

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**DIAGNOSTICA E VACCINAZIONE CONTRO L'HERPESVIRUS
BOVINO TIPO 1, CAUSA DI IBR NEI BOVINI**

Tutor: Prof. Roberto Mantovani

Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse naturali, Animali e Ambiente

Laureanda: Sofia Maria De Gregori

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

*A mio nonno Lino
e alla mia famiglia
per aver sempre creduto in me*

INDICE

ABSTRACT	1
STATO DELL'ARTE	2
Struttura	2
Genoma	2
Proteine principali	2
Replicazione e rilascio	3
Latenza	4
Trasmissione e diffusione	4
Patogenesi	5
Risposta immunitaria	5
Sottotipi	6
Rinotracheite bovina infettiva (IBR)	6
DIAGNOSTICA	7
Coltura cellulare	7
PCR e corsa elettroforetica	8
ELISA	11
VACCINAZIONE	13
Vaccini vivi attenuati	14
Vaccini spenti o inattivati	15
Vaccini spenti e attenuati gE deleti (marker)	16
CONCLUSIONE	20

ABSTRACT

L'Herpesvirus bovino-1, causa di IBR, malattia respiratoria del bovino, colpisce come via preferenziale l'apparato respiratorio, ma presenta anche forti ripercussioni sullo stato generale dell'animale. Come tutti i virus erpetici caratteristica peculiare è la capacità di "latenza", fatto che permette la riattivazione virale, ovvero che l'animale infetto, seppur clinicamente sano, possa rappresentare un potenziale diffusore dell'infezione. L'ampia e rapida diffusione di BHV-1 negli allevamenti, e i danni correlati alle manifestazioni cliniche, rendono necessario poter diagnosticare questa virosi in modo rapido ed efficace: la parte principale dell'elaborato prevede quindi l'approfondimento di alcune metodologie diagnostiche (colture cellulari, PCR, ELISA indiretto).

Per quanto riguarda il piano di eradicazione e controllo della malattia, continua a svolgere un ruolo essenziale la vaccinazione, in particolare vengono impiegati vaccini tradizionali, spenti e attenuati, ma anche vaccini costituiti da ceppi virali ricombinanti che si dimostrano essere delle valide alternative.

STATO DELL'ARTE

L'**Herpesvirus bovino tipo 1** (BHV-1) rientra nel genere *Varicellovirus*, appartenente alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* e sotto la famiglia *Herpesviridae*. Si tratta di un virus che infetta prevalentemente i bovini, ma anche altri ruminanti, e risulta essere particolarmente resistente nell'ambiente. L'entità della virulenza determina la gravità dell'infezione da BHV-1 e quindi anche la patogenesi.

Una sua peculiarità è lo sviluppo di latenza che permette ai portatori di risultare silenti, ma di essere comunque una potente fonte di infezione. È per questa ragione che tale virus è responsabile di ingenti danni economici all'industria del bestiame: nonostante la mortalità risulti bassa e l'infezione di per sé non pericolosa per la vita, può essere causa di aborto o, in caso di infezioni batteriche secondarie, compromettere fortemente il quadro clinico dei soggetti affetti.

Struttura

Si tratta di un virus a DNA a doppio filamento lineare, di grandi dimensioni e con un diametro compreso tra i 150-200 nm. Possiede un nucleocapside icosaedrico (100 nm) di 162 capsosomeri, avvolto da un grande envelope e rivestito da un tegumento di materiale globulare, a sua volta racchiuso da un involucro lipoproteico derivante dall'ospite e nel quale sono incorporate le glicoproteine virali.

Genoma

Il genoma di BHV-1 (135-140 kbp) è avvolto ad un nucleo fibroso simile ad una bobina. In particolare, la sequenza genomica può essere suddivisa in una regione UL (Unique Long), di 102-104 kbp, e in una sequenza US (Unique Short) di 10,5-11 kbp. Tra queste due regioni vi è una sequenza IR, ovvero una sequenza ripetuta invertita interna, e alla fine è presente una regione TR, quindi una sequenza ripetuta invertita terminale.

Proteine principali

Nel genoma sono state identificate 73 ORF codificanti per le diverse proteine: la caratterizzazione proteomica delle particelle virali è fondamentale poiché permette di analizzare l'architettura del virus e le sue strategie di infezione. Le proteine, infatti, sono le componenti che per prime interagiscono con l'ospite cellulare.

Vi sono in totale 33 proteine virali, tra cui spicca la VP16: una proteina che il virus porta nel tegumento, essenziale per la funzione di transattivazione dei geni immediate early, ovvero per l'espressione dei geni precocissimi.

Risultano fondamentali anche le glicoproteine di superficie, in particolare per quanto riguarda l'ingresso del virus nelle cellule. Le principali glicoproteine sono:

- gC: media l'adesione alla cellula ospite legandosi agli eparansolfati e ad altre molecole sulla superficie cellulare: legame primario al recettore;
- gD: stabilizza il legame del virus riconoscendo altre molecole co-recettoriali e questo è l'evento necessario per l'inizio dell'ingresso virale;
- gB: favorisce la fusione del virus con la cellula ed è coinvolta nella trasmissione intercellulare diretta. È conservata in tutti gli herpesvirus;
- gH: Insieme a gB e gL è coinvolta nell'ingresso del virus poiché media i meccanismi associati alla fusione dell'envelope. È inoltre coinvolta nella diffusione intracellulare;
- gG: è coinvolta nella trasmissione intercellulare diretta, ritarda l'apoptosi nelle cellule infettate ed è coinvolta nella replicazione nelle colture cellulari;
- gM: è coinvolta nella morfogenesi del virione e nella fusione e penetrazione nella cellula;
- gE: stimola la produzione di specifici anticorpi, che non sono però essenziali all'immunità dei soggetti colpiti, ed è essenziale per la massima virulenza, ma non per la replicazione del virus nella cellula ospite.

Replicazione e rilascio

In seguito all'ingresso nella cellula ospite, mediato da gC e gD e poi dal complesso gB e gH/gL, che prevede la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare al fine di garantire il rilascio del nucleocapside all'interno del citoplasma, il virus viene trasportato lungo i microtubuli del citoscheletro fino al nucleo. A questo livello viene rilasciato il DNA virale mediante la destabilizzazione del capsido che si associa ai pori nucleari; il rilascio vero e proprio è promosso da una pressione esercitata all'interno del capsido che favorisce quindi l'estrusione del DNA che potrà essere replicato all'interno dell'ospite.

Nei bovini la replicazione avviene entro 2 ore dall'infezione e l'espressione dell'antigene sulla superficie cellulare avviene entro 3 o 4 ore. In seguito all'assemblaggio, quindi al processo di maturazione del capsido, segue l'acquisizione dell'envelope finale da strutture vescicolari della cellula: il virus viene avvolto mentre germoglia attraverso l'involucro nucleare, viene

trasportato in tali vescicole intracellulari alla membrana e poi rilasciato tramite un processo di esocitosi. Man mano che si formano le particelle la cellula ospite va incontro a lisi e vengono liberati i virioni.

Latenza

Lo sviluppo di latenza, quindi di un'infezione silente e persistente, è una caratteristica unica di questo virus e si ritiene che possa svilupparsi in quasi tutti i bovini infettati, sia con alte che con basse dosi di BHV-1 attenuato o virulento. Si realizza principalmente in cellule nervose, in particolare nei neuroni sensoriali all'interno del ganglio trigemino se l'infezione ha luogo attraverso la cavità orale, nasale o gli orifizi oculari. Può verificarsi anche in siti non neuronali (a livello tonsillare).

Un aspetto critico di questo virus è sicuramente il fatto che la risposta immunitaria, nonostante riduca la sintomatologia, l'entità e la durata dell'escrezione, di fatto non impedisce l'avvento di tale stato di latenza, che non risulta bloccata nemmeno dai vaccini. Il mantenimento dell'infezione latente è controllato principalmente dal gene LR, i cui prodotti inducono questo stato inibendo l'espressione genica virale e l'apoptosi della cellula ospite.

Per quanto riguarda la riattivazione, può essere provocata da eventi di forte stress per l'animale, quali ad esempio il parto, il trasporto o la presenza di altre infezioni, dall'abbassamento del titolo anticorpale e dal trattamento con immunosoppressori. Tutto ciò provoca sierconversione e quindi successiva riescrezione virale.

Trasmissione e diffusione

La trasmissione avviene per contatto diretto e indiretto, per via venerea e per via aerogena a breve distanza: il virus viene eliminato nelle secrezioni nasali per circa 10-14 giorni durante un'infezione respiratoria acuta e la trasmissione può quindi avvenire mediante contatto con la mucosa dei bovini infetti, oppure attraverso materiali biologici contaminati, come ad esempio il liquido seminale di animali infetti. Il serbatoio risulta quindi essere il bovino e il virus può essere trasmesso da animali che sono in fase acuta di infezione e con sintomatologia in atto, da portatori definiti subclinici, caratterizzati quindi da bassa carica virale, ma anche da animali con infezione latente e da vitelli con immunità materna declinante che presentano l'infezione, ma non la sintomatologia clinica.

La dose minima infettante di 10^2 TICD₅₀ è molto bassa e la diffusione del virus è ubiquitaria ed è prevalentemente influenzata dalla tipologia di allevamento e dal tipo di profilassi che viene utilizzata.

Patogenesi

La penetrazione e replicazione primaria avviene nella mucosa delle prime vie respiratorie, in caso di IBR, o in quelle genitali e a livello della congiuntiva. Come sopra riportato, durante la replicazione iniziale il virus può penetrare negli assoni delle cellule nervose locali e, mediante trasporto assonale retrogrado, può raggiungere i corpi dei neuroni nei gangli, stabilendo in questo modo una situazione di latenza. Nel caso poi di viremia transitoria, che è intralinfocitaria, vengono infettate le sedi secondarie quali il tratto digerente, con conseguenti enteriti, le ovaie, l'utero e il feto, portando in questo caso all'aborto. Nonostante la dose infettante minima sia molto bassa, l'escrezione virale è molto elevata (10^8 - 10^{11} TICD₅₀) mediante principalmente le secrezioni respiratorie, ma anche oculocongiuntivali e genitali, sia in fase acuta, sia dopo la riattivazione.

Tra gli effetti patogenetici più rilevanti, in seguito alla moltiplicazione del virus nel tratto respiratorio e all'avvento di alterazioni infiammatorie, c'è sicuramente la perdita di ciglia nell'epitelio tracheale. Secondariamente, viene compromessa la funzionalità dei macrofagi alveolari, vi sono alterazioni delle proprietà del surfactante e un'accresciuta suscettibilità alle infezioni secondarie. Per quanto riguarda quest'ultimo punto, si riscontra una forte depressione dell'immunità cellulo-mediata e umorale e la compromissione della resistenza alle infezioni batteriche secondarie.

Un aspetto importante riguarda i meccanismi di evasione della risposta immunitaria che prevedono la depressione della capacità delle cellule T CD8+ di riconoscere efficacemente le cellule infette, oppure l'infezione e l'induzione del processo apoptotico nelle cellule T CD4+. Per quanto riguarda quest'ultimo punto vi è poi la conseguente compromissione della risposta immunitaria umorale e l'attivazione dei linfociti T citotossici.

Risposta immunitaria

La risposta immunitaria dei bovini all'infezione da BHV-1 è unica e viene innescata quando il virus comincia a replicarsi. La risposta aspecifica è mediata dall'interferone di tipo 1, mentre la risposta cellulare specifica interviene dopo 5 giorni dall'infezione per i linfociti T, e dopo 8-12 giorni per le immunoglobuline IgM e IgG sieriche. L'immunità locale prevede, invece, l'intervento delle IgA e l'immunità materna ha una durata tra i 3 e i 6 mesi. Fondamentale, per quanto riguarda la prevenzione dell'infezione e la diffusione del virus, è la risposta anticorpale; l'immunità cellulo-mediata invece è coinvolta nel recupero dell'infezione.

In particolare, la risposta anticorpale, che prevede Ab neutralizzanti attivati contro diverse glicoproteine, protegge dalla viremia e dalla conseguente patologia associata. Frequente è l'impiego di anticorpi colostrali prelevati da vacche vaccinate per il nutrimento dei vitelli al fine di impedire la sierconversione nei primi mesi di vita, anche se possono permanere infezioni latenti.

Sottotipi

In base all'analisi genomica e sui modelli dei peptidi virali, questo patogeno può essere suddiviso in tre genotipi (sottotipi) che presentano diverso tropismo e quindi diversi tipi di infezione:

- BHV-1.1: ha un'alta diffusione ed è principalmente associato a IBR, ovvero a sindrome respiratoria;
- BHV-1.2a e BHV-1.2b: sono correlati ad infezioni genitali, quindi vulvovaginiti e balanopostiti;
- BHV-1.3: viene in realtà riconosciuto come specie a sé stante ed è associato a forme neurologiche.

Rinotracheite bovina infettiva (IBR)

Nonostante i diversi sottotipi, il genotipo associato alla forma respiratoria è quello più presente negli allevamenti. La forma respiratoria dovuta a BHV-1.1 ha un'incubazione di circa 3-7 giorni ed è caratterizzata da elevata morbilità e scarsa letalità: colpisce prevalentemente le vie respiratorie con diversi sintomi quali febbre elevata (42°C), tachipnea, inappetenza, tosse, eccessiva salivazione e secrezioni nasali, ma questi si accompagnano anche con la perdita di peso dell'animale e una brusca caduta nella produzione di latte, fatto che comporta gravi perdite economiche per via della rapida diffusione del virus. La sintomatologia prevede anche scolo naso-oculare sieropurulento, ulcerazioni a livello del cavo orale, della lingua e negli spazi interdigitali e congiuntiviti. Nei soggetti giovani l'infezione è più generalizzata ed è frequente la comparsa di sintomatologia gastroenterica.

Un altro aspetto critico sono sicuramente i frequenti casi di aborto che può essere causato dall'invasione del virus a livello del feto, oppure come conseguenza della febbre alta o della lisi del corpo luteo, quest'ultima dovuta a notevoli cali nella produzione di progesterone. Data la caratteristica di latenza che contraddistingue questo virus, l'aborto può avvenire anche settimane o mesi dopo l'infezione poiché il virus è in grado di rimanere latente a livello della placenta fino a tre mesi.

DIAGNOSTICA

Nonostante la diagnosi di questo virus erpetico possa risultare difficile poiché è in grado di stabilire uno stato di latenza, l'infezione da BHV-1 può essere diagnosticata con diverse metodologie, dirette ed indirette. Per quanto riguarda le prime, queste mirano a ricercare il virus o una componente virale: rientrano in tale categoria inizialmente l'isolamento su coltura cellulare e poi la PCR per identificare il virus isolato. Le tecniche indirette, invece, prevedono un doppio prelievo del materiale da esaminare a distanza di 2 o 3 settimane e si tratta principalmente di test sierologici ELISA, basati sulla ricerca di anticorpi diretti contro il virus.

Coltura cellulare

Il virus può essere isolato da diverse tipologie di tamponi. Vengono, infatti, prelevati tamponi nasali, congiuntivali o vaginali, cotiledoni placentari di feto abortito, membrana mucosa delle vie respiratorie, ma anche tamponi raccolti a livello polmonare, renale e linfonodale. Si tratta comunque di campioni prelevati da bovini che presentano sintomatologia caratteristica, o simile, a quella dell'IBR. I tamponi vengono in seguito posti in un mezzo per il mantenimento delle cellule (es. EMEM), agitati per eluire il virus e lasciati poi a temperatura ambiente. Il surnatante contenente il virus viene poi prelevato e inoculato: per quanto riguarda questo punto, BHV-1 può essere isolato in diverse colture cellulari, ma viene frequentemente utilizzato un monostrato MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), ovvero una linea cellulare stabilizzata di rene bovino. Il tutto viene incubato a 37°C, per permettere il corretto adsorbimento, viene aggiunto ulteriore terreno di mantenimento e posto ancora in incubatore in presenza di CO₂ al 5%.

Le colture cellulari inoculate con i campioni vengono osservate per 5-7 giorni: la presenza del virus viene rilevata intorno al terzo giorno per la comparsa di effetti citopatici (CPE), tipici di virus citolitici quale quello in esame. Tali effetti implicano la lisi del monostrato e la presenza, intorno a quest'ultimo, di grappoli di cellule arrotondate; si osservano anche sincizi, ovvero diverse cellule fuse tra loro a formarne una singola, multinucleata.

Nel caso in cui non venga individuato alcun CPE durante i giorni di osservazione, allora il campione viene valutato come negativo. Considerando, invece, il surnatante delle colture cellulari precedentemente descritte e risultate positive alla presenza del virus, è necessario estrarre il DNA da questi campioni. In

seguito al prelievo e isolamento, l'eluizione finale di DNA virale viene eseguita in 50 μ L di tampone e conservata a -20°C.

Generalmente, l'impiego di colture cellulari è vantaggioso per quanto riguarda la semplicità nell'allestimento del campione in laboratorio e sono anche facilmente manipolabili. D'altro canto, però, nel caso di compresenza di più virus che provocano CPE simili, non è possibile distinguere tra essi. Inoltre, sono richiesti tempi lunghi per l'ottenimento di una risposta e sono più suscettibili alla contaminazione batterica.

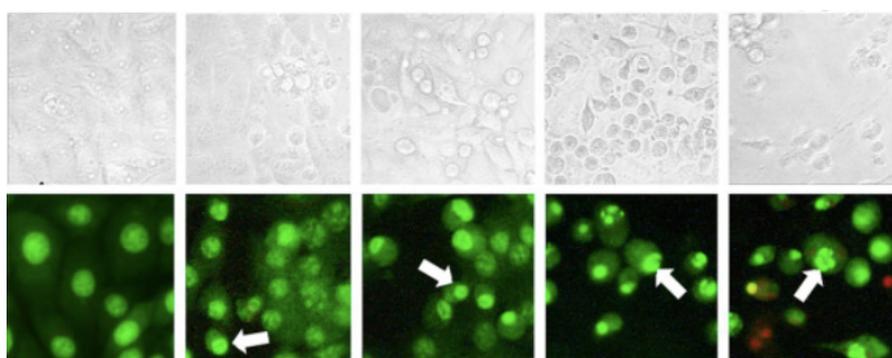


Figura 1. Apoptosi indotta da BHV-1 nelle cellule MDBK. I pannelli superiori sono delle fotomicrografie, eseguite con il microscopio invertito, di CPE indotti dal virus. Di seguito sono poi rappresentati i vari cambiamenti morfologici al microscopio a fluorescenza e le frecce indicano la frammentazione del nucleo e la cromatina condensata.

PCR e corsa elettroforetica

Si tratta di una tecnica diagnostica di biologia molecolare particolarmente sensibile e rapida per il rilevamento di BHV-1 in campioni biologici e clinici: i risultati sono infatti disponibili quasi nell'immediato, il rilevamento è efficace anche dopo due settimane dall'inizio dell'infezione ed è inoltre possibile utilizzare campioni di liquido seminale e di siero fetale bovino.

La reazione a catena della polimerasi classica consiste quindi nell'amplificare in vitro una sequenza nota di DNA mediante l'impiego di uno stampo, di primer complementari alle estremità 3' e 5' del segmento d'interesse e di una DNA polimerasi. La PCR end point, per ogni ciclo di amplificazione, prevede un primo step di denaturazione dei filamenti, l'annealing dei primer e l'allungamento della catena mediante l'enzima.

In particolare, la PCR viene eseguita sui campioni risultati positivi alla presenza del virus e i primer costruiti per il rilevamento del DNA virale sono preparati per permettere loro di appaiarsi a livello del gene codificante la glicoproteina C, la quale media il legame primario con i recettori cellulari nel processo di internalizzazione del virus, promuovendo l'amplificazione di 578 bp. Gli stampi, selezionati proprio da una regione conservata di gC, sono quindi i seguenti:

Forward primer: 560 – GAA GGA GCG CAA GTG GAT GCT CT – 583

Reverse primer: 1138 – CGG AGT CGT CGA CCG TAA AGA CGT – 1115

A livello pratico, secondo uno studio effettuato al Veterinary College di Bangalore, la PCR viene eseguita in provette da 200 μ L con un volume finale di reazione di 25 μ L contenente: 2,5 μ L di tampone PCR 10x, 2,5 μ L di $MgCl_2$, 1 μ L di dNTP (il mix di nucleotidi che la polimerasi utilizza per l'allungamento del segmento d'interesse), 1 μ L di 10 pmol/ μ L di entrambi i primer e della DNA Taq polimerasi, 5 μ L del DNA estratto e 11 μ L di acqua priva di DNAsi.

Il processo di amplificazione, eseguito in un termociclatore, vede inizialmente una fase di denaturazione, per 15 min a 94°C, seguita poi da 34 cicli (94°C per 50 sec, 65°C per 50 sec, 72°C per 50 sec) con un'estensione finale a 72°C per 10 min. Sono poi sempre necessari il controllo positivo, che consiste nel DNA di BHV-1 addizionato a seme puro, e il controllo negativo, ovvero acqua sterile.

Al termine delle reazioni di PCR la procedura prevede il caricamento dell'amplicone su gel di agarosio al 2% (gel a basso punto di fusione in TAE 1x) con bromuro di etidio (0,5 μ g/mL di tampone TAE 1x) che intercala l'acido nucleico a doppia catena ed emette fluorescenza quando esposto ai raggi UV di un Trans-illuminatore UV: il prodotto amplificato in questione di 578 bp, considerato positivo a BHV-1, viene visualizzato come una singola banda chiara e compatta (Figura 2). In particolare, l'elettroforesi su gel, in questo caso di agarosio, è una tecnica impiegata per separare e analizzare frammenti di acidi nucleici sfruttando le loro cariche: quest'ultimi, infatti, possiedono carica negativa data dai gruppi fosfato e, quando vengono posti in un campo elettrico, tendono a migrare verso il polo positivo. La matrice del gel funge da setaccio molecolare, in modo tale che, dopo un certo tempo, molecole di dimensioni diverse avranno percorso distanze differenti nel gel: i frammenti più grandi, infatti, attraversano con più difficoltà la maglia creatasi e quindi migrano più lentamente. Nello studio in questione sono stati sottoposti ad elettroforesi (a 60 mV per 2 ore) 20 μ L del prodotto amplificato con PCR, insieme anche ad un marcatore del DNA di 100 bp.

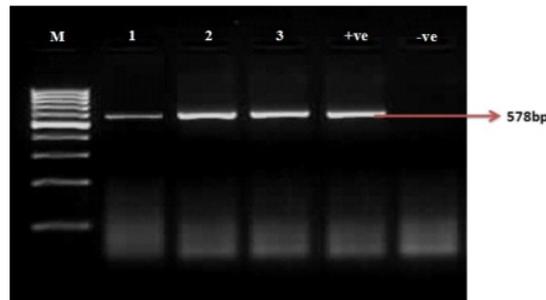


Figura 2. Elettroforesi su gel di agarosio del prodotto amplificato mediante PCR del gene codificante la glicoproteina C di BHV-1 (578 bp). Il DNA Marker riportato presenta un peso molecolare di 100 bp; sono riportati anche il controllo positivo, quello negativo e 3 campioni isolati da specie differenti di bovini di cui si deve verificare la positività.

Per procedere poi al sequenziamento di quanto ottenuto è necessario isolare la fetta di gel contenente le bande di interesse, porla in una provetta ed eseguire una centrifuga. Il tutto viene poi purificato e il prodotto eluito viene conservato a -20°C. Viene eseguita anche una digestione mediante l'enzima di restrizione *SacI* (GAGCTC) che opera un singolo taglio creando due frammenti di 117 bp e 461 bp (Figura 3). Si osserva quindi se sono presenti due bande a tali distanze.

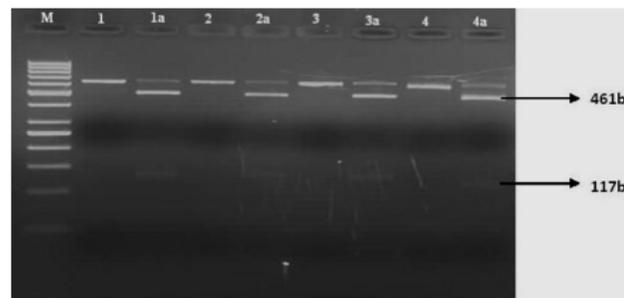


Figura 3. L'immagine rappresenta l'analisi effettuata con l'enzima di restrizione *SacI*.

Il risultato del sequenziamento del prodotto estratto dal gel ha indicato la sua corrispondenza con le 578 bp provenienti dal gene codificante la glicoproteina C di BHV-1. Infine, il prodotto amplificato è stato anche confrontato con un ceppo standard del virus al fine di verificare la presenza di cambiamenti a livello di tale gene.

ELISA

I test ELISA indiretti sono progettati per il rilevamento di anticorpi contro gli antigeni, ovvero proteine che l'organismo riconosce come estranee e che stimolano appunto la produzione di Ab. Questa metodologia diagnostica è molto utile perché consente di discriminare gli animali che sono stati vaccinati, nel caso di BHV-1 ad esempio con vaccini gE-, da quelli che risultano infetti.

Il principio di questo test si basa sul legame degli anticorpi specifici presenti nel campione e l'antigene immobilizzato sul fondo dei pozzetti di una piastra: si forma in questo modo il complesso antigene-anticorpo. Successivamente, un altro anticorpo marcato con enzima legherà tale complesso ed infine viene aggiunto un substrato cromogeno dell'enzima legato all'ultimo anticorpo inserito. Lo sviluppo del colore indica la presenza degli anticorpi che si voleva saggiare, considerando che l'enzima impiegato agisce sul substrato modificandolo in maniera da fargli assorbire luce e risulti quindi colorato. L'intensità della colorazione è poi misurabile grazie allo spettrofotometro.

L'esecuzione di test diagnostici di questo tipo è particolarmente importante durante le ultime fasi dei programmi di eradicazione e sono anche necessari eventuali test di conferma per chiarire risultati poco chiari.

In particolare, è stato sviluppato un test di immunoassorbimento enzimatico indiretto che si basa sulla glicoproteina E (la quale stimola proprio la produzione di specifici anticorpi ed è essenziale per la massima virulenza) che è stata espressa come un antigene ricombinante secreto in un sistema di cellule di mammifero: il test si basa proprio sulla reattività anticorpale contro la gE e un ceppo BHV-1 negativo a tale glicoproteina si è dimostrato essere uno strumento efficace e sicuro per il controllo dell'IBR, soprattutto per la costruzione di vaccini che verranno descritti in seguito.

Per il test vengono analizzati campioni di siero di sangue di animali positivi all'IBR, animali provenienti da allevamenti liberi dalla patologia e animali vaccinati.

A livello pratico, per isolare il gene codificante la gE a lunghezza intera, il DNA è stato estratto da colture cellulari MDBK infettate con un ceppo di BHV-1. In seguito, l'acido nucleico è stato utilizzato come template in una reazione PCR: infatti, al fine di clonare ed esprimere il dominio idrofilico extracellulare della glicoproteina (ectodominio) vengono progettati un set di primer che si legano a valle del peptide e 14 residui a monte del dominio transmembrana.

Ogni primer presenta un sito di restrizione al 5' per facilitare il processo di clonazione:

Forward primer (sito di restrizione per BamHI): 5'-TTGGATCCTAAGCCCGCACC
GAAACCC-3'

Reverse primer (sito di restrizione per XhoI): 5' – TTCTCGAGTCTCGCTGGTGAGCG
GTGGGC - 3'

In seguito, viene amplificata la regione del gene target, il prodotto viene posto su colonna per essere purificato e viene poi direttamente sequenziato grazie ai primer impiegati precedentemente. A questo punto, il frammento del gene, digerito con gli enzimi di restrizione sopra riportati, viene ligato in uno specifico plasmide per poi trasformare cellule competenti di E. coli: al fine di verificare la corretta inserzione del frammento di interesse sono state sottoposte a screening le colonie ampicillina resistenti.

Il plasmide viene purificato da 25 mL di terreno di coltura LB, molto ricco a livello nutrizionale e ideale per la crescita dei batteri, e vengono in questo caso trasformate cellule di rene embrionale umano con il plasmide in questione e con anche un reagente di trasfezione. A questo punto le cellule vengono incubate per 6 ore a 37°C in presenza di CO₂ al 5%, il terreno viene poi sostituito con uno privo di proteine e il tutto viene ulteriormente incubato per 48 ore. Raccolto il mezzo di coltura, centrifugato per rimuovere eventuali detriti presenti, viene conservato a -80°C per le successive analisi.

La glicoproteina d'interesse viene espressa come proteina di fusione, creata quindi con la tecnologia del DNA ricombinante, e presenta una coda con 6 istidine (6 x His). Per determinare la concentrazione proteica si effettuano una serie di diluizioni: ogni pozzetto viene rivestito con un anticorpo monoclonale diretto contro la coda 6 x His e come controllo positivo è stata impiegata una quantità nota della proteina ricombinante.

La proteina ricombinante in questione (terreno da colture trasfettate) o l'antigene negativo (terreno da colture non trasfettate) vengono diluiti 1:10 con un tampone 0,1 M carbonato/bicarbonato a pH 9,6 e vengono posti a rivestire i pozzetti di una piastra (overnight a -4°C). In seguito, i pozzetti vengono bloccati con caseina bovina al 2,5%, i diversi campioni di siero (precedentemente diluiti con PBS/1,25% di caseina) vengono aggiunti ai pozzetti preparati e le piastre vengono incubate per 1 ora. Segue poi il lavaggio e l'aggiunta della proteina G marcata con perossidasi (anch'essa diluita come i campioni di siero) e le piastre vengono nuovamente incubate per 45 minuti. Si procede poi con l'ultimo

lavaggio e la reazione cromatica avviene mediante trattamento con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e H₂SO₄ 0,2 M: tale ammina aromatica si colora, infatti, di blu-verde quando viene ossidata dalla perossidasi. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di enzima presente e quindi anche alla concentrazione dell'anticorpo che si vuole rilevare.

Grazie al test ELISA, i bovini sani vaccinati con vaccini gE deleti possono essere discriminati da quelli infetti con virus wild-type mediante tale reazione sierologica negativa per gE.

VACCINAZIONE

I vaccini permettono all'organismo di indurre l'attivazione del sistema immunitario per la produzione di anticorpi protettivi nei confronti del patogeno, al fine di bloccare l'infezione. Questo viene fatto mediante il riconoscimento del virus, in particolare di alcune strutture che questo presenta, e ciò stimola la produzione di Ab da parte del sistema immunitario che riconosceranno gli antigeni, qualora l'organismo entri in contatto con lo stesso patogeno: l'obiettivo è quello di andare a creare lo stato di immunità verso il virus simulando l'infezione naturale, senza però causare malattia, prevenendo così diverse patologie.

Sono attualmente disponibili in commercio diversi vaccini attenuati e inattivati destinati alla prevenzione di tale infezione virale: i primi sono iniettabili e garantiscono un buon livello di immunità, ma sono potenzialmente patogeni per il feto. Possono essere somministrati anche per via endonasale, garantendo una buona immunità locale, ma scarsa immunità generale e possono comunque dare latenza. Per quanto riguarda, invece, i vaccini spenti questi contengono alti livelli di virus inattivato, o porzioni della particella virale (in particolare le glicoproteine), arricchiti con un adiuvante al fine di stimolare un'adeguata risposta immunitaria. Sono vaccini generalmente innocui, vengono somministrati per via intramuscolare o sottocutanea e necessitano di un numero maggiore di interventi. Vi sono anche vaccini gE deleti (marker), sia attenuati che inattivati, che si basano sulla delezione del gene codificante la glicoproteina E.

Vaccini vivi attenuati

Tutti i vaccini vivi attenuati sono compresi nella denominazione di vaccini ad immunogeni endogeni. In questi la dose di antigene presente nella formulazione del vaccino è molto bassa e quindi insufficiente ad innescare una adeguata risposta immunitaria: per tale ragione il virus presente nel vaccino deve replicare all'interno dell'ospite animale per poter esprimere le proteine immunogene che innescano la risposta immunitaria.

Per quanto riguarda i *vaccini attenuati tradizionali*, tale categoria viene allestita mediante diversi passaggi seriali su colture cellulari per permettere al patogeno, pur perdendo gran parte del suo potere infettivo, di conservare un grado replicativo sufficiente ad indurre la risposta del sistema immunitario negli animali vaccinati. Inducono quindi un'infezione blanda, stimolando invece l'immunità locale, cellulo-mediata e umorale, proteggendo in questo modo da IBR e da altre forme cliniche. D'altro canto, però, non impediscono l'instaurarsi di infezioni latenti e sono controindicati in gravidanza poiché possono provocare aborto in quanto, dopo ripetuti passaggi su colture cellulari, non si ottiene costantemente una completa scomparsa della potenziale pericolosità del ceppo originario. Sono attualmente poco utilizzati anche perché non è possibile differenziare la sieropositività che inducono da quella dovuta ad infezione con il virus wild-type.

Vi sono anche *vaccini attenuati termosensibili*. Si tratta di varianti fenotipiche che replicano a 30°C (e non oltre i 37°C) e a livello della mucosa nasale, inducendo una blanda infezione locale. Una volta superate le strutture interne della cavità nasale, la loro replicazione diminuisce drasticamente proprio a causa della caratteristica di termospecificità, che li rende distinguibili dai ceppi infettanti: non riuscendo, quindi, a raggiungere in grandi quantità le vie respiratorie profonde, così come gli organi interni, risultano innocui anche per animali gravidi. Un vaccino vivo attenuato per BHV-1 ampiamente utilizzato contiene il ceppo RLB 106, un virus termosensibile ottenuto mediante trattamento con acido nitroso.

Vaccini spenti o inattivati

I vaccini virali inattivati, non replicativi, impiegano antigeni uccisi che, in seguito alla loro inattivazione, perdono totalmente la possibilità di replicarsi e quindi, in gran parte, anche l'infettività. I ceppi virali impiegati in questa tipologia di vaccini, una volta cresciuti in coltura, vengono inattivati con trattamenti chimici o fisici, ad esempio mediante agenti alchilanti o calore. Devono essere aggiunti anche adiuvanti che stimolano la risposta immunitaria, portandola ad essere la più alta possibile, in modo tale che riescano poi a produrre una quantità sufficiente di anticorpi che conferiscono uno stato di protezione a lungo termine. La scelta della quantità di antigene è direttamente proporzionale all'efficacia immunizzante del vaccino prodotto: più elevata è la massa antigenica più alta sarà infatti la risposta anticorpale; anche l'integrità dell'antigene vaccinale è importante e quindi è necessario che i processi di inattivazione non siano distruttivi. Inoltre, la qualità dell'adiuvante e dell'agente inattivante risultano essere fattori critici per la qualità del vaccino: quest'ultimo, se allestito correttamente, tenendo quindi in considerazione quanto sopra esposto, permette l'avvento di una buona risposta anticorpale umorale e anche anticorpo-dipendente.

Poiché in questi vaccini l'antigene è già presente nella dose da inoculare, il titolo virale, prima della fase di inattivazione, è molto più elevato di quello presente nei vaccini vivi attenuati. Si tratta di vaccini sicuri che richiedono ripetute inoculazioni e non diffondono nell'ambiente, come potrebbe invece capitare con i vaccini attenuati termosensibili somministrati mediante aerosol.

Essendo i virus incapaci di moltiplicarsi, e anche se presente della patogenicità residua, risultano innocui e non influenzano gli organi di riproduzione, non provocando complicanze come l'aborto. Da tenere in considerazione sono le problematiche relative alle eventuali reazioni nel punto di inoculo dovute agli adiuvanti impiegati; inoltre, i ceppi spenti non sono distinguibili da quelli wild-type.

In particolare, vi sono anche i *vaccini a subunità* che contengono solo parti antigeniche attive del virus, come ad esempio la glicoproteina D che stimola l'azione di anticorpi neutralizzanti. La proteina in questione può essere isolata mediante estrazione dalle particelle virali o, più agevolmente, con metodi ricombinanti su cellule eucariote. In questo caso la risposta immunitaria, in quanto indotta unicamente verso tale glicoproteina, può essere differenziata da quella indotta dal virus selvaggio.

Vaccini attenuati o spenti gE deleti (marker)

I progressi in merito alla conoscenza dei geni caratterizzanti la virulenza di BHV-1 hanno reso possibile la specifica delezione di quest'ultimi, al fine di ottenere l'attenuazione o l'inattivazione del virus per la costruzione di vaccini. Infatti, vi sono geni codificanti glicoproteine, come ad esempio gE, e geni coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, come ad es. quello codificante la timidina chinasi, che possono essere eliminati senza influenzare significativamente la replicazione virale in vitro, ma eliminando l'aspetto critico della virulenza.

I vaccini marcatori, basati quindi sulla delezione singola o multipla di geni non essenziali, permettono il riconoscimento, attraverso le risposte anticorpali, degli animali vaccinati da quelli naturalmente infetti e portatori di IBR.

Per quanto riguarda i *vaccini gE deleti vivi attenuati*, questi vengono costruiti per eliminazione del gene codificante la glicoproteina associata alla virulenza, in quanto coinvolta nella diffusione intercellulare virale. I bovini vaccinati non produrranno anticorpi verso gE e questo permetterà di distinguerli da quelli infettati con il virus wild-type, i quali esprimono tutti tale gene e risultano quindi gE+: in questo modo, gli animali vaccinati mancano di anticorpi contro la glicoproteina virale fortemente immunogenica (non protettiva) che evoca risposte immunitarie negli ospiti a seguito di infezione naturale. Quindi, questa proteina definita marker non è espressa nei virus impiegati per il vaccino, consentendo un'adeguata procedura di screening mediante la combinazione del vaccino marcatore con test sierologici adeguati. Tale procedura risulta essenziale in allevamenti altamente infetti, poiché la vaccinazione non viene confusa con l'infezione naturale, riducendo significativamente il tasso di trasmissione virale.

I *vaccini gE deleti spenti*, invece, presentano le stesse caratteristiche di quelli sopra citati, ma vengono inattivati ed impiegati con l'aggiunta di adiuvanti e per tale ragione sono caratterizzati, da un lato, da maggior sicurezza; dall'altro risultano tuttavia meno efficaci nella protezione dalle forme patologiche, quale IBR, del virus.

L'impiego, quindi, di vaccini marcatori, sicuri, efficaci e progettati a tavolino, nei programmi di eradicazione dell'IBR risulta avere successo poiché consente sia di proteggere gli animali dalla malattia, sia di differenziare quelli vaccinati da quelli infetti, mediante ad esempio i test diagnostici ELISA precedentemente descritti.

Indipendentemente dal fatto che si tratti di un vaccino spento o attenuato (sono poi stati entrambi caratterizzati), è stato sviluppato, mediante ricombinazione omologa, un ceppo virale gE delecto, definito *BHV-1ΔgEβgal*, in cui il gene codificante la glicoproteina E è stato sostituito con il gene per la β-galattosidasi. A livello pratico, il primo passaggio è la costruzione del plasmide ricombinante. Il DNA di BHV-1 viene isolato e purificato dal materiale biologico di partenza (il ceppo viene propagato in cellule MDBK coltivate in terreno minimo essenziale Eagle integrato con siero bovino fetale al 10%) con l'impiego, inizialmente, del detergente anionico SDS che solubilizza i lipidi di membrana e lega le proteine alterandone la struttura secondaria. In seguito, poiché è necessario separare le proteine dall'acido nucleico d'interesse, si impiega prima un enzima proteolitico, la proteinasi K è tra i più utilizzati, che frammenta le proteine e poi la tecnica di separazione fenolo-cloroformio. Il primo (basico e con un pH>8) è un forte denaturante delle proteine poiché crea con quest'ultime legami ad idrogeno, permettendo loro di precipitare nella fase fenolica (organica); il cloroformio, data la sua elevata densità, facilita la separazione della fase acquosa, che contiene ora il DNA deproteizzato, da quella organica. Centrifugando e prelevando la fase acquosa, è quindi possibile riconcentrare il DNA trattandolo con etanolo assoluto che lo disidrata e ne consente in questo modo la precipitazione. A questo punto si possono amplificare le regioni fiancheggianti il gene gE e si procede con la reazione a catena della polimerasi. I primer impiegati, che vengono progettati con l'obiettivo di aggiungere anche siti di restrizione, importanti per la successiva fase di clonazione, sono i seguenti:

Regione sinistra (frammento L):

gE1 (sito di restrizione per Sall): 5' – GCGAGCAGCGGGAGCGGGGCC – 3'

gE2 (sito di restrizione per BamHI): 5' – GGGGCGGATCCGTGGGTTGCA – 3'

Regione destra (frammento R):

gE3 (sito di restrizione per Sall): 5' – AGCTTGGATCCCGCCGCACC – 3'

gE4 (sito di restrizione per BamHI): 5' – CCTCAGAATTCGGGGTCTC GG – 3'

In seguito all'amplificazione, i frammenti vengono digeriti con gli enzimi sopra riportati e sono clonati in sequenza nel vettore pUC19 (Figura 4).

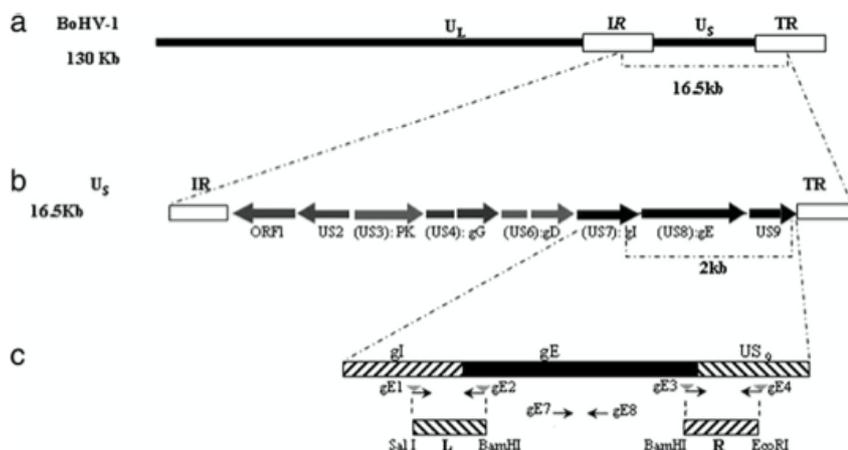


Figura 4. Struttura molecolare del virus BHV-1ΔgEβgal. (a) Regione target per la delezione di gE nel genoma di BHV-1. (b) gE ORF (US8) affiancato dai geni gl (US7) e US9. (c) I primer gE1 e gE2 sono stati progettati per amplificare il frammento sinistro, mentre i primer gE3 e gE4 sono stati progettati per amplificare il frammento destro. Le sequenze di primer gE2, gE3 e gE4 sono state progettate per creare i siti di restrizione raffigurati per facilitare la strategia di clonazione.

A questo punto il gene batterico β-gal, contenuto in un frammento di 4,5 kb e sotto il controllo promotoriale di HCMV, viene inserito nel sito del vettore tagliato con BamHI: ora pUCLRβgal è formato dal gene esogeno codificante per la β-galattosidasi che presenta lateralmente delle sequenze specifiche del virus, essenziali per la ricombinazione con il DNA virale.

La costruzione del virus ricombinante gE deleto prevede il trasferimento su un monostrato di cellule MDBK di pUCLRβgal linearizzato e del DNA virale e la successiva incubazione della piastra per 8 ore a 37°C in presenza di CO₂. In seguito al cambio di terreno (terreno minimo essenziale Eagle integrato con siero bovino fetale al 10%) e ad un'ulteriore incubazione di 16 ore, le cellule trasfettate vengono trattate con tripsina, incubate e monitorate fino all'osservazione di CPE.

Per purificare a questo punto il virus ricombinante ottenuto si fa riferimento ad una proprietà della β-galattosidasi: si tratta, infatti, di un marcatore incorporato nel genoma che permette la formazione di placche blu in presenza di lattosio (substrato β-galattosidasi) e in questo modo consente l'identificazione del virus e la selezione dei cloni che hanno subito una corretta ricombinazione.

In seguito, quindi, ad un'ulteriore reazione di amplificazione PCR, i virus che hanno subito ricombinazione vengono ulteriormente caratterizzati da un'analisi Southern Blot che ha come target l'Open Reading Frame di gE. Tale tecnica di biologia molecolare mira, infatti, a rilevare la presenza di specifiche sequenze di

DNA all'interno di una miscela: vengono digeriti con un enzima di restrizione sia il DNA ricombinante sia quello wild-type, i frammenti ottenuti vengono separati mediante corsa elettroforetica in un gel di agarosio allo 0,6% e il tutto viene poi trasferito su una membrana di nitrocellulosa. I frammenti bloccati vengono ibridati mediante tre tipologie di sonde specifiche. L'ORF gE virale in BHV-1 Δ gE β gal è stato infatti completamente rimosso, ad eccezione delle prime 23 bp in 5' e di 67 bp in 3', e il gene β -gal è stato inserito al suo posto: la delezione dell'intero gE ORF costituisce una caratteristica di sicurezza del nuovo ceppo e permette anche l'attenuazione della virulenza. Inoltre, essendo un lungo inserto, l'aggiunta di β -gal riduce al minimo la probabilità di reversione a forme wild type del virus in questione.

Per confermare la mancanza di espressione della glicoproteina E nei lisati cellulari infettati dal virus ricombinante si fa riferimento anche alla tecnologia Western Blot che permette la rilevazione, analisi e quantificazione di proteine.

In particolare, in seguito a concentrazione mediante ultracentrifugazione, vengono utilizzate cellule MDBK non infette e cellule infettate dal virus ricombinante, entrambe sospese in tampone, bollite e separate mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide, il quale ha un'alta risoluzione. I frammenti vengono posti su membrane bloccate overnight con PBST (contenente anche latte scremato al 5%). In seguito, vengono incubati per 2 ore a 37°C con anticorpi monoclonali, in particolare con anti-gE, e, dopo successivi lavaggi sempre con PBST, le membrane vengono nuovamente incubate con antisiero marcato con perossidasi per 1 ora, alle stesse condizioni. Il legame anticorpale può essere visualizzato in seguito per chemiluminescenza, dopo l'esposizione a una pellicola radiografica.

La preparazione del vaccino con il ceppo ottenuto mediante i processi di ricombinazione prevede poi l'inattivazione con l'1% di bromoetilenimina 0,1 M per 25 ore a 37°C, e la successiva miscelazione con un adiuvante.

Trattandosi di un ceppo ricombinante è necessario comprenderne l'efficacia e la sicurezza, per questo viene sempre confrontato con un ceppo parentale vivo attenuato (controllo), ad esempio per quanto riguarda la cinetica di crescita in vitro.

BHV-1 Δ gE β gal, come inizialmente riportato, è stato caratterizzato sia come vaccino vivo attenuato che come inattivato contro BHV-1. Di fatto, in entrambe le formulazioni è in grado di suscitare un'efficiente risposta immunitaria che protegge i bovini dal virus, inducendo specifiche risposte immunitarie umorali e cellulari. Un aspetto sicuramente rilevante è che le risposte anticorpali indotte

da BHV-1 Δ gE β gal possono essere distinte sierologicamente da quelle indotte dal virus wild-type, anche a lungo termine.

La delezione di gE funge quindi da marcatore immunologico per differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti: per quanto riguarda i primi, questi sono stati protetti contro la malattia e hanno emesso una quantità significativamente inferiore di virus rispetto agli animali vaccinati con il vaccino di controllo, indipendentemente dalla via e dalla formulazione in cui sono stati inoculati.

CONCLUSIONE

BHV-1 è un virus dannoso per gli allevamenti, non soltanto per la sindrome respiratoria e la rapidità con cui si diffonde, ma anche per lo sviluppo di latenza e quindi di possibile sieroconversione, con conseguente riescrezione virale. Il contenimento della virosi è quindi fondamentale per ridurre, in particolare, l'impatto negativo che l'infezione ha sul benessere dell'animale e per ovviare agli ingenti danni economici che ne possono derivare.

A tal proposito, sono attualmente disponibili metodologie diagnostiche efficaci e, soprattutto, la vaccinazione protegge i bovini dalle manifestazioni cliniche e previene la circolazione dell'infezione. In particolare, l'approccio combinato dei vaccini marker con test diagnostici, quale ad esempio ELISA indiretto, permette di distinguere gli animali che sono sieropositivi da infezione da quelli sieropositivi da vaccinazione e ciò risulta di notevole aiuto nei programmi di eradicazione.

Ciononostante, questo virus erpetico rimane ancora oggi uno dei problemi più importanti al momento della scelta dei riproduttori maschi che, nonostante appunto le possibilità di eradicazione della malattia, devono essere totalmente privi di anticorpi anti BHV-1 di qualsiasi natura. Questo per evitare possibili "falsi negativi" mascherati dalla vaccinazione contro il BHV-1 con vaccino delecto, ma anche per impedire la diffusione della malattia attraverso il seme. Ancora oggi, quindi, nei centri genetici dove si allevano solo maschi da riproduzione, la comparsa del BHV-1 rappresenta un momento infausto poiché comporta l'abbattimento obbligatorio dei capi infetti, con forte danno alle potenzialità di miglioramento della popolazione, trattandosi dei soggetti di più alto valore genetico assoluto.

BIBLIOGRAFIA

1. S. Biswas, S. Bandyopadhyay, U. Dimri e P. H. Patra (2013); Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis; *Veterinary Quarterly*, volume 33, pagine 68-81;
2. K. A. Barber, H. C. Daugherty, S. E. Ander, V. A. Jefferson, L. A. Shack, T. Pechan, B. Nanduri e F. Meyer (2017); Protein Composition of the Bovine Herpesvirus 1.1 Virion; *Veterinary Sciences*;
3. S. Ranganatha, D. Rathnamma, S.S. Patil, B.M. Chandranaik, S. Isloor, B.M. Veeregowda, M. Narayanabhat and Srikala (2013); Isolation and molecular characterization of Bovine Herpesvirus-1 by polymerase chain reaction; *Indian Journal Of Animal Research*, volume 47, pagine 340-343;
4. X. Xu, K. Zhang, Y. Huang, L. Ding, G.Chen, H. Zhang e D. Tong. (2012); Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells; *Virology Journal*;
5. L. Bertolotti, E. Muratore, C. Nogarol, C. Caruso, L. Lucchese, M. Profiti, L. Anfossi, L. Masoero, S. Nardelli e S. Rosati (2015); Development and validation of an indirect ELISA as a confirmatory test for surveillance of infectious bovine rhinotracheitis in vaccinated herds; *BMC Veterinary Research*;
6. C. J. Jones e S. Chowdhury (2008); A Review of the Biology of Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-I), Its Role as a Cofactor in the Bovine Respiratory Disease Complex and Development of Improved Vaccines; *Animal Health Research Review*;
7. S. A. Romera, M. Puntel, V. Quattrocchi, P. Del Médico Zajac, P. Zamorano, J. Blanco Viera, C. Carrillo, S. Chowdhury, M. V. Borca e A. M. Sadir (2014); Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle; *BMC Veterinary Research*;