



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

---

## **Relazione sulla messa a punto e sperimentazione di un nuovo test per la diagnosi sierologica di infezione da Virus Toscana.**

Esiste solo un kit immunoenzimatico in commercio per la diagnosi sierologica di infezione da virus Toscana, tuttavia potrebbe esser utile, disporre di un test rapido per la sierodiagnosi. A tal proposito abbiamo pensato di sfruttare la Nucleoproteina virale come antigene immunodominante da usare in immunocromatografia per diagnosi sierologica di infezione da Virus Toscana.

Con la collaborazione di InBios International, che ha fornito il supporto tecnico per lo stick immunocromatografico, siamo riusciti a creare un test rapido per screening IgM/IgG anti virus Toscana.

Per valutare del test, abbiamo fatto un confronto tra il test ELISA e questo immunocromatografico (ICA) utilizzando sieri di soggetti ospedalizzati con sospetta meningite da Virus Toscana.

Entrambi i saggi hanno prodotto risultati concordanti, sia per IgG e IgM. La sensibilità di questo nuovo test rispetto a quella dell' ELISA, che viene utilizzato di routine, è risultata 98,5% per IgM e 90,1% per le IgG, mentre la specificità è stata del 100% in entrambi i casi. Questi dati mostrano che ICA potrebbe essere un test alternativo affidabile per la diagnosi sierologica di infezione TOSV negli esseri umani.

Per il saggio immunocromatografico (ICA), la nucleoproteina ricombinante TOSV è stata “spottata” sulla linea di test della membrana di nitrocellulosa. In breve, la sequenza TOSV N (NCBI adesione N ° EF201833) è stata amplificata mediante RT-PCR da RNA virale e clonata nei siti NdeI- XhoI di pET28a vettore (Novagen, Madison, Wisconsin, USA). La proteina è stata poi espressa in (DE3)



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

---

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

---

cellule BL21. La proteina purificata è stata utilizzata successivamente per lo sviluppo dell' ICA e la produzione di anticorpi monoclonali per il rilevamento dell'antigene. La linea di controllo è dovuta alla reattività di anticorpi di capra anti IgY di pollo. Il coniugato è stato preparato sia con anti IgM umane di capra, coniugate con oro colloidale, sia con proteina A coniugata con oro colloidale, a seconda che si ricercassero IgM o IgG. In entrambi i casi, IgY di pollo coniugate con oro colloidale sono state aggiunte come controllo del dispositivo. La presenza di qualsiasi linea rosata, in combinazione con una linea rossa di controllo positiva, è stata considerata come risultato positivo. Una linea di controllo positivo, non accompagnata da alcuna linea evidente del test, è stata considerata come risultato negativo. Il colore appare in base alla presenza di anticorpi specifici presenti nel siero e il cambiamento di colore può essere osservato entro 15 min. Per confermare i risultati, un test di immunofluorescenza e un saggio di neutralizzazione sono stati effettuati su campioni che hanno prodotto dati discordanti.

Le strisce utilizzate in ICA possono essere mantenute a temperature ambiente, risultando, così, molto utili in aree dove il mantenimento della bassa temperatura è fondamentale per il buon esito del test.



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

*Dipartimento di Biotecnologie Mediche*

---

Articolo accettato per pubblicazione:

Comparison of a new prototype immunochromatographic assay and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies against Toscana virus.

Houghton R, Gori Savellini G, Chen H, Stevens Y, Moon J, Morkowski S, Raychaudhuri S, Valentini M, **Cusi MG**. J Virol Methods. 2013 Jan;187(1):182-4.

Siena 22.10.2014

Prof. Maria Grazia Cusi