 1696 sieri di cui 680 di pollo (*Gallus gallus*), 690 di tacchino (*Meleagris gallopavo*) e 326 di struzzo (*Struthio camelus*). I sieri utilizzati sono stati scelti tra quelli inviati per accertamenti al laboratorio di virologia aviare dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie.

L'antigene virale è stato prodotto, purificato e conservato nei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie.

E' stato utilizzato un anticorpo monoclonale specifico per il ceppo virale utilizzato: U85 proveniente dai laboratori di virologia di Weybridge (Veterinary Laboratories Agency UK).

Come antisiero specifico per il Mab è stato utilizzato un anticorpo marcato con idrogeno perossidasi (HPR) di topo prodotto dalla ICN Biomedicals Inc.

Sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti del tipo Nunc Products Immuno Plate TM Polysorp Surface (Denmark Production).

Ogni campione è stato testato su due pozzetti, la media matematica delle densità ottiche (OD) dei due pozzetti trasformata in percentuale di inibizione (PI) è stata considerata come risultato finale.

I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti alle prove di HI per pollo e tacchino e di SN per lo struzzo (in quanto per questa specie l' HI non è una prova attendibile (1,3,8), allo scopo di ottenere: cut-off, correlazione (K) tra i due test, sensibilità (Se) e specificità (Sp) relativa (4,2,5).

Inoltre sono state effettuate prove di riproducibilità, ripetibilità del test e stabilità delle piastre congelate.

Risultati

Per la specie pollo, con una soglia di cut-off (in PI) pari a 50 si ottiene una sensibilità di 91,76%, una specificità di 92,27% e una concordanza al test dell'HI di 0,837 (che corrisponde ad una concordanza quasi perfetta tra i test (7).

Per la specie tacchino, con una soglia di cut-off (in PI) pari 25 si ottiene una Se di 97,01% e una Sp di 83,49% e una concordanza tra al test dell'HI di 0,772 (che corrisponde ad una sostanziale concordanza tra i test (7).

Per la specie struzzo con una soglia di cut-off (in PI) pari a 10 si ottiene una Se di 46,41% e una Sp di 91,67% e una concordanza al test dell'SN di 0,4 (che corrisponde ad una moderata concordanza tra i test (7).

Le prove effettuate sulle piastre congelate hanno confermato la possibilità di adsorbire in anticipo e conservare a -20°C le piastre per almeno 180 giorni.

Le prove di ripetibilità hanno fornito valori in coefficiente di variazione (CV) compresi tra 4 e 8%.

Le prove di riproducibilità hanno fornito valori in coefficiente di variazione (CV) compresi tra 7 e 21% (6)

Discussione

Esistono numerosi test di laboratorio in grado di evidenziare la presenza di anticorpi (Ab) specifici per NDV nel siero. Tra tutti l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) è probabilmente il più utilizzato perché rapido e di semplice esecuzione, tanto da essere diventato l'unico metodo di referenza per questa malattia. Tuttavia l'inibizione dell'emoagglutinazione presenta dei limiti, principalmente per quanto riguarda la standardizzazione della prova nei diversi laboratori. Inoltre non è noto se è in grado di rivelare anticorpi

anti-ND in tutte le specie. Infine alcuni sieri possono contenere emoagglutinine aspecifiche attive sui globuli rossi di pollo che possono invalidare la prova.

Per questo il test sicuramente più utile è la sieroneutralizzazione (SN) in quanto la presenza del virus vivo fornisce informazioni, non solo sulla presenza di anticorpi, ma anche sulla loro reale capacità protettiva per l'animale vivo nei confronti della malattia. La sieroneutralizzazione però è una prova indagativa: richiede tempi di realizzazione lunghi, materiale idoneo e sterile, e tecnici di laboratorio specializzati.

Proprio per questi motivi negli ultimi anni si è andata sviluppando la ricerca di un nuovo test sensibile, ma anche di facile e rapida esecuzione. I test ELISA rispondono a tutte queste caratteristiche ed in più hanno dimostrato di essere facilmente confrontabili con l'inibizione dell'emoagglutinazione, che rimane comunque il test di riferimento.

Un ulteriore passo in avanti è stato la produzione di anticorpi monoclonali (Mab) (6) specifici per PMV-1 in modo da poter sviluppare un test ELISA di tipo competitivo. Quest'ultimo test presenta il vantaggio di non avere i limiti di specie-specificità dei test immunoenzimatici tradizionali, e quindi di poter essere utilizzato indifferentemente con il siero proveniente da qualsiasi specie aviaria. Inoltre il test ELISA competitivo poiché utilizza il virus *in toto* adsorbito alla piastra presenta una maggiore sensibilità in quanto rileva gli anticorpi contro tutti gli epitopi virali e non solo quelli inibenti l'emoagglutinazione.

Il test ELISA competitivo oggetto della seguente tesi si è dimostrato un test di semplice e rapida esecuzione nonché dotato di elevata riproducibilità e ripetibilità. La possibilità di utilizzare le piastre congelate (che si sono dimostrate stabili per almeno 180 giorni) ne aumenta ulteriormente la semplicità di applicazione.

La flessibilità del test, inoltre, permette di adattarlo alle diverse esigenze che variano a seconda della situazione epidemiologica della regione in cui viene usato. Infatti al variare dei valori di cut off si ottengono per ogni specie dei valori diversi di sensibilità e specificità. Questo permette di poter scegliere la soglia di cut off a seconda dell'obiettivo dell'indagine. Per esempio qualora un paese indenne volesse importare volatili da un paese endemico si potrebbe abbassare la soglia del cut off (cioè aumentare la sensibilità) in modo da evidenziare ogni animale positivo per la presenza di anticorpi (infetto o vaccinato). Al contrario se l'importazione avvenisse tra paesi endemici bisognerebbe alzare la soglia di cut off (aumentare la specificità) al fine di accertare che tutti gli animali siano stati vaccinati e abbiano risposto in modo adeguato all'intervento vaccinale.

Per questo l'ELISA competitiva risulta particolarmente adatto a testare in tempi brevi elevati numeri di campioni oppure come "screening di massa" per

caratterizzare dal punto di vista immunologico una popolazione di animali.

Data la rigida legislazione in materia, la possibilità di sfruttare in questo modo un test diagnostico può consentire ai paesi importatori un notevole risparmio in tempo e denaro.

La semplicità di esecuzione e di produzione dei reagenti e la possibilità di ottenere il Mab da una fonte accreditata (Centro di Riferenza Comunitario) indica che questo test potrebbe essere applicato per la diagnosi di NDV nel territorio dell'UE oltre che nei paesi terzi che hanno scambi commerciali con i paesi dell'UE.

Il presente studio ha dimostrato inoltre la scarsa affidabilità del test dell'inibizione dell'emoagglutinazione per lo struzzo, specie che presenta peculiarità incompatibili con i normali test di laboratorio. Anche il test ELISA competitivo ha dovuto essere modificato e adattato a questa specie, ma il test di riferimento resta comunque la sieroneutralizzazione; sarà quindi necessario sviluppare metodi alternativi per la diagnosi di NDV nello struzzo.

Tale ELISA competitivo può essere utilizzato per la diagnosi di NDV anche in altre specie di volatili, anche se è necessario adattarlo ad ogni singola specie date le diversità osservate nel presente lavoro per pollo, tacchino e struzzo.

Bibliografia

1. Alexander, D.J. (2000) Newcastle Disease in ostriches (*Struthio camelus*) a review. *Avian Pathology* 29 pp 95-100
2. Brown, J.; Resurreccion, R.S. & Dickson, T.G. (1990) Correlation of haemoagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology* 34, 585-587
3. Cadman, H.F., Kelly, P.J., De Angelis, N.D., Rodhe, C., Collins, N. & Zulu, T. (1997) Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle Disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) *Avian Pathology* 26 pp 357-363.
4. Christensen J.; Garder A.I. (2000) Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal disease. *Preventive Veterinary Medicine* 45 pp 83-106
5. Cvelic'-Cabrilo, V., Mazija, H., Bidin, Z. & Ragland, W. (1992) Correlation of haemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology* 21 pp 509-512
6. Czifra, G., Nilsson, M., Alexander, D.J., Manvell, R., Keckesmeti, S. & Engstrom, B.E. (1996) Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathology* 25 pp 691-703
7. Everitt, R.S. (1989) *Statistical Methods for Medical Investigation*. Oxford University Press. New York Edward Arnold London
8. Koch, G., Czifra, G. & Engstrom, B.E. (1998) Detection of Newcastle Disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. *Veterinary Record* 143:10-12.