



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI DIAGNOSTICA  
DI LABORATORIO VETERINARIA**



**REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**



# **X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.**

**Alghero**

Hotel Calabona

*22-24 Ottobre 2008*

**PROGRAMMA PRELIMINARE**

## CHIKUNGUNYA: PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI E LORO UTILIZZO NELLA DIAGNOSI SIEROLOGICA

**Lelli D., Moreno A., Lavazza A., Sozzi E., Luppi A., Canelli E., Tamba M., Capucci L., Brocchi E., Cordioli P.**  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia

*Key words: Chikungunya, anticorpi monoclonali, ELISA competitiva*

### SUMMARY

*Chikungunya virus* (CHIKV) is an Arbovirus member of the genus *Alphavirus* and belongs to the Semliki Forest (SF) antigenic complex. In this study CHIKV strain isolated in Ravenna (Italy) was used to generate a panel of monoclonal antibodies. Two neutralising anti-CHIKV MABs, 1A7 and 1H7, were selected and used to develop a competitive ELISA test for the detection of antibodies in human and animal sera.

All 20 human sera (10 positive and 10 negative) were correctly identified. All 493 animal sera from different animal species resulted negative.

### INTRODUZIONE

Il virus Chikungunya (CHIKV) è un Arbovirus (artropod-borne-virus) trasmesso ai vertebrati tramite la puntura di zanzare infette appartenenti al genere *Aedes*, in particolare *Aedes Aegypti*, non presente in Italia, e *Aedes Albopictus*, ormai stabilmente presente nel nostro paese.

CHIKV è un virus ad RNA situato all'interno della famiglia *Togaviridae* ed al genere *Alphavirus* costituito da 29 specie raggruppate in gruppi antigenici sulla base di reazioni sierologiche crociate. CHIKV si trova all'interno del Semliki Forest antigenic complex (1). Il genoma virale di CHIKV codifica per quattro proteine non strutturali (nsP1-4) e cinque proteine strutturali (C, E3, E2, 6K e E1).

L'epidemia di febbre da CHIKV verificatasi nel corso dell'estate 2007 nelle province di Ravenna, Forlì-Cesena, Bologna e Rimini (2,3) rappresenta il primo focolaio europeo autoctono di malattia tropicale trasmessa da vettori (4). Durante quell'epidemia, presso il Laboratorio di Virologia e Sierologia Specializzata dell'IZSLER venne isolato CHIKV da un campione costituito da un pool di *Aedes albopictus* prelevato nella zona di Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna (2).

In questo studio, il ceppo 209395/07 isolato in Romagna è stato utilizzato per la produzione di anticorpi monoclonali (MABs) successivamente impiegati in un test ELISA competitivo per la diagnosi sierologica di Chikungunya in sieri di animali di varie specie allevati nella zona dove si è verificata la sintomatologia clinica da CHIKV. Ad oggi il ruolo degli ospiti vertebrati animali nel mantenimento dell'infezione è ancora poco chiaro.

### MATERIALI E METODI

#### Virus

Il virus utilizzato per la produzione di anticorpi monoclonali e come antigene nella reazione ELISA è il ceppo 209395/07 isolato da un omogenato di pool di insetti (*Aedes albopictus*) precedentemente risultato positivo alla PCR per CHIKV (2).

L'isolamento è stato eseguito su colture cellulari VERO e BHK21. Per la produzione di anticorpi monoclonali il virus è stato coltivato, concentrato e parzialmente purificato mediante ultracentrifugazione attraverso cuscino di saccarosio.

L'antigene così preparato è stato utilizzato per l'immunizzazione di topi Balb/c, per lo screening in ELISA degli ibridomi, nel test Western-Blotting e come sorgente di antigene nel test ELISA competitiva.

#### Anticorpi Monoclonali (MABs)

Topi Balb/c sono stati immunizzati mediante inoculazione sottocutanea con antigene parzialmente purificato in adiuvante completo di Freund seguita, dopo 30 giorni, da una

inoculazione intraperitoneale di antigene non adiuvato. Tre giorni dopo, gli splenociti sono stati ibridizzati con cellule di mieloma murino NS0 in presenza di Peg 4000 secondo una metodica standardizzata. Lo screening e la successiva caratterizzazione degli ibridomi ottenuti sono state eseguiti mediante:

- ELISA indiretta, svolta con antigene purificato adsorbito alle piastre, incubazione dei sovranatanti delle colture di ibridomi, seguita da identificazione dei MABs con anti-immunoglobuline murine coniugate a perossidasi e sviluppo della reazione cromogena con soluzione di OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ogni incubazione era separata da cicli di lavaggio ed i volumi di reazione erano 50 µl/pozzetto.

- Immunoperossidasi (IP), eseguita analizzando i sovranatanti degli ibridomi su cellule VERO infettate e non infette in parallelo, per verificare la specificità delle reazioni positive.

- Virusneutralizzazione (VN): diluizioni scalari in base due dei vari monoclonali sono state aggiunte di un egual volume di sospensione virale del ceppo CHIKV 209395/07 contenente 100 TCID<sub>50</sub>. Dopo un periodo di incubazione per un ora a 37°C, alla miscela virus-MABs, sono state aggiunte cellule VERO ed in seguito ad una ulteriore incubazione per 48-72 ore a 37°C è stata eseguita la lettura valutando l'effetto citopatico.

- Western blotting (WB): la separazione elettroforetica di CHIKV è stata realizzata su gel di poliaccrilamide al 12%. In seguito al trasferimento su membrana di nitrocellulosa sono stati saggiati i MABs prodotti e 4 sieri umani (2 positivi e 2 negativi) utilizzati come controllo. Gli immunocomplessi sono stati evidenziati utilizzando come anticorpi secondari anti-Ig murine o anti-Ig umane rispettivamente, coniugati con fosfatasi alcalina.

Alcuni ibridomi selezionati sono stati clonati per diluizione limite, coltivati su scala più ampia ed i relativi prodotti (MABs) sono stati concentrati e coniugati con perossidasi.

#### Sieri

Sono stati esaminati 20 sieri umani noti e 493 sieri animali appartenenti a cinque differenti specie.

I sieri umani, 10 positivi e 10 negativi per la presenza di anticorpi anti-CHIKV sono stati forniti dal Prof. Sambri responsabile del Centro di Riferimento Regionale per le Emergenze Microbiologiche (CRREM) del Policlinico S.Orsola Malpigi di Bologna.

I 493 sieri animali sono suddivisi nelle seguenti popolazioni:

- 256 sieri di cane
- 28 sieri di nutria
- 79 sieri di pollo
- 123 sieri di piccione
- 7 sieri di coniglio.

Tutti i sieri di nutria, di pollo, di piccione e 62 dei 256 sieri di cane sono stati prelevati nelle aree colpite dai focolai di febbre da Chikungunya (comuni di Castiglione di Cervia e Castiglione di Ravenna); i restanti 194 sieri di cane e i 7 sieri di coniglio provengono da aree non interessate dall'epidemia Chikungunya. Tutti i sieri animali sono stati prelevati circa sei mesi dopo l'ultimo caso di malattia nell'uomo.

### RISULTATI

#### Anticorpi Monoclonali.

Il procedimento di fusione ha generato 45 ibridomi produttori MABs reattivi verso l'antigene desiderato, 9 dei quali in grado di neutralizzare il virus.

2 MAbs anti-CHIKV (1H7 e 1E10) sono risultati positivi in WB, evidenziando una banda del peso molecolare di 50 Kd riferibile alle glicoproteine E1 ed E2 dell'envelope (5). I sieri umani positivi usati come controllo hanno anch'essi evidenziato la medesima banda, oltre ad una ulteriore banda riconducibile alla proteina C del capsido. Nessuna banda è stata evidenziata dai sieri umani negativi.

Considerando la reattività nelle prove di screening (ELISA indiretta ed IP), la capacità di neutralizzare l'infettività virale e i risultati nell'WB, sono stati selezionati due MAbs, 1H7 e 1A7 (Tab.1), per lo sviluppo di un test ELISA competitivo volto alla rilevazione di anticorpi anti-CHIKV indipendentemente dalla specie in esame.

MAbs	Screening		VN	WB
	IP	ELISA		
<b>1H7</b>	+++	+++	+	+ 50kDa (E2)
<b>1A7</b>	+++	+++	++	Negativo

Tab.1: Caratteristiche dei MAbs selezionati

Entrambi i MAbs 1H7 e 1A7 presentano una reattività intensa in ELISA indiretta e IP, entrambi neutralizzano l'infettività virale, ma mentre 1H7 (positivo in WB) riconosce un epitopo di tipo lineare, 1A7 (negativo in WB) reagisce verso un epitopo conformazionale. Benché i due epitopi sono distinti, essi non sono indipendenti nella struttura virale poiché, in test ELISA di competizione reciproca, i MAbs 1H7 e 1A7 competono reciprocamente per il legame al virus (non mostrato)

#### ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-CHIKV

La reazione è stata sviluppata utilizzando in parallelo i 2 MAbs coniugati (1A7, 1H7). Il principio del test e la procedura sono di seguito descritti.

Piastrine per ELISA Nunc maxisorp sono state adsorbite con l'antigene CHIKV in concentrazione saturante. Dopo la fase di lavaggio, 50 µl di ogni siero sono stati aggiunti nella piastra di reazione ed esaminati in quattro diluizioni: da 1/5 a 1/40. Immediatamente dopo sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 25µl di MAb coniugato con perossidasi ad una diluizione predeterminata, in grado di generare una densità ottica intorno a 1,5. Dopo un'ora di incubazione a 37° C e la successiva fase di lavaggio è stato aggiunto il substrato cromogeno (OPD+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per lo sviluppo della reazione; la lettura è stata eseguita tramite spettrofotometro a λ 492 nm. Il risultato è espresso come percentuale di inibizione della reazione rispetto ai pozzetti di controllo (assenza di siero). I sieri in esame sono considerati positivi se inibiscono il 75% o più della reazione di controllo alla prima diluizione esaminata.

#### Sierologia

Nel test ELISA sviluppato, i 10 sieri positivi umani hanno mostrato una elevata reattività, con capacità di inibire totalmente il legame di entrambi i MAbs coniugati utilizzati (1H7, 1A7) anche alla più alta diluizione esaminata (Fig. 1). I sieri umani negativi sono stati confermati, non mostrando alcuna reattività nel test ELISA competitivo.

I 493 sieri di varie specie animali non hanno manifestato alcuna attività di inibizione del legame all'antigene nei confronti dei monoclonali marcati utilizzati, risultando tutti negativi per anticorpi anti-CHIKV.

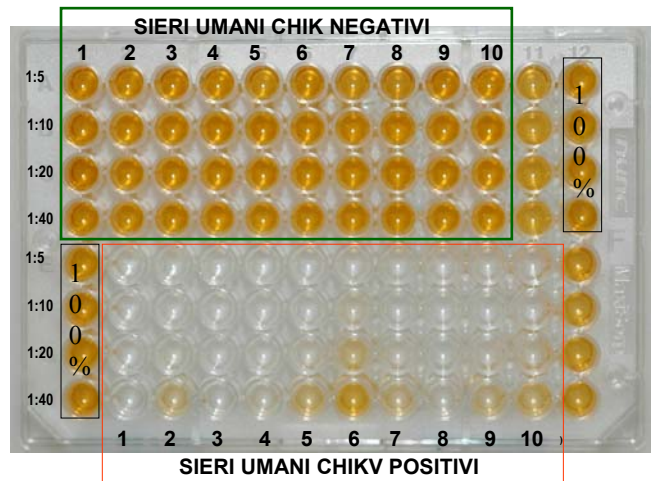


Fig. 1: ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-CHIKV eseguita su sieri umani positivi e negativi.

#### DISCUSSIONE

I MAbs anti-CHIKV selezionati presentano un'ottima reattività quando testati in immunoperossidasi ed ELISA indiretta. I risultati ottenuti in VN, WB ed ELISA competitiva dimostrano che il MAb 1H7 reagisce nei confronti di un epitopo lineare presumibilmente presente sulla proteina E2 mentre 1A7, reagisce verso un epitopo conformazionale presente sulla medesima proteina. Entrambi gli epitopi sono coinvolti nei meccanismi di neutralizzazione virale.

Il test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti-CHIKV messo a punto in questo studio ha identificato correttamente i venti sieri umani (10 positivi e 10 negativi). Lo stesso test è stato utilizzato per una indagine sierologia condotta su 493 animali prelevati nelle aree colpite dai focolai di febbre da CHIKV senza evidenziare alcuna positività. Sarebbe quindi che, durante l'epidemia italiana, l'infezione abbia circolato solo all'interno di un ciclo urbano (uomo-vettore-uomo). Questo è in accordo con quanto riportato in bibliografia da diversi autori secondo i quali, il ciclo silvestre della malattia sarebbe presente solo nel continente Africano, dove i primati non umani rappresentano i principali reservoir d'infezione (6).

L'esame sierologico, soprattutto se praticato attraverso un test rapido, di facile esecuzione ed applicabile a più specie animali come il test ELISA competitivo, rappresenta un mezzo diagnostico utile per comprendere l'epidemiologia di questa malattia e l'effettivo ruolo degli animali nel ciclo di diffusione del virus.

**Ringraziamenti:** si ringraziano Daniela Gamba e Giuliana Botti per il supporto tecnico nella produzione dei MAbs e nelle prove di WB rispettivamente, il Prof. Vittorio Sambri per la fornitura dei sieri umani.

#### BIBLIOGRAFIA

- Weaver S.C. et al. (2005). Togaviridae. In *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edit by C. M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. Academic Press, Elsevier. 999-1008.
- Bonilauri P. et al. (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis*. 14(5):852-4.
- Rezza G. et al. (2007). Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 370(9602):1840-6.
- Dottori M. et al. (2008). Primo focolaio europeo autoctono di malattia tropicale trasmessa da vettori in Romagna. *Praxis Vet*. Vol IXXX n 1/2008: 2-9.
- Bréhin A. C. et al., (2008). Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology*. 371: 185-195.
- Diallo M. et al. (1999). Vectors of chikungunya virus in senegal: current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 60: 281-6.