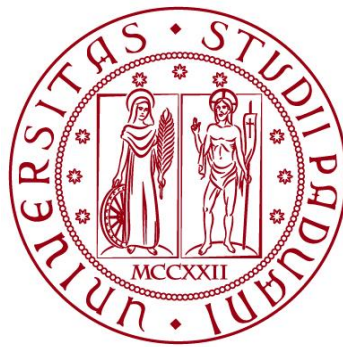


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Valutazione dell'infezione da virus Hazara sulla
proliferazione delle cellule di zecca**

**Tutor: Prof. Cristiano Salata
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Co-tutor: Dott. Michele Paccagnella
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureanda: Laura Lunardi

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

Indice	1
1 Abstract	3
2 Stato dell'arte	5
2.1 La febbre emorragica della Crimea-Congo	5
2.2 Agente eziologico: struttura e ciclo replicativo	6
2.3 Il ruolo delle zecche come vettori e <i>reservoir</i> del virus	7
2.4 Il modello sperimentale costituito dalle cellule di zecca	7
2.5 Il virus Hazara per studiare le interazioni virus-vettore	8
3 Approccio sperimentale	10
3.1 Linee cellulari	10
3.1.1 HAE/CTVM8	10
3.1.2 Vero – CCL81	10
3.2 Tecniche di biologia cellulare	10
3.2.1 Conta delle cellule	10
3.2.2 Semina delle cellule di zecca	11
3.2.3 Infezione delle cellule di zecca	11
3.2.4 Immunofluorescenza su cellule di zecca	11
3.2.5 Semina delle cellule di mammifero	13
3.2.6 Infezione delle cellule di mammifero	13
3.2.7 Titolazione virale	13
3.3 Tecniche di biologia molecolare	14
3.3.1 PCR delle vDNA	14
3.3.2 Preparazione del gel di agarosio al 2%	15
3.3.3 Preparazione dei campioni e gel elettroforesi	15
4 Risultati	16
4.1 Curva di crescita delle cellule HAE/CTVM8	16
4.1.1 Cellule infettate a MOI 0,1	16
4.1.2 Cellule infettate a MOI 0,1 e 1	17
4.2 Sensibilità e permissività delle cellule all'infezione	18
4.2.1 Immunofluorescenza su cellule di zecca	18
4.2.2 Titolazione virale	19
4.2.3 Cinetica di produzione della progenie virale	19
4.2.4 Gel di agarosio delle vDNA	20
5 Discussione	22
Bibliografia	25

1 Abstract

La febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHF) è una zoonosi emergente causata dal virus della CCHF (CCHFV) che è trasmesso dal morso di zecche appartenenti principalmente al genere *Hyalomma*. Il CCHFV occasionalmente può infettare l'uomo e causare una malattia grave con un tasso di letalità dal 5%-80% e può essere manipolato solamente in laboratori di biosicurezza di livello 4 (BSL-4). I ricercatori hanno adottato il virus Hazara (HAZV) come surrogato del CCHFV in virtù delle similarità strutturali e antigeniche e poiché non esistono evidenze che sia patogeno per l'uomo è manipolabile in laboratori BSL-2. La potenziale minaccia rappresentata dal CCHFV richiede uno sforzo importante nello studio della biologia virale e nello sviluppo di metodi di prevenzione e controllo dell'infezione. La presente tesi si inserisce in un progetto di ricerca di base sui rapporti virus-vettore e valuta l'effetto dell'infezione da HAZV sulla proliferazione delle cellule di zecca. In parallelo è stata verificata anche la cinetica di infezione di HAZV nelle cellule di zecca valutando la produzione della progenie virale, la diffusione dell'infezione nelle cellule e la produzione delle *viral-derived DNA* (vDNA), corte sequenze di DNA prodotte dalla retroscrittazione dell'RNA genomico virale ad opera di retrotrascrittasi endogene.

2 Stato dell'arte

2.1 La febbre emorragica della Crimea-Congo

La febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHF) è una malattia zoonotica causata dal virus della febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHFV) che viene trasmesso all'uomo e ad altri animali vertebrati dal morso di zecche infette. Tuttavia, la patologia è stata riscontrata solamente nell'uomo, che può ricevere il virus oltre che direttamente dalle zecche infette anche dal contatto con fluidi biologici di animali viremici o di altri soggetti sintomatici. La maggior parte delle volte la CCHF viene superata in maniera asintomatica o causa febbre accompagnata da sintomi aspecifici e non richiede ospedalizzazione; tuttavia occasionalmente può progredire a una malattia emorragica severa che può risultare fatale dal 5% all'80% dei casi [7]. Non esistono ancora farmaci né vaccini per curarla e prevenirla, infatti al momento l'unica terapia possibile in caso di infezione grave è quella di supporto.

Finora sono stati registrati casi di CCHF in più di 30 nazioni di Asia, Medio-Oriente, Europa meridionale e sud-orientale e Africa [4]. La cartina in *Figura 1* illustra la distribuzione geografica della CCHF secondo i dati OMS del 2017. Ogni anno nel sud-est europeo e in Turchia si registrano più di mille casi [4], ma le stime potrebbero essere imprecise perché non esistono sistemi di sorveglianza attiva [1].

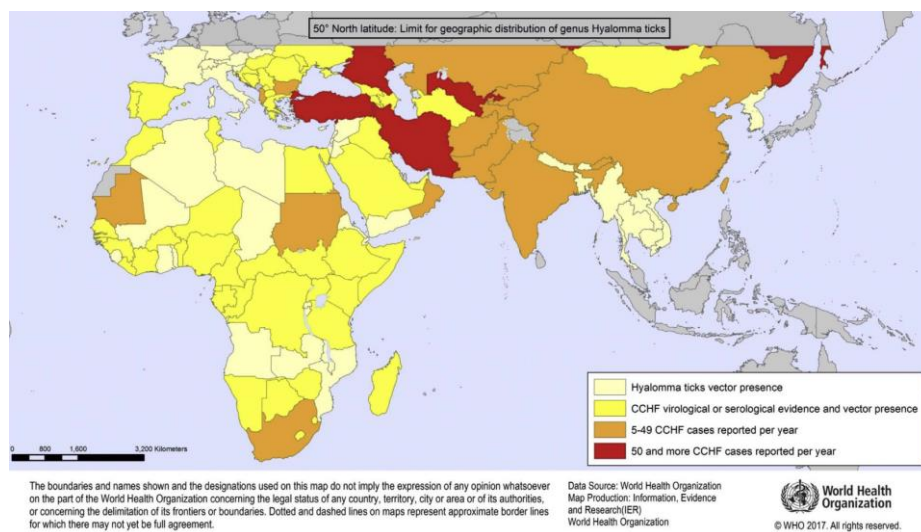


Figura 1: Distribuzione geografica della CCHF secondo i dati OMS del 2017. [7]

Negli ultimi 20 anni la frequenza delle infezioni provocate dal morso di zecca è aumentata in modo preoccupante a livello globale con conseguenze socio-economiche significative [5]. I cambiamenti climatici, ambientali ed economici offrono al CCHFV crescenti opportunità di diffondersi, così come i viaggi internazionali (nel 2014 in Francia e Inghilterra si sono verificati dei casi di importazione [1]). L'aumento delle temperature incentiva la migrazione delle

zecche verso Nord, ma aumenta anche la probabilità che sopravvivano all'inverno [4]. Si pensava che le Alpi, i Balcani e i Pirenei fungessero da barriera naturale alla diffusione del virus, ma indagini molecolari hanno rivelato che questi confini possono essere valicati dalla migrazione degli uccelli e dalla transumanza del bestiame [4]: nel 2006 una zecca di *Hyalomma marginatum* è stata trovata per la prima volta in Olanda [1]. Questo desta preoccupazione per il rischio di diffusione del virus.

2.2 Agente eziologico: struttura e ciclo replicativo

Il CCHFV è un virus appartenente all'ordine *Bunyavirales*, alla famiglia *Nairoviridae* e al genere *Orthonairovirus*. Si presenta sotto forma di una particella virale sferica del diametro di 90-100 nm circondata da un envelope, dal quale protrudono le glicoproteine Gn e Gc. All'interno del virione il genoma è incapsidato con la nucleoproteina (NP) e la proteina L per formare i complessi ribonucleoproteici (RNPs).

Il CCHFV possiede un genoma segmentato costituito da 3 filamenti di RNA a polarità negativa chiamati *small* (S – 1,6 kb), *medium* (M – 5,4 kb) e *large* (L – 12,1 kb) [8]. Il primo codifica la NP, il secondo il precursore unico delle glicoproteine (GPC) e il terzo la proteina L, la quale possiede un dominio di RNA-polimerasi RNA-dipendente (RdRp), uno di endonucleasi e l'*Ovarian Tumor Protease* (OTU – caratteristico dei Nairovirus rispetto agli altri Bunyavirus) [8]. Alle due estremità di tutti i segmenti sono presenti delle sequenze complementari non codificanti (NCRs) che ne permettono la circolarizzazione, fungono da promotori per la trascrizione e la replicazione virale e servono all'incapsidazione dei genomi nei virioni nascenti [8].

Tra gli Arbovirus (i virus che possono essere trasmessi ai vertebrati dagli artropodi ematofagi) il CCHFV presenta il maggior grado di differenziamento evolutivo: i segmenti S, M e L divergono rispettivamente del 20, 22 e 31% e ciò ha permesso ai virologi di ricostruire l'albero filogenetico del virus, identificandone i lineaggi da I a VI [1]. È stato dimostrato che i segmenti S, M e L appartenenti a lineaggi diversi possono riassortire in molte combinazioni [7].

Il CCHFV viene internalizzato dalla cellula bersaglio per endocitosi mediata da clatrina probabilmente a seguito del riconoscimento mediato dal controrecettore Gc [8]. Si ritiene che la fusione dell'envelope avvenga nei *multivescicular bodies* (MVB), determinando il rilascio dei RNPs nel citosol [8]. Questi ultimi vengono sfruttati dalla RdRp per la trascrizione e la replicazione virale: nella prima, grazie a un meccanismo di *cap-snatching*, vengono prodotti gli mRNA a polarità positiva per la sintesi delle proteine virali; nella seconda vengono prodotti i RNPs antigenomici da usare per la sintesi di nuovi RNPs genomici [8]. In seguito a questi fenomeni e alla complessa maturazione delle proteine virali avviene l'assemblaggio dei virioni, che vengono rilasciati per esocitosi [8]. Il *budding* non sembra essere citopatico per la cellula e permette alle particelle virali di acquisire l'envelope [8].

2.3 Il ruolo delle zecche come vettori e *reservoir* del virus

Le zecche sono degli artropodi ectoparassiti ematofagi appartenenti all'ordine *Ixodida* della classe *Arachnida* e sono suddivise in due famiglie: zecche molli (*Argasidae*) e dure (*Ixodidae*). Le zecche sono seconde solamente agli insetti nella trasmissione di infezioni all'uomo e sono i più importanti vettori di patologie che colpiscono il bestiame [5]. Anche se il CCHFV è stato rilevato in 31 specie di zecca [4] (che presumibilmente possono essere infettate transitoriamente senza dar luogo a una catena di infezioni), solamente alcune sono state identificate come vettori e allo stesso tempo *reservoir* naturale del virus: in particolare è stato osservato che le specie afferenti al genere *Hyalomma* sono distribuite geograficamente in modo sovrapponibile alla presenza del CCHFV [2]. Infatti, si è constatato anche che la comparsa di *outbreaks* di CCHF è spesso associata a un incremento della popolazione di queste zecche dure (soprattutto, nel Mediterraneo e in Medio Oriente, della specie *Hyalomma marginatum*), in parte a causa del loro atteggiamento aggressivo e di caccia anche nei confronti dell'uomo [2].

Le zecche dure vanno incontro a tre stadi vitali (larva, ninfa e adulto), durante i quali possono essere infettate. Le specie che fungono anche da *reservoir* naturale del virus rimangono infettate per il resto della loro vita senza che ciò ne comprometta la sopravvivenza. Le zecche consumano un pasto ematico poche volte nella loro vita: per evolvere da uno stadio vitale al successivo (all'inizio su piccoli mammiferi e uccelli e poi su grossi erbivori e carnivori) e per deporre le uova. Questi eventi rappresentano quindi le uniche occasioni per il virus di infettare i vertebrati: perciò è necessario che esso sopravviva (non si sa in che organi della zecca), si diffonda tra i tessuti dell'artropode, si replichi nelle ghiandole salivari e da lì col morso venga trasmesso all'animale [2]. Si suppone che il virus abbia il tempo necessario per farlo perché le zecche dure si alimentano sui loro ospiti per periodi di tempo lunghi.

Le zecche possono contagiarsi tra loro soprattutto attraverso la co-alimentazione, cioè cibandosi su un animale infetto in fase viremica o non, purché i siti del morso di una zecca infetta e di una non infetta siano molto vicini (in questo caso il contagio è probabilmente mediato dall'infezione delle cellule dendritiche [2]). Meno importanti sembrano essere la trasmissione venerea e quella trans-ovarica, anche se quest'ultima sembra essere indispensabile per la sopravvivenza del CCHFV nell'ecosistema [5].

2.4 Il modello sperimentale costituito dalle cellule di zecca

Il CCHFV instaura un'infezione persistente apparentemente non citopatica nelle zecche e l'analisi dei meccanismi di adattamento al vettore costituisce un nodo cruciale per la comprensione della sua biologia e per l'implementazione di nuove tecniche di monitoraggio e contenimento della sua diffusione.

L'allevamento di zecche vive in laboratorio comporta una serie di problematiche, per cui negli ultimi 70 anni sono stati sviluppati dei modelli *in vitro* più facili da gestire: tra questi sistemi, le linee cellulari immortalizzate sono le più vantaggiose e utilizzate. Le prime linee cellulari sono state allestite nel 1975 da una zecca adulta di *Rhipicephalus*, ma molto presto si è cominciato a produrne altre a partire dagli embrioni delle zecche delle specie rilevanti dal punto di vista medico-veterinario [5]. La variabilità fenotipica delle cellule embrionali (che possono essere più o meno differenziate) e il fatto che la loro stabilizzazione sia lasciata procedere spontaneamente in coltura implicano che queste linee cellulari siano molto eterogenee [5]. Inoltre, alcune analisi hanno riscontrato che il loro genoma può avere subito delle alterazioni cromosomiche e/o integrazioni di sequenze virali (durante infezioni precedenti), ma non è noto se e in che misura ciò influenzi l'attendibilità dei risultati ottenuti dagli esperimenti condotti con queste cellule [5]. In *Figura 2* sono riportate le immagini di microscopia in contrasto di fase di quattro linee cellulari di zecca, che sono esemplificative di quanto il loro fenotipo possa variare a seconda della linea considerata.

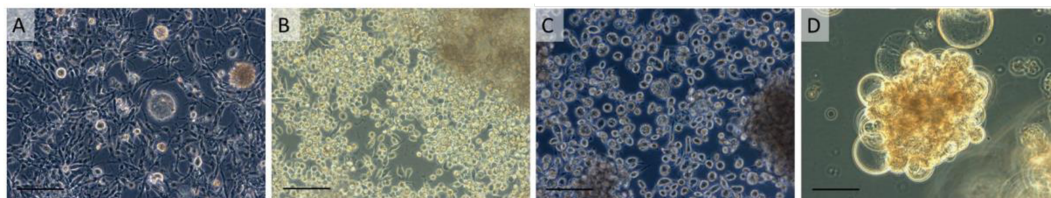


Figura 2: Morfologia di diverse linee cellulari di zecca: (A) RAE/CTVM1; (B) BME/CTVM6; (C) AVL/CTVM17; (D) OME/CTVM21. Scale bars = 100 μ m. [5]

Gli Arbovirus generalmente infettano persistentemente le linee cellulari di zecca senza creare inclusioni e/o effetti citopatici evidenti [5]. È stato dimostrato che il CCHFV si replica a lungo e con titoli elevati nelle linee cellulari derivate dalle zecche che ne costituiscono il vettore naturale, suggerendo l'esistenza di una specificità di interazione virus-vettore [5].

Ad oggi vi sono pochi studi condotti *in vitro* con le cellule di zecca ed è necessario incrementarli per elucidare una serie di aspetti importanti della biologia virale: la replicazione, la morfogenesi, la maturazione delle proteine virali (in particolare la glicosilazione) e le interazioni con diversi fattori cellulari per garantire il successo di infezione, replicazione e trasmissione [5]. Queste conoscenze potranno permetterci di capire quanto il CCHFV dipenda strettamente dall'interazione col vettore e permetterà di comprendere le dinamiche di trasmissione del virus [5].

2.5 Il virus Hazara per studiare le interazioni virus-vettore

Il virus Hazara (HAZV) è stato isolato per la prima volta nel 1964 da alcune zecche adulte della specie *Ixodes redikorzevi* raccolte nel Distretto di Hazara, in Pakistan. HAZV è evolutivamente correlato al CCHFV, infatti i due virus presentano delle somiglianze filogenetiche e strutturali [3]. L'identità nucleotidica dei loro genomi è sorprendente (il segmento S dei due virus presenta un'identità amminoacidica del

60%) e anche se sono stati attribuiti a specie diverse appartengono allo stesso sierogruppo [3]. Inoltre, alcuni studi che hanno indagato le somiglianze antigeniche della NP dei due virus hanno dimostrato che le risposte umorali anti-NP di CCHFV e di HAZV (nel siero di uomo, coniglio e topo) sono simili e che esiste una cross-reattività tra i rispettivi antigeni [3].

Il CCHFV è un patogeno molto pericoloso per l'uomo, pertanto può essere studiato solamente in laboratori di biosicurezza di livello 4 (BSL-4). Al contrario, non esistono evidenze del fatto che HAZV sia patogeno per l'uomo e per questo motivo può essere manipolato in laboratori di BSL-2, in qualità di surrogato non patogeno del CCHFV. Dal momento che si tratta di virus molto simili è stato ipotizzato che la patogenesi dell'uno e la non patogenesi dell'altro dipendano da diverse interazioni delle proteine virali con le proteine cellulari che innescano diversi *pathway* di segnalazione [7].

È stato appurato che CCHFV e HAZV possono infettare in maniera persistente le linee cellulari di zecca suggerendo così che HAZV possa costituire un buon modello per lo studio delle interazioni virus-vettore [6].

È stato anche appurato che nelle cellule di zecca infettate da CCHFV o da HAZV sono rilevabili delle corte sequenze di DNA chiamate *viral-derived DNA* (vDNA), che sono prodotte a partire dall'RNA virale ad opera di una retrotrascrittasi endogena delle zecche [6]. Questi "frammenti" vengono sintetizzati continuamente durante la replicazione del virus, sono transitori e la loro comparsa coincide con una riduzione della replicazione virale e con il mantenimento della vitalità cellulare: per questo motivo si ritiene che rappresentino un elemento della risposta cellulare all'infezione e che garantiscano la persistenza dell'infezione nel vettore [6].

HAZV rappresenta quindi un buon modello per chiarire i meccanismi cellulari della risposta all'infezione e, in combinazione con altri approcci sperimentali, può offrire la possibilità di studiare il ruolo di specifici geni di zecca che possono essere coinvolti nell'infezione: per esempio, in alcuni studi con le cellule di zecca ISE6 è stato visto che è possibile silenziare specificatamente dei geni con siRNAs e dsRNAs consentendo di studiarne l'effetto sulla replicazione virale [5]. Con questo modello si può così approfondire il ruolo dei singoli geni dell'artropode nel ciclo replicativo del virus.

3 Approccio sperimentale

3.1 Linee cellulari

3.1.1 HAE/CTVM8

Linea cellulare derivata da una popolazione mista di cellule embrionali di zecca della specie *Hyalomma anatolicum* che si sono stabilizzate spontaneamente in coltura. Le cellule di zecca sono delicate, ma l'eterogeneità tissutale e fenotipica della linea ne consente la sopravvivenza *in vitro*. Le cellule di zecca HAE/CTVM8 crescono in adesione e presentano una morfologia rotondeggiante con un nucleo tondo e ben distinguibile all'interno. Sono coltivate in L-15 medium + H-LAC (1:1), un terreno che contiene gli antibiotici penicillina e streptomina, in appositi contenitori mantenuti chiusi. Le cellule sono coltivate in incubatore a 28° C.

In laboratorio vengono coltivate anche alcune linee cellulari HAE/CTVM8 infettate persistentemente da HAZV da oltre 3 anni. Queste cellule manifestano una cinetica di crescita accelerata rispetto a quelle non infettate: infatti vanno a confluenza in 2-3 giorni anziché in 7-10. Per questo motivo si ritiene che il virus inneschi dei meccanismi cellulari che promuovono la replicazione.

3.1.2 Vero – CCL81

Linea cellulare derivata dal rene di *Chlorocebus aethiops* africano adulto (un primate non umano, il cercopiteco grigioverde). Queste cellule crescono in adesione, hanno una morfologia allungata e sono ricche di organelli e vescicole intracellulari. Vengono coltivate in DMEM con il 10% di siero fetale bovino (FBS), un terreno privo di antibiotici. Contrariamente alle cellule di zecca, quelle di mammifero necessitano di una certa tensione di O₂ e di CO₂ per sopravvivere; infatti questi parametri (oltre a umidità e temperatura) sono strettamente controllati nell'incubatore.

3.2 Tecniche di biologia cellulare

3.2.1 Conta delle cellule

Preparare una soluzione contenente Trypan blue e cellule, per esempio unendo 180 µl di Trypan blue e 20 µl di sospensione cellulare (in questo esempio si tratta di una diluizione 1:10 delle cellule). Disporre la soluzione nell'apposito alloggiamento della camera di Burker. La camera di Burker (o emocitometro) è un vetrino con incisa una griglia suddivisa in 9 quadranti circondati da triple linee. Ogni quadrante ha

lato 1 mm e altezza 0,1 mm, quindi ha volume $0,1 \text{ mm}^3$. Al microscopio ottico, contare il numero di cellule presenti in ogni quadrante e calcolarne la media. Per determinare quante cellule ci sono in $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ di sospensione iniziale occorre moltiplicare la media per 10^4 (fattore intrinseco alla camera di Burker, che dipende dalla sua geometria) e per il fattore di diluizione della soluzione di partenza (in questo esempio 10^1).

3.2.2 Semina delle cellule di zecca

Rimuovere il terreno condizionato senza toccare le cellule. Effettuare un lavaggio delicato in tampone fosfato salino (PBS), una soluzione isotonica e isoosmotica che non introduce sbilanciamenti di pressione osmotica deleteri per le cellule. Per “lavaggio” si intende “aggiungere e rimuovere” e serve a eliminare i detriti cellulari (per esempio metaboliti, prodotti di scarto e molecole solubili secrete) e i residui di terreno. Aggiungere terreno fresco. Staccare le cellule e portarle in soluzione con l’ausilio di uno *scraper* (se sono cresciute in una fiasca) o una pipetta Pasteur (se sono cresciute in un tubo). In questo caso per staccarle non si può usare la tripsina come descritto nella sezione 3.2.5 *Semina delle cellule di mammifero* perché essa è citotossica per le delicate cellule di zecca. Contare le cellule nella camera di Burker (vedi sezione 3.2.1 *Conta delle cellule*). Tenendo conto di un eccesso del numero di cellule da seminare e conoscendo il volume finale, calcolare il volume di cellule da risospendere in terreno fresco.

3.2.3 Infezione delle cellule di zecca

Dopo 48 h dalla semina di 2×10^6 cellule di zecca in appositi tubi a fondo piatto (vedi sezione 3.2.2 *Semina delle cellule di zecca*) è possibile infettarle con HAZV alla molteplicità di infezione (MOI – il rapporto tra il numero di virioni e il numero di cellule) voluta. Raccogliere il surnatante dai tubi da infettare e metterlo da parte in una falcon. Fare un lavaggio delicato in PBS. Aggiungere in ogni tubo un volume di infezione pari a 1 ml, in cui sono presenti medium e virus (prelevato dallo stock conservato a -80° C) in una concentrazione tale da garantire la MOI voluta. Incubare per 1 h a 32° C , raccogliere e scartare il surnatante con il virus residuo. Fare un lavaggio delicato in PBS. Aggiungere 2 ml di medium condizionato per tubo preparandolo con quello precedentemente recuperato nella falcon mescolato con terreno fresco.

3.2.4 Immunofluorescenza su cellule di zecca

Staccare le cellule di zecca dal dispositivo dove sono state coltivate e contarle nella camera di Burker (vedi sezione 3.2.1 *Conta delle cellule*). Per allestire 1 vetrino per immunofluorescenza servono 1×10^6 cellule. Prelevare il volume di sospensione cellulare necessario per allestire il numero di vetrini desiderato sulla base del numero di cellule contate. Centrifugarlo per 5 min a 850-900 rotazioni per minuto

(rpm), non troppe affinché le cellule restino intatte. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di PBS. Centrifugare per 5 min a 850-900 rpm. Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet cellulare in 1 ml di PBS.

Sgrassare per almeno 30 min i vetrini per immunofluorescenza prima di depositarvi il campione. Disporre 200 µl di sospensione cellulare in ogni imbuto (uno per vetrino) collegato alla centrifuga Cytospin. Bilanciare la centrifuga e azionarla per 3 min a 1000 rpm. La velocità di rotazione fa sì che il campione si depositi in un punto preciso del vetrino. Immergere i vetrini in una soluzione composta da etanolo al 70% per 30 min a 4° C per fissare le cellule. Lavare i vetrini in PBS. Se non si procede subito con l'immunofluorescenza, immergerli in PBS e conservarli a 4° C.

Per procedere con l'immunofluorescenza, incubare il campione sul vetrino con 40 µl di una soluzione di PBS con il 2,5% di albumina sierica bovina (BSA) per 1 h a temperatura ambiente (T amb). La BSA blocca i siti aspecifici riconosciuti dagli anticorpi (Ab) primari, poiché questi ultimi sono rappresentati da un siero policlonale potrebbero avere maggiori problemi di *background* rispetto a un anticorpo monoclonale purificato. La soluzione di incubazione, come le successive, non va caricata direttamente sopra al campione, ma di lato, in modo che appoggiando sopra al vetrino per immunofluorescenza un vetrino coprioggetto la soluzione di incubazione si espanda coprendo anche il campione. Asciugare il vetrino tamponandone i lati, senza toccare le cellule.

Aggiungere 40 µl della soluzione di Ab I, il quale è diretto contro la NP di HAZV ed è ottenuto in *rabbit*. Incubare per 1,30 h a 37° C.

- Soluzione di Ab I: Ab I 1:200 diluito in PBS 1X + 2,5% BSA + 0,1% TWEEN. Quest'ultimo è un detergente che permeabilizza la membrana plasmatica (MP) permettendo l'ingresso dell'Ab.

Rimuovere la soluzione di Ab I. Effettuare 2 lavaggi in PBS e asciugare il vetrino tamponandolo.

Aggiungere 40 µl della soluzione di Ab II, il quale è una IgG coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC) anti-*rabbit* prodotta in *goat*. Il FITC è un composto organico fluorescente derivato della fluoresceina che ha un picco di assorbimento a 495 nm e un picco di emissione in fluorescenza a 521 nm (verde). Incubare la soluzione per 1,30 h a 37° C al buio poiché l'Ab II è fotosensibile.

- Soluzione di Ab II: Ab II 1:800 diluito in PBS 1X + 2,5% BSA + 0,1% TWEEN.

Rimuovere la soluzione di Ab II. Effettuare 2 lavaggi in PBS e asciugare il vetrino tamponandolo.

Aggiungere 40 µl di colorante per i nuclei (DRAQ5 – di colore blu) diluito 1:1000 in PBS. Lasciare agire per 20 min al buio a T amb. Lavare in PBS.

Aggiungere una goccia di FluorSave™ che preserva la fluorescenza nel tempo e mantiene il vetrino coprioggetto adeso alle cellule.

Osservare i vetrini al microscopio confocale: quest'ultimo è molto sofisticato e permette di visualizzare meglio la localizzazione della NP dentro le cellule.

3.2.5 Semina delle cellule di mammifero

Rimuovere il terreno condizionato senza toccare le cellule. Fare un lavaggio in PBS. Aggiungere 3 ml di tripsina-EDTA, la quale degrada le proteine di superficie che uniscono le cellule tra loro e al substrato, staccandole. Attendere alcuni minuti affinché agisca; controllare al microscopio ottico il decorso della reazione. La tripsina è sensibile al siero, pertanto per neutralizzarla è sufficiente aggiungere almeno un egual volume di terreno di coltura fresco che contiene il 10% di FBS. Contare le cellule nella camera di Burker (vedi sezione 3.2.1 *Conta delle cellule*). Seminare 2×10^6 cellule per pozzetto in una piastra *multi-well* da 96 pozzetti.

3.2.6 Infezione delle cellule di mammifero

A 3, 4, 7 e 10 *days post infection* (d.p.i.) prelevare il surnatante dai tubi delle cellule di zecca, dove dovrebbe essere presente la progenie di HAZV generata a seguito dell'infezione produttiva delle cellule di zecca. Centrifugarlo per 5 min a 850-900 rpm per far precipitare le cellule rimaste in sospensione ed eventuali residui affinché vi rimanga solo il virus.

In una piastra da 24 pozzetti allestire 6 diluizioni seriali di surnatante, ciascuna 1:10 della precedente. Le diluizioni vanno preparate in DMEM con FBS al 2%, perché il siero inibisce la replicazione virale ma è necessario per la sopravvivenza delle cellule di mammifero. Per produrre (per esempio) $V_f=10$ ml di DMEM con FBS a $C_f=2\%$ partendo da DMEM con FBS a $C_i=10\%$ ne servono $V_i=C_f \cdot V_f / C_i=2$ ml, da diluire in altri 8 ml di DMEM senza siero. Alla fine delle diluizioni ogni pozzetto contiene 270 μ l di terreno + 30 μ l di surnatante (dalla soluzione madre per produrre la prima diluizione, o dalla diluizione precedente) – 30 μ l (utilizzati per produrre la diluizione successiva, o che vengono scartati dall'ultima diluizione per avere un egual volume in tutti i pozzetti).

24 h dopo la semina delle cellule Vero (vedi sezione 3.2.5 *Semina delle cellule di mammifero*) rimuovere il DMEM con FBS al 10% ed effettuare 2 lavaggi in PBS. Trasferire 100 μ l di diluizione del virus dalla piastra da 24 *wells* al pozzetto della corrispondente diluizione nella piastra da 96 *wells*. Ogni diluizione va fatta in doppio, cioè replicata 2 volte nella piastra da 96 pozzetti. Incubare la piastra per 1 h per far avvenire l'infezione. Rimuovere il surnatante con il virus e fare un lavaggio in PBS. Aggiungere 100 μ l di nuovo terreno DMEM con FBS al 2% e incubare per 24 h.

3.2.7 Titolazione virale

Rimuovere il DMEM con FBS al 2% e lavare i pozzetti in PBS. Fissare le cellule aggiungendo a ogni pozzetto 60 µl di acetone + metanolo (1:1) sotto cappa. Lasciare agire per 45 min a -30° C. Rimuovere la soluzione di acetone + metanolo. Fare un lavaggio in PBS. Aggiungere 100 µl di PBS in ogni pozzetto e conservare la piastra a 4° C (per non lasciare a secco le cellule) se non si intende procedere subito con l'immunofluorescenza.

Il protocollo di immunofluorescenza è simile a quello descritto nella sezione 3.2.4 *Immunofluorescenza su cellule di zecca*, almeno nei primi passaggi:

- aggiungere 60 µl /pozzetto di PBS + 2,5% BSA per 1 h a T amb;
- aggiungere 60 µl /pozzetto della soluzione di Ab I per 1,30 h a 37° C;
- lavare in PBS 2 volte;
- aggiungere 60 µl /pozzetto della soluzione di Ab II per 1,30 h a 37° C al buio;
- lavare in PBS 2 volte;
- aggiungere 100 µl /pozzetto di PBS per non lasciare le cellule a secco.

Nella soluzione di Ab II viene aggiunto anche il DAPI diluito 1:1000. Quest'ultimo è un colorante per i nuclei che permette di distinguere se la fluorescenza osservata è associata alle cellule o è aspecifica. Infatti, siccome la NP del virus si localizza nel reticolo endoplasmatico (RE), quest'ultimo viene marcato dal FITC. Quindi, grazie alla sovrapposizione delle immagini si capisce se il segnale di fluorescenza che si osserva è una cellula infettata da un virione (cioè un focus di replicazione) o una marcatura aspecifica.

Osservare la piastra al microscopio a fluorescenza. Con la luce normale si osserva il campo tappezzato di cellule: infatti ne sono state seminate 2×10^6 /pozzetto e si sono anche replicate. Il microscopio manda un fascio di luce alla lunghezza d'onda desiderata; in questo caso vengono raccolte le immagini corrispondenti a quella che eccita il fluoroforo coniugato all'Ab II e quella per il DAPI. Per contare il numero di foci di replicazione del virus si scelgono le diluizioni in cui essi sono presenti in un numero ragionevole per essere contati (né troppi, né troppo pochi). I pozzetti in doppio servono per avere un confronto e un controllo interno, poiché ci si aspetta che il numero di foci sia simile.

3.3 Tecniche di biologia molecolare

3.3.1 PCR delle vDNA

A 3, 4, 7 e 10 d.p.i. staccare le cellule di zecca dai tubi dove sono state infettate e coltivate e contarle nella camera di Burker (vedi sezione 3.2.1 *Conta delle cellule*). Raccogliere 5×10^5 cellule da cui estrarre il DNA totale. In questa sperimentazione è stato utilizzato il kit *All-In-One DNA/RNA/Protein Miniprep Kit (Cell, Tissue, Plant)* di Bio Basic.

Allestire 9 reazioni a catena della polimerasi (o PCR) in parallelo sul DNA estratto con 9 coppie di primer disegnate per amplificare altrettante porzioni del segmento S del genoma di HAZV, che nelle cellule in cui il virus instaura un'infezione latente vengono retrotrascritte per formare le vDNA.

3.3.2 Preparazione del gel di agarosio al 2%

Pesare 2 g di polvere di agarosio. Scioglierli in 100 ml di *running buffer* (il TBE). Scaldare il gel nel forno a microonde per facilitarne la dissoluzione senza far evaporare il TBE, perché ciò potrebbe alterare la % del gel. Aggiungere 1,8 μ l di intercalante Nancy (di colore rosso). Versare il gel ancora liquido in una vaschetta di supporto, che presenta anche un apposito alloggiamento dove immergere il pettine per formare i pozzetti di caricamento. Lasciare solidificare il gel sotto cappa per 20 min a T amb. Collocare il gel nella vaschetta dell'elettroforesi immerso in TBE in modo che anche i pozzetti siano coperti. Rimuovere il pettine.

3.3.3 Preparazione dei campioni e gel elettroforesi

I campioni da caricare nel gel sono:

- un campione per ogni amplificato di PCR (quindi in totale 9): 15 μ l di amplificato + 3 μ l di *loading buffer* (LB), che è blu e quindi permette di visualizzare il campione e lo appesantisce grazie alla presenza di glicerolo affinché si depositi meglio nel pozzetto del gel;
- bianco o controllo negativo: prodotto di amplificazione di una PCR condotta utilizzando la mix di reazione, una coppia di primer (*forward* e *reverse*) per un gene *housekeeping* della specie di zecca *Hyalomma anatolicum* e sostituendo al volume di DNA stampo un corrispondente volume di H₂O Milli-Q;
- controllo positivo: amplificato del gene *housekeeping* della zecca (cioè il prodotto di una PCR allestita come al punto precedente, ma aggiungendo il DNA stampo estratto dalle cellule di zecca);
- marker di pesi molecolari: 14 μ l di H₂O Milli-Q + 3 μ l di LB + 1 μ l di marker.

Centrifugare i campioni per 20 sec a velocità massima. Caricarli nei pozzetti del gel. Collegare gli elettrodi e far partire la corsa elettroforetica accendendo il voltaggio. Quando i campioni arrivano a fine corsa (dopo circa 1 h) spegnere il voltaggio.

Gli amplificati sono migrati in funzione del loro peso molecolare attraverso la maglia del gel di agarosio e il confronto con il marker di pesi molecolari noti permette di stabilirne le dimensioni. Le *lanes* vengono visualizzate sotto a una lampada UV grazie alla presenza dell'intercalante.

4 Risultati

4.1 Curva di crescita delle cellule HAE/CTVM8

4.1.1 Cellule infettate a MOI 0,1

Come anticipato nella sezione 3.1.1 HAE/CTVM8, è stato osservato che le cellule HAE/CTVM8 infettate persistentemente da HAZV da oltre 3 anni si replicano più velocemente rispetto a quelle non infettate. Questa evidenza permette di avanzare l'ipotesi che l'infezione stimoli *pathways* cellulari responsabili del controllo della replicazione cellulare.

Per verificare l'ipotesi è stato allestito un esperimento per valutare la cinetica di crescita delle cellule infettate a fresco. Una coltura HAE/CTVM8 è stata infettata come da protocollo (illustrato alla sezione 3.2.3 Infezione delle cellule di zecca) a MOI 0,1 e poi le cellule sono state contate (vedi sezione 3.2.1 Conta delle cellule) a 3, 4, 7 e 10 d.p.i. Come controllo è stata utilizzata una coltura (chiamata MOCK) sottoposta alle medesime condizioni sperimentali, eccetto per l'aggiunta del virus. In Figura 3 sono riportate le curve di crescita delle cellule di controllo MOCK e di quelle infettate a MOI 0,1 con i rispettivi valori numerici di conta.

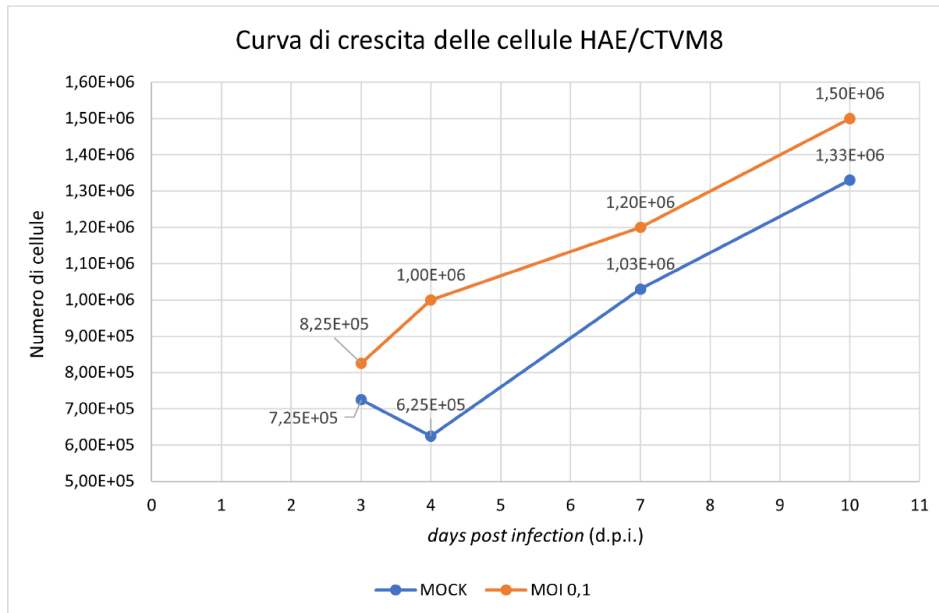


Figura 3: Curve di crescita delle cellule MOCK (blu) e di quelle infettate a MOI 0,1 (arancione).

Le due curve sono quasi parallele e il numero di cellule contate non differisce in maniera significativa, ma hanno quasi sempre lo stesso ordine di grandezza. Quindi, lo scarto numerico potrebbe essere imputato alle condizioni sperimentali di questo singolo esperimento e non a un effetto dovuto all'infezione da HAZV. Questa considerazione è comprovata dal fatto che le due curve presentano lo stesso andamento, cioè anche col progredire dell'infezione e con l'aumento della

proporzione di cellule infettate non vengono innescati dei meccanismi che promuovano la replicazione cellulare nel campione di cellule infettate, per lo meno nel periodo preso in considerazione. Un'altra possibilità è che l'infezione non sia avvenuta o sia stata poco efficiente.

4.1.2 Cellule infettate a MOI 0,1 e 1

Per verificare se la MOI fosse troppo bassa inficiando l'efficienza dell'infezione, l'esperimento è stato ripetuto includendo anche la MOI 1. A 3, 5, 7 e 9 d.p.i. le cellule sono state contate e i dati sono stati utilizzati per costruire le curve di crescita illustrate in *Figura 4*.

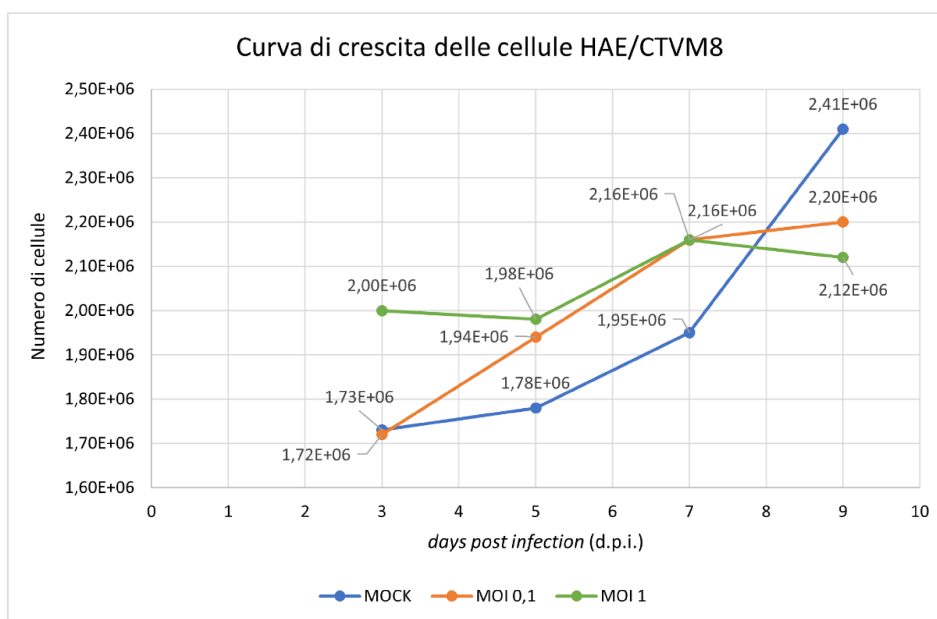


Figura 4: Curve di crescita delle cellule MOCK (blu), di quelle infettate a MOI 0,1 (arancione) e di quelle infettate a MOI 1 (verde).

Dal grafico si evince che l'infezione delle cellule di zecca a MOI superiore non ha ripercussioni sulla crescita delle stesse: infatti la curva verde non si allontana in maniera significativa dalle altre, nonostante a 3 d.p.i. avesse il numero maggiore di cellule. Anzi, a 9 d.p.i. le cellule MOCK sono più numerose delle altre, mentre quelle infettate a MOI 1 sono le meno numerose. Infatti la curva blu cresce molto più rapidamente, mentre quella verde ha andamento quasi orizzontale ed è simile a quella arancione. Nel complesso, comunque, le differenze tra i numeri di cellule contate non sono significativi e non sono giustificabili con l'infezione da HAZV.

Alla luce di questi risultati le due spiegazioni che si sono ipotizzate sono:

- il virus non ha avuto il tempo sufficiente per innescare la replicazione cellulare,
- l'infezione non è avvenuta perché le cellule non si infettano bene.

4.2 Sensibilità e permissività delle cellule all'infezione

Per verificare se le cellule sono sensibili e permissive all'infezione da HAZV sono stati allestiti due esperimenti allo scopo di valutare alcuni parametri che permettono di asserire se l'infezione è avvenuta in maniera produttiva o meno.

4.2.1 Immunofluorescenza su cellule di zecca

Una prima prova è fornita dalla presenza della NP di HAZV nelle cellule di zecca. In questo modo in prima istanza si verifica che le cellule di zecca sono infettate, ma si dovrebbe osservare anche che man mano che l'infezione decorre il virus diffonde alle cellule vicine e aumenta il numero di cellule positive.

Sono stati seminati alcuni tubi di cellule HAE/CTVM8 (vedi sezione 3.2.2 *Semina delle cellule di zecca*), di cui una parte ha funto da controllo (MOCK) e un'altra è stata infettata con HAZV a MOI 0,1 (vedi sezione 3.2.3 *Infezione delle cellule di zecca*). Dopodiché è stata fatta l'immunofluorescenza sulle cellule di zecca come descritto nella sezione 3.2.4 *Immunofluorescenza su cellule di zecca*. In questa sede è stata valutata anche l'espressione della calnexina (grazie a degli Ab specifici), una proteina integrale del RE la cui sintesi aumenta in condizioni di stress cellulare. Le immagini raccolte al microscopio confocale sono riportate in *Figura 5*.

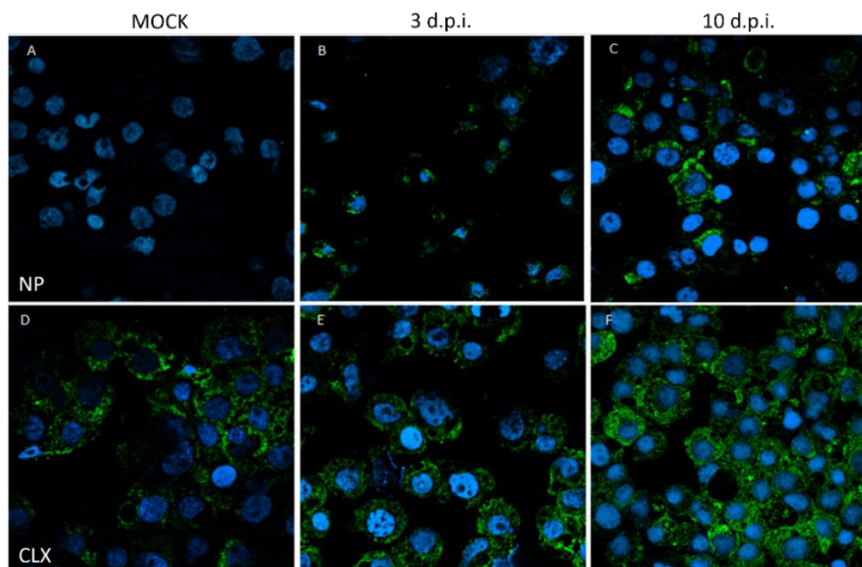


Figura 5: Immunofluorescenza delle cellule di zecca a 3 e 10 d.p.i. Nella riga in alto si vede il segnale restituito dal FITC coniugato all'Ab II che riconosce l'Ab I a sua volta legato alla NP di HAZV. Nella riga in basso si vede il segnale restituito da Ab diretti contro la calnexina. In blu si vede il DRAQ5.

L'avanzare dell'infezione è accompagnato sia dall'incremento del segnale restituito dal FITC (correlato alla presenza della NP di HAZV nelle cellule infettate) sia di quello restituito dagli Ab diretti contro la calnexina. La prima osservazione è la dimostrazione diretta della presenza del virus nelle cellule di zecca. Inoltre l'aumento del segnale da 3 a 10 d.p.i. suggerisce che l'infezione si propaga nel

tempo, conseguentemente alla diffusione del virus. Invece, l'aumento del segnale restituito dagli Ab diretti contro la calnexina è una conferma indiretta della presenza di HAZV nelle cellule di zecca poiché aumenta lo stress cellulare a livello del RE.

4.2.2 Titolazione virale

Per determinare il titolo virale si va a rilevare la NP di HAZV nelle cellule Vero – CCL81 infettate con diluizioni seriali del surnatante raccolto dalle cellule di zecca infettate. Infatti, se il virus infetta produttivamente le cellule di zecca produrrà la progenie virale che si accumulerà nel surnatante e potrà quindi infettare le cellule Vero.

A 3, 4, 7 e 10 d.p.i. è stato prelevato il surnatante dalle colture di cui alla sezione 4.2.1 *Immunofluorescenza su cellule di zecca* e lo si è utilizzato per infettare le cellule CCL81 (vedi sezione 3.2.6 *Infezione delle cellule di mammifero*). Il giorno successivo le cellule sono state fissate e si è proceduto con l'immunofluorescenza (vedi sezione 3.2.7 *Titolazione virale*). Contando il numero dei foci di replicazione presenti nei pozzetti della *multi-well*, tenendo conto dei fattori di diluizione e del volume di infezione utilizzato è possibile calcolare il titolo virale, cioè il numero di virioni infettivi presenti in 1 ml di surnatante raccolto dalle cellule di zecca infettate.

4.2.3 Cinetica di produzione della progenie virale

Riportando i titoli calcolati nei diversi campioni raccolti sull'asse delle ordinate si ottiene la curva della cinetica di produzione della progenie virale illustrata in *Figura 6*.

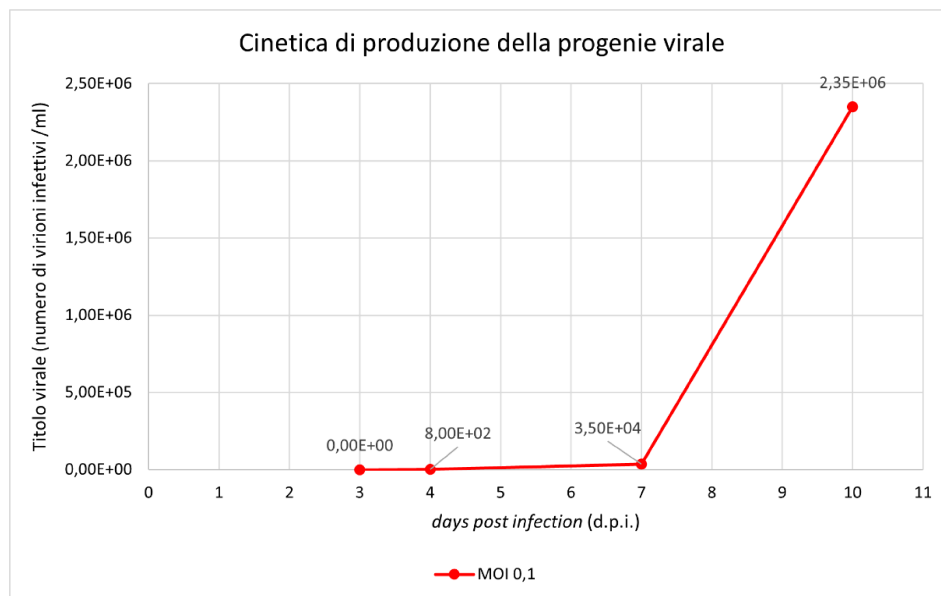


Figura 6: Cinetica di produzione della progenie virale calcolata contando il numero di foci di replicazione nelle cellule CCL81 ai diversi d.p.i.

Si può osservare che il titolo virale aumenta lentamente nelle prime fasi dell'infezione e poi rapidamente di almeno 2 ordini di grandezza negli ultimi due punti analizzati. La curva ha andamento esponenziale e se si riportassero i dati su scala logaritmica si otterrebbe una linea retta. Il fatto che il titolo virale aumenti fino a raggiungere un picco a 10 d.p.i. (quando è stata interrotta l'analisi) in primis conferma che il virus si replica nelle cellule di zecca e in secondo luogo fa capire che i meccanismi che permettono di instaurare un equilibrio di convivenza tra virus e vettore non sono ancora stati pienamente attuati. Infatti, si può supporre che prolungando l'analisi per tempi più lunghi a un certo punto si abbia una riduzione del titolo virale perché tutte le cellule risultano infettate e si siano attivati i meccanismi di controllo della replicazione virale per evitare che le cellule di zecca muoiano a causa gli effetti citotossici della replicazione massiva del virus.

4.2.4 Gel di agarosio delle vDNA

È noto che nel corso dell'infezione di alcuni virus, compresi CCHFV e HAZV, vengono prodotti dei frammenti di DNA virale chiamati vDNA. Quindi, accertare la loro presenza è una chiara dimostrazione del fatto che l'infezione sia avvenuta e che il virus abbia cominciato a replicarsi all'interno delle cellule.

Una parte delle cellule HAE/CTVM8 che sono state raccolte per fare l'immunofluorescenza sono state utilizzate per l'estrazione del DNA totale per la ricerca delle vDNA mediante PCR, come descritte nella sezione 3.3 *Tecniche di biologia molecolare*. In *Figura 7* sono rappresentati i gel di agarosio al 2% utilizzati per la visualizzazione degli amplificati indicanti la presenza di vDNA.

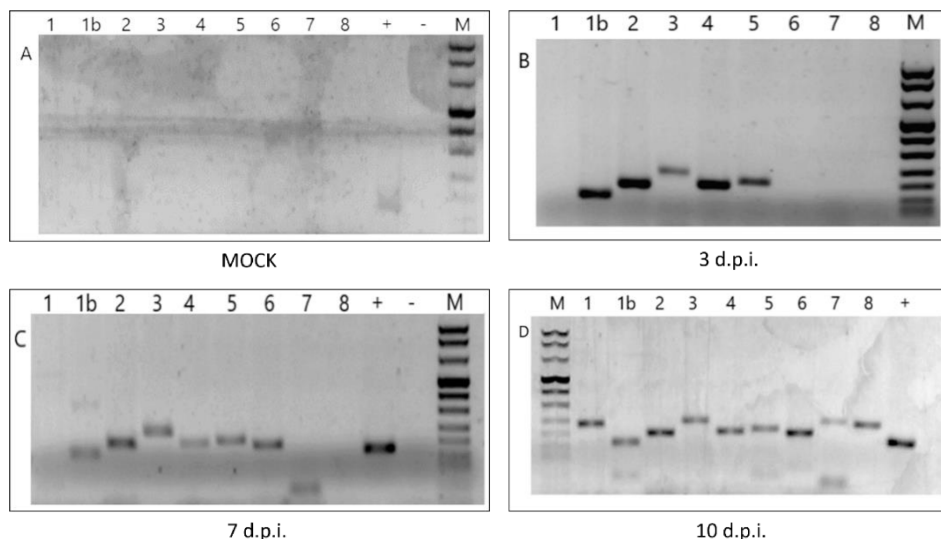


Figura 7: Gel di agarosio dove sono stati fatti correre i prodotti di amplificazione di 9 coppie di primer che coprono il segmento S del genoma di HAZV.

Il numero di *lanes* che restituiscono un segnale positivo aumenta col passare dei giorni fino a quando tutte le vDNA sono rilevabili, a 10 d.p.i. Ciò conferma ancora una volta che l'infezione è avvenuta con successo. Inoltre, questa osservazione è

coerente col fatto che nel tempo il virus instauri dei meccanismi di convivenza con le cellule di zecca in modo da garantire la sua persistenza nell'ecosistema e la possibilità di diffondersi ad altri organismi. Infatti la presenza delle vDNA è stata correlata inversamente alla replicazione virale e direttamente alla sopravvivenza cellulare.

5 Discussione

Il CCHFV è un virus altamente patogeno per l'uomo che può essere manipolato esclusivamente in BSL-4. È responsabile della CCHF, una febbre emorragica che è stata riscontrata solo nell'uomo ed è caratterizzata da una letalità variabile dal 5% all'80%. Il vettore e *reservoir* naturale del virus sono le zecche, soprattutto quelle afferenti al genere *Hyalomma* che sono diffuse in molte nazioni di Africa, Asia ed Europa. Tuttavia, si ritiene che nel prossimo futuro la diffusione del vettore e del virus possa aumentare a causa dei cambiamenti climatici e delle attività umane; ecco perché la ricerca necessita di maggiori sforzi e incentivi per aumentare le conoscenze e promuovere lo sviluppo di metodi di prevenzione e trattamento. Infatti, l'OMS ha incluso il CCHFV nella lista dei virus prioritari per cui sviluppare farmaci e vaccini, in quanto la sua propagazione potrebbe scatenare una situazione di emergenza sanitaria, economica e non solo senza precedenti.

HAZV è evolutivamente correlato e morfologicamente simile al CCHFV, ma non esistono prove del fatto che sia patogeno per l'uomo. Quindi, essendo manipolabile in BSL-2, viene utilizzato come surrogato non patogeno del CCHFV. In particolare alcuni gruppi di ricerca si stanno dedicando allo studio dell'interazione virus-vettore allo scopo di traslare, con le dovute cautele, i risultati ottenuti al CCHFV. A questo proposito nel corso degli anni le cellule di zecca si sono affermate in maniera preponderante come modello di studio perché si sono rivelate molto utili, anche se sono piuttosto delicate. La comprensione dei meccanismi di coesistenza virus-vettore potrebbe aiutare a sviluppare *tools* per il monitoraggio, la prevenzione e la profilassi della diffusione del virus in natura.

La presente tesi si inserisce in questo quadro e riguarda la valutazione degli effetti dell'infezione da HAZV sulla proliferazione delle cellule di zecca HAE/CTVM8. La considerazione di partenza è che tale linea può essere infettata persistentemente da HAZV senza manifestare evidenti effetti citopatici, ma sorprendentemente si osserva una cinetica di crescita più elevata rispetto alle cellule non infettate.

In prima analisi sono state determinate le curve di crescita delle cellule non infettate, infettate a MOI 0,1 e infettate a MOI 1. Il risultato ipotizzato era che nelle curve delle colture infettate la fase esponenziale sopraggiungesse temporalmente prima e in maniera dose-dipendente rispetto alla curva della coltura non infettata, cosa che non è emersa dal confronto dei grafici alle *Figure 3 e 4*. Per appurare che ciò non fosse imputabile all'assetto sperimentale sono state verificate la sensibilità e permissività delle cellule all'infezione valutando alcuni parametri. Sono stati allestiti una serie di tubi di cellule HAE/CTVM8, di cui una parte ha funto da controllo (MOCK) e un'altra è stata infettata con HAZV a MOI 0,1. Poi, a intervalli regolari:

- è stato raccolto il surnatante per infettare le cellule Vero – CCL81 al fine di determinare il titolo virale mentre le cellule di zecca sono state sottoposte all'immunofluorescenza per valutare la progressione dell'infezione;

- è stato estratto il DNA totale per valutare la presenza di vDNA quali marcatori della replicazione virale e della risposta cellulare all'infezione.

L'immunofluorescenza ha evidenziato non solo la presenza della NP del virus nel RE delle cellule di zecca, ma anche di stress cellulare valutato con l'aumento dell'espressione della calnexina. Anche il titolo virale prodotto nelle cellule di zecca aumenta esponenzialmente almeno fino a 10 d.p.i. Infine, dalle prove sperimentali è emerso che il numero di vDNA visualizzate nel gel di agarosio cresce fino a essere massimo a 10 d.p.i. In conclusione i risultati ottenuti confermano che le cellule di zecca HAE/CTVM8 sono sensibili e permissive all'infezione da parte di HAZV, ma non cominciano a replicarsi più velocemente prima dei 10 d.p.i.

Dall'insieme di queste osservazioni si deduce che il virus non velocizza la replicazione cellulare nel breve termine, prima dei 10 d.p.i. Questo significa che serve più tempo affinché la coesistenza virus-vettore si instauri e probabilmente l'accelerazione del ciclo cellulare è uno degli eventi che si verificano in un secondo momento. Per avvalorare questa ipotesi si potrebbe valutare la cinetica di crescita cellulare della linea HAE/CTVM8 infettata in un arco temporale più esteso, intervallando con periodi più lunghi i momenti in cui si contano le cellule.

Questo ritardo nell'evoluzione della dinamica virus-vettore potrebbe essere dovuto anche alla linea cellulare scelta come modello sperimentale. Per esempio, in un altro studio è stato osservato che il titolo virale prodotto dalle cellule di zecca HAE/CTVM9 decresce più rapidamente dopo aver raggiunto un picco a circa 2 d.p.i. [6]. Invece in questa sede è stato dimostrato che il titolo virale prodotto dalle cellule HAE/CTVM8 non diminuisce prima dei 10 d.p.i., quindi sembra che in quest'ultima linea l'infezione evolva più lentamente. Ciò significa che è possibile che anche la scelta del modello sperimentale influisca sui risultati evidenziabili, almeno *in vitro*. Pertanto, un altro sistema per fare chiarezza su questa dinamica potrebbe essere quello di utilizzare altre linee cellulari e confrontare i risultati.

Un'altra variabile che potrebbe avere un ruolo sul fatto che le curve di crescita sono sovrapponibili entro i 10 d.p.i. è il numero minimo di cellule che devono essere infettate affinché l'aumento della cinetica di crescita cellulare sia evidente. Se la proporzione di cellule infettate è bassa all'interno della popolazione è possibile che questo effetto non sia abbastanza importante da sovrastare il rumore di fondo delle cellule non ancora infettate e che si replicano a velocità normale. In questo caso dovrebbe trascorrere un arco di tempo sufficiente a diffondere il virus a più cellule che, replicandosi in maniera significativa, produrrebbero un incremento visibile.

Sulla base delle valutazioni affrontate in questa sede si ritiene che le ricerche future dovrebbero essere indirizzate ad approfondire i meccanismi di interazione virus-vettore, anche da un punto di vista molecolare, dissezionando quante più possibili variabili la possano influenzare. Per esempio, aumentare e diversificare le linee cellulari studiate potrebbe elucidare alcuni aspetti della specificità d'interazione che finora sono stati poco considerati e chiariti, ma che stanno assumendo un ruolo sempre più importante. Comunque, occorre osservare una certa cautela nel traslare queste informazioni, soprattutto dal contesto *in vitro* a quello *in vivo* e in natura.

Bibliografia

- [1] Shemsedin Dreshaj, Sali Ahmeti, Naser Ramadani, Gresa Dreshaj, Isme Humolli, and Isuf Dedushaj. **Current situation of crimean-congo hemorrhagic fever in southeastern europe and neighboring countries: a public health risk for the european union?** *Travel medicine and infectious disease*, 14(2):81–91, 2016.
- [2] Aysen Gargili, Agustin Estrada-Peña, Jessica R Spengler, Alexander Lukashev, Patricia A Nuttall, and Dennis A Bente. **The role of ticks in the maintenance and transmission of crimean-congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies.** *Antiviral research*, 144:93–119, 2017.
- [3] Merve Kalkan-Yazıcı, Elif Karaaslan, Nesibe Selma Çetin, Sevde Hasanoğlu, Filiz Güney, Ümit Zeybek, and Mehmet Z Doymaz. **Cross-reactive anti-nucleocapsid protein immunity against crimean-congo hemorrhagic fever virus and hazara virus in multiple species.** *Journal of virology*, 95(7):e02156–20, 2021.
- [4] Marc Mertens, Katja Schmidt, Aykut Ozkul, and Martin H Groschup. **The impact of crimean-congo hemorrhagic fever virus on public health.** *Antiviral research*, 98(2):248–260, 2013.
- [5] Cristiano Salata, Sara Moutailler, Houssam Attoui, Erich Zweygarth, Lygia Decker, and Lesley Bell-Sakyi. **How relevant are in vitro culture models for study of tick-pathogen interactions?** *Pathogens and global health*, 115(78):437–455, 2021.
- [6] Maria Vittoria Salvati, Claudio Salaris, Vanessa Monteil, Claudia Del Vecchio, Giorgio Palù, Cristina Parolin, Arianna Calistri, Lesley Bell-Sakyi, Ali Mirazimi, and Cristiano Salata. **Virus-derived dna forms mediate the persistent infection of tick cells by hazara virus and crimean-congo hemorrhagic fever virus.** *Journal of virology*, 95(24):e01638–21, 2021.
- [7] Jessica R Spengler, Dennis A Bente, Mike Bray, Felicity Burt, Roger Hewson, Gülay Korukluoglu, Ali Mirazimi, Friedemann Weber, and Anna Papa. **Second international conference on crimean-congo hemorrhagic fever.** *Antiviral research*, 150:137–147, 2018.
- [8] Marko Zivcec, Florine EM Scholte, Christina F Spiropoulou, Jessica R Spengler, and Éric Bergeron. **Molecular insights into crimean-congo hemorrhagic fever virus.** *Viruses*, 8(4):106, 2016.