

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET 05

**Meccanismi evolutivi dei parapoxvirus: caratterizzazione
genomica di pseudocowpoxvirus e messa a punto di sistemi per lo
studio delle ricombinazioni**

Presentata da: Francesca Vaccari

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Poglayen

Relatore

Dott.ssa Alessandra Scagliarini

Esame finale anno 2009

INDICE

INTRODUZIONE	1
PARTE GENERALE	
1. EVOLUZIONE	6
1.1 Evoluzione dei DNA virus	10
1.2 Origine della diversità genetica nei DNA virus a grande genoma	11
1.2.1 Fedeltà di replicazione della DNA polimerasi virale	12
1.2.2 Ricombinazioni del genoma virale	14
1.3 L'origine dei nuovi geni virali	18
1.3.1 Acquisizione di geni dall'ospite	18
1.3.2 Trasferimento genico orizzontale da altri patogeni	20
1.4 Evoluzione dei Poxvirus	22
1.5 Metodi sperimentali per lo studio delle ricombinazioni	33
1.5.1 Programmi per l'analisi delle ricombinazioni	38
1.5.1.1 Simplot	38
1.5.1.2 Splitree	39
1.5.1.3 RDP	41
2. PARAPOXVIRUS	
2.1 Eziologia: aspetti generali	43
2.2 Epidemiologia	52
2.3 Patogenesi e sintomatologia	55
2.4 Diagnosi	62
2.5 Profilassi	64
2.6 Terapia	66
PARTE SPERIMENTALE	68

MATERIALI E METODI	70
1. Messa a punto dei substrati cellulari permissivi	70
1.1 Monostrati di cheratinociti ovini	70
1.2 Cellule staminali adulte di cute ovina	71
1.3 Colture organotipiche	72
2. Studio del ciclo replicativo	73
2.1 Virus	73
2.2 Preparazione degli stock virali	74
3. Studio della cinetica replicativa nelle co-infezioni	77
4. Caratterizzazione della regione destra del genoma di PCPV	77
5. Analisi genomica	79
RISULTATI E DISCUSSIONE	81
1.1 Substrati cellulari	81
1.2 Studio del ciclo replivativo virale	84
1.3 Co-infezioni	87
1.4 Caratterizzazione della regione destra del genoma di PCPV	89
APPENDICI	
APPENDICE I	108
APPENDICE II	110
BIBLIOGRAFIA	111

INTRODUZIONE

La famiglia *Poxviridae* rappresenta un gruppo di virus a DNA in grado di infettare numerose specie di vertebrati ed invertebrati e responsabili di patologie negli animali e nell'uomo. I virus appartenenti alla famiglia *Poxviridae* (poxvirus) presentano uno spiccato epiteliotropismo ed hanno in comune la capacità di provocare lesioni cutanee. La famiglia *Poxviridae* è suddivisa in due sottofamiglie, *Chordopoxvirinae* (ChPV) che include virus in grado di infettare i vertebrati ed *Entomopoxvirinae* alla quale appartengono virus che infettano gli insetti.

I Parapoxvirus appartengono alla sottofamiglia *Chordopoxvirinae*; i virus all'interno di questo genere possiedono uno spettro d'ospite molto ristretto provocando infezioni in alcune specie di ruminanti domestici e selvatici. Il prototipo virale dei Parapoxvirus è il virus orf (OV) responsabile dell'ectima contagioso degli ovi-caprini, una malattia diffusa a livello mondiale che provoca gravi danni economici negli allevamenti. Tutte le specie virali appartenenti al genere Parapoxvirus sono trasmissibili all'uomo quindi potenziali agenti zoonosici. L'infezione nell'uomo rappresenta un tipico esempio di zoonosi professionale che interessa in particolar modo le categorie di lavoratori che vengono a diretto contatto con gli animali infetti o con i loro prodotti. L'infezione si manifesta sia negli animali che nell'uomo con lesioni cutanee localizzate mentre in individui immunocompromessi possono manifestarsi forme atipiche proliferative. L'interesse di immunologi e virologi nei confronti dei Parapoxvirus è mirato a chiarire come questi possano essere in grado di infettare ripetutamente gli animali e l'uomo nonostante la vigorosa risposta immunitaria ed infiammatoria sviluppata in seguito ad infezione. Diverse sono le teorie in grado di spiegare questo fenomeno, ma la più accreditata sembra essere quella di meccanismi virali in grado di interferire o sovvertire la risposta immunitaria dell'ospite. Quest'ultima ipotesi ha recentemente trovato conferma nella scoperta di alcuni geni, responsabili della virulenza, localizzati nelle regioni terminali del genoma virale che codificano per fattori ad azione immunomodulatrice. Le conoscenze riguardanti la biologia molecolare dei Parapoxvirus sono ancora limitate

e si basano fondamentalmente su quelle derivate da altri altri Poxvirus come il vaccinia.

Il genoma dei virus appartenenti alla famiglia *Poxviridae* ha dimensioni variabili da 135 a 345 kbp e dimostra un elevato grado di conservazione dell'organizzazione e del contenuto genico. La porzione centrale del genoma contiene 88 geni comuni a tutti i chordopoxvirus che sono posizionati ed orientati nello stesso modo in tutti i virus. Nelle porzioni terminali del genoma sono posizionati geni non essenziali per la crescita in coltura cellulare che frequentemente codificano per fattori determinanti per l'interazione virus-ospite come la modulazione della risposta immunitaria e la definizione dell'host range. Rispetto ad altri poxvirus, i Parapoxvirus hanno un genoma caratterizzato da un alto contenuto in G+C pari al 65%; le sequenze più ricche in A+T sono quelle intergeniche regolatorie, ma sono presenti regioni ricche in A+T anche in alcune sequenze codificanti (ORF) posizionate nel terminale destro. La porzione terminale destra (25 Kb) presenta 19 geni peculiari dei Parapoxvirus che non mostrano corrispondenti nel genoma di altri Poxvirus. Durante la replicazione dei poxvirus le ricombinazioni sono un evento piuttosto frequente ed è la stessa DNA polimerasi virale a mediare questo fenomeno. Studi effettuati su vaccinia virus, prototipo di tutti i poxvirus, hanno dimostrato che i fenomeni di ricombinazione possono realizzarsi quando si trovano contemporaneamente all'interno della stessa cellula, due molecole lineari di DNA con 12-20 bp di identità. Le ricombinazioni svolgono funzioni essenziali nei poxvirus poiché innescano la replicazione del DNA in assenza delle primasi virali, consentono la riparazione delle catene danneggiate di DNA e favoriscono i fenomeni di acquisizione di geni estranei a partire da virus co-infettanti o dall'ospite. Esempi di ricombinazioni naturali tra Orthopoxvirus di specie diversa o nell'ambito della stessa specie sono noti così come l'acquisizione di geni dell'ospite. L'estremità destra del genoma, è la più variabile nei Parapoxvirus, ed è possibile che questa variabilità sia da ricercarsi in possibili eventi di ricombinazione. In questa porzione genomica dei Parapoxvirus sono concentrate, le già menzionate,

sequenze codificanti (ORF) ricche in AT che vengono considerate le regioni acquisite più recentemente dal genoma di cellule ospiti o di altri virus co-infettanti.

Dati derivati dall'analisi di porzioni limitate dell'estremità destra del genoma di Parapoxvirus hanno dimostrato un'elevata variabilità in particolare a carico del gene VEGF e del gene codificante il chemokine binding factor. In particolare studi effettuati sul gene VEGF (ORF 132) di ceppi virali isolati da capre, suggeriscono la possibilità di eventi di ricombinazione tra Parapoxvirus di specie diversa, virus dello pseudovaiolo bovino (PCPV) e virus dell'ectima contagiosos ovino (OV). La renna (*Rangifer tarandus*) e il dromedario (*Camelus dromedarius*) sono finora le uniche specie animali che hanno dimostrato di essere naturalmente recettive sia per OV che per PCPV.

Fenomeni di ricombinazione genomica naturale tra specie diverse di Parapoxvirus, non sono mai stati descritti e comunque per poter avvenire necessitano di substrati permissivi che garantiscano un buon successo replicativo per le specie virali co-infettanti. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto sistemi permissivi per lo studio delle ricombinazioni *in vitro* ed *ex vivo*. In particolare sono state standardizzate metodiche per l'allestimento di colture di cheratinociti ovini e colture organotipiche cutanee. Inoltre sono state messe a punto tecniche per l'isolamento, l'espansione e la caratterizzazione di cellule staminali cutanee, possibili target d'infezione *in vivo*. La co-infezione è la condizione necessaria affinché possa realizzarsi la ricombinazione interspecifica, per questo motivo risulta fondamentale conoscere i fattori che possono influenzare la distribuzione dei diversi virus nelle cellule target. Al momento non sono disponibili dati sulle dinamiche di replicazione dei PPV in substrati permissivi e non ci sono informazioni su eventuali fenomeni d'interferenza conseguenti alla co-infezione con specie virali diverse. Per questo motivo sono state studiate le cinetiche di replicazione di OV e PCPV in purezza ed in seguito a co-infezione di substrati di cellule ovine. Inoltre, per riconoscere segnali di ricombinazione è necessario disporre di dati sul livello di omologia genomica tra specie virali diverse nelle regioni maggiormente interessate dai fenomeni di

ricombinazione. Per questo motivo è stata caratterizzata la regione genomica terminale destra di un ceppo di PCPV isolato da un'infezione naturale, allo scopo di evidenziare le aree di omologia con PPV di specie diversa e possibili "breakpoints" per la ricombinazione interspecifica.

PARTE GENERALE

1 EVOLUZIONE DEI VIRUS

Il costante cambiamento dei virus in risposta alla pressione selettiva è definito evoluzione virale. L'evoluzione è possibile solo quando in una popolazione avvengono delle mutazioni. I virus sono la perfetta dimostrazione di questo fenomeno infatti ogni volta che replicano, le mutazioni si accumulano a livelli considerevoli nei genomi della loro progenie ne consegue un'elevata variabilità che favorisce notevolmente le loro opportunità di sopravvivenza. Data l'assoluta dipendenza dei virus dai loro ospiti, la loro evoluzione può avvenire seguendo due diverse modalità: i virus possono infatti co-evolvere con i loro ospiti così che entrambi condividono un destino comune e quindi, più l'ospite prospera, più il virus può replicare; oppure i virus possono occupare nicchie ampie con più specie ospite recettive, per cui quando una specie ospite è compromessa, il virus ha la possibilità di continuare a replicare in un'altra. In generale, i virus a DNA seguono maggiormente la co-evoluzione con la propria specie ospite, mentre la maggior parte degli RNA virus tendono ad infettare più specie ospiti per garantirsi la sopravvivenza.

I meccanismi responsabili della diversità genetica e quindi dell'evoluzione virale sono principalmente le mutazioni e le ricombinazioni.

Qualsiasi organismo contenente DNA o RNA va incontro a mutazioni del proprio genoma nel tempo. Il numero ed il tasso di mutazioni variano ampiamente fra i diversi virus, fra geni e fra regioni geniche. Il tasso di mutazione di un organismo, definito come la frequenza di mutazione che avviene in un determinato arco temporale, è inversamente proporzionale alla sua grandezza (Drake, 1991a). Questo implica che qualsiasi virus può avere tassi di mutazioni più alti rispetto agli organismi procariotici ed eucariotici.

A causa della pressione immunitaria, il tasso di mutazione dei geni che codificano per le proteine di superficie, è generalmente maggiore rispetto a quello di geni codificanti proteine strutturali interne o non strutturali. Una mutazione può esitare in una sostituzione aminoacidica o in una delezione nella proteina, e in questo caso si parla di cambiamento codificante o non sinonimo, oppure può non apportare nessun

cambiamento aminoacidico, e in questo caso le mutazioni si definiscono come silenti o sinonime. Le mutazioni non sinonime possono essere inoltre classificate come “*missense*” ovvero codificanti per un aminoacido diverso, o “*non-sense*” che introducono un codone di terminazione e quindi interrompono la sintesi della proteina. Le mutazioni *missense* sono molto importanti dal punto di vista evolutivo, mentre le mutazioni non-senso generano dei virus difettivi che non sono capaci di replicare o che acquisiscono proprietà biologiche diverse che possono favorirne la persistenza (morbillivirus, coronavirus). La frequenza delle mutazioni silenti e non, in una data proteina, può fornire un’indicazione sulla possibile pressione selettiva. I geni che codificano per le proteine di superficie spesso mostrano un’alta percentuale di mutazioni non-silenti dovute alla pressione immunitaria, mentre le proteine interne generalmente mostrano un maggior numero di mutazioni silenti.

La maggior parte degli RNA virus, o dei genomi virali che sono replicati attraverso un intermedio a RNA (retrovirus e hepadnavirus), sono copiati con una fedeltà considerevolmente inferiore rispetto ai genomi dei virus a DNA, dal momento che la RNA polimerasi RNA-dipendente (RpRd) manca di un’attività di correzione di errori durante la replicazione virale. La frequenza media di errore riportata per gli RNA virus è di 1 incorporazione sbagliata ogni 10^4 o 10^5 nucleotidi sintetizzati, più di un milione di volte maggiore rispetto al tasso dei genomi cellulari. Dato un tipico genoma virale a RNA di 10 kb, una frequenza di mutazione di 1 su 10^4 porta a circa una mutazione in ogni genoma replicato. Questi virus quindi esistono come distribuzioni dinamiche di repliconi non identici ma correlati, definite quasispecie, piuttosto che virus con singoli genomi. Per questo un virus wild type non è un genoma individuale, bensì un insieme di genomi strettamente correlati (Domingo, 1985).

I virus a DNA, diversamente da quelli a RNA, sono soggetti ad un minor numero di errori durante la replicazione del genoma per la nota attività *proof-reading*, ovvero di correzione di errori, della DNA polimerasi virale. Recenti test *in vitro*, hanno dimostrato che questo dominio di correzione degli errori è in grado di ridurre il tasso

di mutazioni durante la replicazione del DNA di almeno un ordine di grandezza (Garcia-Diaz e Bebenek, 2007). In generale si presume che il tasso di sostituzione nucleotidica e il conseguente tasso di mutazione dei DNA virus non sia molto diverso da quello degli ospiti che infettano. Studi condotti a lungo termine sul tasso di sostituzione, principalmente basati su casi in cui il virus e l'ospite hanno subito la co-evoluzione, mostrano che questa supposizione è vera per i grandi DNA virus a doppio filamento (dsDNA) come herpesvirus, e forse anche per i piccoli dsDNA virus come i papillomavirus umano e il poliomavirus (Bernard, 1994; Hatwell e Sharp, 2000; Shackelton and Holmes, 2008). Per i DNA virus a singolo filamento (ssDNA) questo tipo di valutazioni sono meno disponibili; analisi sperimentali hanno evidenziato che il numero di mutazioni per base per genoma durante la replicazione del fago M13, che presenta un genoma a ssDNA, sono maggiori di almeno 1 logaritmo rispetto al tasso per il fago λ che possiede un genoma dsDNA (Drake, 1991b). Uno degli sviluppi più importanti nei recenti studi sulle dinamiche di evoluzione virale è l'evidenza che i ssDNA virus evolvono a tassi che si avvicinano a quelli degli RNA virus. Questa osservazione deriva da analisi condotte sul parvovirus canino (CPV), osservato per la prima volta nel 1978 e ormai diffuso in tutto il mondo. Il tasso stimato per questo virus è di circa 10^{-4} sostituzioni per sito per anno come per gli RNA virus (Shackelton *et al.*, 2005). Inoltre, alti livelli di sostituzioni sono stati osservati in altri ssDNA virus, parvovirus umano B19 (Shackelton e Holmes, 2006; Biagini, 2004), circovirus (Umemura *et al.*, 2002) e geminivirus (Duffy e Holmes, 2008).

Il secondo meccanismo di fondamentale importanza per l'evoluzione virale è lo scambio di informazioni genetiche mediante ricombinazione o riassortimento di segmenti genomici; prerequisito necessario perchè ciò avvenga è la co-infezione di una cellula con due distinti virus o ceppi virali. Questo scambio genetico può esitare in improvvisi e profondi cambiamenti del fenotipo dell'agente patogeno. Il meccanismo di ricombinazione si verifica attraverso processi distinti nei DNA e negli RNA virus. Nei DNA virus, la ricombinazione sembra avere luogo nella stessa

maniera con cui avviene negli altri genomi a DNA, coinvolgendo un meccanismo enzimatico di rottura-riunione. Questo processo sembra essere abbastanza comune e può esitare nella cattura di geni dell'ospite che possono aiutare il virus a mimare o bloccare le proteine cellulari, favorendo quindi lo sviluppo dell'infezione (Chaston e Lidbury, 2001). Negli RNA virus, le ricombinazioni possono avvenire sia attraverso il riassortimento che la replicazione a scelta di copia o "copy-choice". Il riassortimento descrive il processo mediante il quale i virus, con genoma segmentato, spostano questi segmenti durante infezioni miste. Questo processo è stato descritto in dettaglio per le infezioni da Influenza virus A, in cui è associato con la produzione di nuovi ceppi che possono evadere l'immunità pre-esistente attraverso il drift antigenico (Webster *et al.*, 1982). Nella replicazione a scelta di copia, dopo la co-infezione di una cellula ospite, la RNA polimerasi RNA dipendente virale, nel replicare il genoma, passa da una molecola di RNA ad un'altra generando "genomi mosaici" e quindi nuovi virus con proprietà biologiche molto diverse (Nagy e Simon, 1997). Si pensa che questo processo avvenga in un'ampia varietà di virus a RNA a polarità positiva e nei retrovirus (Worobey e Holmes, 1999).

In generale, durante le infezioni virali, le informazioni possono essere scambiate in differenti modi; un ospite può essere infettato o co-infettato da virus differenti nel corso della vita. Le infezioni seriali e concomitanti sono molto comuni ed hanno un profondo effetto sull'evoluzione virale. Le co-infezioni forniscono un'ottima opportunità per lo scambio di materiale genetico. Inoltre, virus capaci di influenzare la risposta immunitaria dell'ospite hanno effetti evidenti su infezioni concorrenti o successive dello stesso ospite, sostenute da altri agenti patogeni. Ad esempio, animali infettati da poxvirus sono più suscettibili ad altre infezioni poiché questi virus sono in grado di produrre inibitori degli interferoni e altre citochine che vanno a modulare la risposta immunitaria dell'ospite (Iyer *et al.*, 2006).

1.1 Evoluzione dei DNA virus

Il genoma dei virus a DNA si presenta in una varietà considerevole di grandezze e forme, da piccole molecole a singolo filamento di DNA a grandi molecole a doppio filamento che possono essere lineari o circolari. Sulla base della grandezza e natura del loro genoma, i DNA virus degli eucarioti possono essere classificati in due o tre ampi gruppi. I grandi DNA virus a doppio filamento (dsDNA) che hanno un genoma più lungo di 100 kb; un secondo gruppo, *Adenoviridae*, presenta un genoma di circa 28-45 kb in lunghezza, ma biologicamente è molto simile ai grandi DNA virus dato che codificano per la DNA polimerasi e le proteine accessorie coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria. Il terzo gruppo è rappresentato dai piccoli DNA virus il cui genoma è inferiore ai 10 kb e comprende sia i DNA a doppio filamento che a singolo filamento (ssDNA). I grandi virus a DNA codificano per molte proteine, spesso più di 100, che hanno un ruolo nella replicazione virale, nella regolazione delle cellule ospiti e nella modulazione immunitaria dell'ospite (Shackelton e Holmes, 2004). Nel caso più estremo, esemplificato dai poxvirus e dagli iridovirus, il virus fornisce un sistema completo di sintesi del DNA e replica nel citoplasma della cellula ospite. Le proteine virali che hanno una funzione chiave nel processo di replicazione e sono responsabili di questa indipendenza dal sistema replicativo o trascrizionale della cellula ospite sono: la DNA polimerasi, le elicasi e le DNA clamp per la replicazione del DNA; le resolvasi delle giunzioni di Holliday e le topoisomerasi per la manipolazione del genoma; fattori di trascrizione coinvolti nei primi stadi della trascrizione e dell'estensione; pompe ATPasi per l'impaccamento del DNA e chaperonine coinvolte nell'assemblaggio del capsido (Iyer *et al.*, 2001).

Tutti i grandi virus a DNA presentano una DNA polimerasi appartenente alla famiglia B che, come la polimerasi replicativa degli eucarioti, contiene il dominio catalitico fuso al dominio 3'-5' esonucleasico N-terminale (Leipe *et al.*, 1999). In accordo con l'ampio genoma e la relativa autonomia, la maggior parte dei grandi virus a DNA possiede molteplici enzimi per la ricombinazione. La resolvasi per le giunzioni di Holliday RuvC-like è codificata dai poxvirus, iridovirus, mimivirus. La

funzione di questa proteina nella risoluzione dei concatenameri è stata dimostrata per il vaccinia virus (Garcia *et al.*,2000). Inoltre i poxvirus codificano per la topoisomerasi IB (Iyer *et al.*,2006).

Al contrario, i piccoli virus a DNA codificano per meno di 10 proteine, alcune delle quali costituiscono le basi strutturali del capsido, mentre le restanti sono principalmente coinvolte nella stimolazione o nell'integrazione della replicazione, che avviene per mezzo dell'apparato della cellula ospite. Inoltre questi virus, diversamente da quelli a grande genoma, non sono in grado di modulare la risposta immunitaria dell'ospite. Questo, unito al fatto che i virus piccoli sono molto più dipendenti dalle proteine cellulari e da altre risorse per la loro propagazione, potrebbe avere influenzato il percorso evolutivo di questi patogeni (Shackelton e Holmes, 2004).

1.2 Origine della diversità genetica nei DNA virus a grande genoma

Le fonti di nuovi geni nei grandi DNA virus includono la duplicazione dei geni di uno stesso virus, lo scambio genico fra virus e la cattura di geni dall'ospite. La frequenza di questi tre processi evolutivi fondamentali non è ancora stata chiarita, nonostante i loro rispettivi tassi possano essere rilevati attraverso la comparazione genomica e analisi filogenetiche. Mentre per batteri ed eucarioti sono già stati effettuati diversi studi a riguardo (Koonin *et al.*,2001; Koonin *et al.*,2004), per i virus, le stime per determinare la frequenza di questi processi sono ancora scarse e più difficili da condurre dato l'alto tasso di mutazioni e di ricombinazioni alle quali sono soggetti questi microrganismi (Awadalla, 2003).

Il grado di similarità tra le sequenze proteiche dei grandi DNA virus e quelle degli organismi cellulari riveste un interesse particolare. Molti omologhi virali di proteine cellulari sono coinvolti sia nella risposta immunitaria che nel metabolismo e nella replicazione degli acidi nucleici (Shackelton e Holmes, 2004). Botstein per primo propose che i genomi dei fagi fossero costruiti attraverso la ricombinazione di elementi genetici a partire da diversi virus ancestrali, un processo denominato

“evoluzione modulare” (Botstein, 1980). Questa teoria fu in seguito ampliata così che la fonte dei geni fagici potesse includere il genoma di altri fagi ed i loro ospiti batterici (Campbell e Botstein, 1983). Si pensa che una simile teoria possa essere applicata anche ai grandi DNA virus che potrebbero essere il risultato di una collezione di moduli acquisiti da altri virus, cellule ospiti ed eventi di duplicazione intragenomica.

1.2.1 Fedeltà di replicazione della DNA polimerasi virale

La replicazione del DNA cellulare è un processo molto fedele con un tasso di errore di solo una mutazione in ogni 10^9 bp sintetizzate. Questa fedeltà, che è essenziale per mantenere l'integrità del genoma, è basata sull'accurato appaiamento di substrato e basi deossiribonucleotidiche, che precede la sintesi di ogni legame fosfodiesterico. L'inizio della sintesi di DNA richiede un primer perfettamente appaiato con il template e questo non può avvenire se il nucleotide terminale o la regione precedente primer-template è spaia. In questa circostanza, la base non correttamente accoppiata nel primer d'innescio è scissa dall'attività 3'-5' esonucleasica presente in tutte le DNA polimerasi finché non viene creato il perfetto appaiamento tra primer e template. Per cui, la DNA polimerasi è un enzima in grado di apportare correzioni rimuovendo gli errori commessi nella sintesi del nuovo DNA già durante la replicazione. Le polimerasi cellulari sono anche le responsabili della sintesi dei piccoli DNA virus, come parvovirus e papovavirus, quindi la replicazione di questi microorganismi dovrebbe essere tanto accurata quanto quella dei genomi delle loro cellule ospiti. In realtà, come già spiegato in precedenza, per alcuni virus a ssDNA la replicazione porta ad elevati tassi di mutazioni, che nel caso del CPV hanno permesso di ampliare lo spettro d'ospite e di generare un notevole numero di varianti antigeniche (Shackelton *et al.*, 2005). Esistono due possibili spiegazioni per questo fenomeno, l'alto tasso di mutazione nel CPV potrebbe essere intrinseco oppure la costante pressione selettiva positiva, a cui è stato sottoposto il virus, può aver aumentato notevolmente il tasso a cui le mutazioni vengono fissate nel genoma

(Shackelton *et al.*,2005). Lo stampo a singolo filamento o i meccanismi impiegati per la sua replicazione potrebbero alterare l'efficienza o l'accuratezza della polimerasi. Ancora, i meccanismi di correzione e di riparazione potrebbero non essere così attivi o efficienti in questi genomi o nelle cellule da essi infettate. In alternativa, la mancanza di una doppia elica potrebbe renderli vulnerabili a processi mutazionali come la deaminazione (Ritchie *et al.*,2003).

I virus a DNA con un genoma più greco si avvalgono per la loro replicazione di polimerasi virali che possiedono un'attività 3'-5' esonucleasica intrinseca che di preferenza scinde i nucleotidi spaiati da DNA duplex *in vitro* e contiene brevi sequenze conservate correlate a quelle che affiancano i residui cataliticamente attivi delle ben caratterizzate DNA polimerasi cellulari. Recenti esperimenti hanno mostrato che mutazioni che compromettono l'attività esonucleasica della DNA polimerasi del virus herpes simplex di tipo I aumentano ampiamente il tasso di mutazioni del genoma virale durante il ciclo dell'infezione (Hwang *et al.*,1997). Nonostante questo, anche i grandi virus a DNA possono inserire mutazioni all'interno del genoma durante la replicazione virale. Il tasso di sostituzioni stimato per i DNA virus come herpes simplex di tipo I è circa 3.5×10^{-8} sostituzioni per sito per anno (Sakaoka *et al.*,1994), un ordine di grandezza maggiore rispetto al tasso dei geni nucleari di mammifero (Li, 1997).

Una spiegazione possibile dell'origine di queste mutazioni è che i grandi DNA virus inibiscano l'espressione di geni cellulari mediante diversi meccanismi e che possano inibire anche la sintesi del DNA cellulare. È perciò possibile che le proteine cellulari, che normalmente agiscono da supporto nella riparazione degli errori svolta dalle DNA polimerasi, non siano presenti in concentrazioni sufficienti per svolgere un'efficiente sorveglianza e riparazione del nuovo DNA virale sintetizzato all'interno delle cellule da questi virus. Comunque, né la concentrazione né tanto meno l'attività di queste proteine riparatrici sono state valutate nelle cellule infettate da adeno-, herpes-, o poxvirus. Informazioni più dettagliate riguardo al tasso con cui la DNA polimerasi virale introduce errori durante la sintesi dell'acido nucleico *in vitro*, e il

tasso di mutazioni del genoma virale quando questo viene replicato nelle cellule infette, aiuterebbe a stabilire il ruolo del sistema di riparazione cellulare nel mantenere l'integrità di questi genomi virali. Allo stesso modo, resta da chiarire il contributo degli enzimi virali che potrebbero prevenire o riparare danni al DNA, quali dUTPase e uracil DNA glicosilasi degli herpes- e poxvirus.

1.2.2 Ricombinazioni del genoma virale

La ricombinazione genetica, il riarrangiamento di sequenze di DNA all'interno di un genoma o tra due genomi, è una reazione importante nel ciclo vitale di molti DNA virus. La maggior parte delle nostre conoscenze sui meccanismi di ricombinazione si basa sugli studi di virus che parassitano batteri, come il batteriofago λ . Principi analoghi sono applicati alle ricombinazione del DNA genomico di virus animali. Generalmente si riconoscono due tipi di ricombinazione: sito-specifica e omologa. Nella ricombinazione sito-specifica, si assiste a scambi di sequenze specifiche di DNA che presentano brevi tratti di omologia, specificamente riconosciute da proteine che catalizzano la ricombinazione. Queste sequenze possono essere presenti anche solo in una delle due sequenze di DNA che stanno ricombinando con quel meccanismo. Molto più comune durante la replicazione del DNA è la ricombinazione omologa, reazione che coinvolge due doppie eliche di DNA ed è caratterizzata dallo scambio d'informazioni genetiche tra qualsiasi coppia di sequenze omologhe. Il processo inizia solitamente con eventi di rottura nei filamenti omologhi di due DNA duplex appaiati. Ciascun filamento può così migrare dal proprio complementare, invadere il proprio complementare nell'altra molecola duplex e appaiarsi con questo. Queste reazioni vengono facilitate da proteine che si legano al DNA a singolo filamento, così come da enzimi specializzati che si legano ad entrambi i DNA a singolo e doppio filamento per promuovere la reazione di invasione. Questo scambio reciproco crea una connessione tra i due duplex di DNA, che insieme formano la cosiddetta molecola congiunta (*joint molecule*). Il punto in cui un filamento singolo di DNA passa da un duplex all'altro viene chiamato giunzione ricombinante o di

Holliday (*Holliday or recombinant joint*). A livello del sito di ricombinazione, si forma su entrambi i duplex una regione nella quale ciascun filamento deriva da una diversa molecola di DNA parentale; tale regione prende il nome di DNA ibrido o eteroduplex. Una caratteristica importante della giunzione ricombinante risiede nella sua capacità di spostarsi lungo la doppia elica del DNA, con un movimento chiamato *branch migration*. La *branch migration* è molto importante perché può consentire al punto di crossover nell'intermedio di ricombinazione di muoversi nell'una o nell'altra direzione e sembra che *in vivo* sia catalizzata da un enzima specifico della ricombinazione. La molecola congiunta che si forma, in seguito allo scambio di filamenti, deve essere risolta in due doppie eliche separate. La risoluzione della struttura di Holliday può generare duplex di tipo parentale oppure ricombinanti a seconda di quali filamenti vengono incisi.

Per i genomi virali a DNA si verifica più frequentemente la ricombinazione omologa. Si pensava che questi genomi non codificassero per proteine specifiche di ricombinazione, nonostante si fosse osservato che la nucleasi alcalina dell'herpes simplex tipo I partecipasse alla risoluzione delle molecole di DNA ramificate. Si riteneva perciò che la ricombinazione omologa dei genomi virali fosse catalizzata da enzimi cellulari dell'ospite. Recentemente, come già descritto in precedenza, è stato dimostrato che i genomi dei grandi DNA virus codificano per enzimi che prendono parte agli eventi di ricombinazione. In ogni caso, la ricombinazione virale è favorita da un ampio numero di molecole di DNA virale presenti nelle cellule infette e dalla concentrazione di DNA in replicazione all'interno dei compartimenti addetti a questo processo, ovvero nucleo o citoplasma. Infatti, l'appaiamento delle sequenze omologhe, evento iniziale della ricombinazione, dipende da collisioni casuali e perciò è concentrazione-dipendente. Inoltre, le strutture intermedie di replicazione o la richiesta per il taglio del DNA virale durante la replicazione o l'impaccamento, che fornisce gli estremi del DNA che possono iniziare il processo d'invasione, possono facilitare la ricombinazione fra le molecole di DNA virale. La facilità con la quale le

sequenze di DNA virale possono ricombinare è un fattore molto importante nell'evoluzione di questi virus.

Analisi genomiche intra-specifiche hanno dimostrato che gli eventi di ricombinazione succedono frequentemente in molte specie batteriche, virali e protozoiche (Feil e Spratt, 2001). La frequenza con cui le ricombinazioni avvengono nelle popolazioni è sconosciuta e controversa, ma sarebbe di estrema importanza conoscere questo dato per diverse ragioni: i parametri di base di una popolazione, che includono l'effettiva grandezza della popolazione (N), il numero di mutazioni, il tasso delle ricombinazioni e delle migrazioni, potrebbero fornire importanti informazioni sull'entità di scambio genico fra genomi all'interno della stessa popolazione e fra popolazioni geograficamente separate. Per i patogeni in particolare, questa informazione è utile a spiegare le dinamiche della resistenza ai farmaci e la patogenicità, oltre a consentire di individuare i processi epidemiologici coinvolti per attuare efficaci misure di controllo delle malattie. Determinare l'entità del tasso di ricombinazione genica nelle popolazioni naturali può anche fornire importanti informazioni per identificare i geni associati con la virulenza e la contagiosità. In genetica medica, le associazioni tra virulenza e marker genetici che sono derivati dal drift genetico e che vengono rotti dalle ricombinazioni sono cruciali per mappare mutazioni utili all'evasione della risposta immunitaria (Awadalla, 2003).

Nei genomi dei grandi DNA virus sono stati ritrovati diversi enzimi che hanno un ruolo nel processo di ricombinazione. Recentemente è stato scoperto che i poxvirus codificano per una proteina che possiede una “signature” presente nella famiglia RuvC delle resolvasi delle giunzioni di Holliday (HJ), enzimi chiave nella ricombinazione omologa dei batteri. Queste endonucleasi hanno alta affinità per le giunzioni di Holliday e presentano specificità di sequenza per il taglio dell'intermedio di ricombinazione (Garcia *et al.*, 2006). In particolare, un enzima omologo a RuvC codificato dall'ORF A22 del vaccinia virus (VAV) ha dimostrato di legare e tagliare specificamente una molecola di Holliday sintetica (Garcia *et al.*, 2000). Nel virus della peste suina africana (ASFV) questa resolvasi è sostituita da

una nucleasi ERCC4/Mus81-like, che è correlata alla principale resolvasi degli eucarioti, Mus81 (Haber e Heyer, 2001). I mimivirus, i più grandi DNA virus conosciuti, parassiti del protozoo *Acanthamoeba polyphaga*, e gli iridovirus codificano per una

nucleasi della famiglia URI che è correlata alla Slx1p, il secondo enzima degli eucarioti per le HJ (Fricke e Brill, 2003).

Inoltre, ASFV e i mimivirus possiedono una esonucleasi (Aravind *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2001) che potrebbe essere coinvolta nella processazione degli estremi del DNA per lo scambio dei filamenti o per l'annealing dei singoli filamenti durante la ricombinazione, come è già stato osservato per i batteriofagi (Kovall e Matthews, 1997).

Le topoisomerasi sono enzimi che modificano la topologia del DNA mediante il taglio e la riunione di legami fosfodiesterici e svolgono importanti attività in diversi processi cellulari incluso la ricombinazione. Questi enzimi ubiquitari possono essere classificati in topoisomerasi di tipo I, che introducono una rottura transitoria in un solo filamento del DNA e topoisomerasi di tipo II in grado di generare rotture in entrambi i filamenti del DNA. Il vaccinia virus codifica per la topoisomerasi IB, il cui dominio catalitico è piuttosto simile a quello dell'integrasi HP1 dei fagi e della ricombinasi Cre batterica (Kwon *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1997). Queste proteine sono membri di una grande famiglia di ricombinasi sito-specifiche che catalizzano trasferimenti reciproci di filamenti di DNA durante la formazione e la risoluzione delle strutture di Holliday. La topoisomerasi del VAV ha dimostrato di promuovere la ricombinazione di sequenze specifiche *in vivo* e di catalizzare ad alta efficienza la risoluzione sito-specifica delle HJ *in vitro* (Shuman, 1991; Sekiguchi *et al.*, 1996). Anche nei mimivirus è stata ritrovata una topoisomerasi IB (MimiTopIB) strutturalmente e funzionalmente omologa a quella codificata dal vaccinia. MimiTopIB è in grado di riconoscere e incidere il DNA duplex nel sito di clivaggio 5'-CCCTT condiviso da tutte le DNA topoisomerasi conosciute di poxvirus (Benarroch *et al.*, 2006). Al contrario, ASFV presenta una topoisomerasi di tipo II la

cui regione N-terminale è molto simile alla corrispondente regione delle topoisomerasi II degli eucarioti, alla subunità *girB* di *E.Coli* e alla subunità del batteriofago T4 (Baylis *et al.*, 1992; Garcia-Beato *et al.*, 1992).

1.3 L'origine dei nuovi geni virali

1.3.1 Acquisizione di geni dall'ospite

L'acquisizione di geni dall'ospite è stata documentata in tutti i tipi di parassiti (Hughes e Freidman, 2005; Koonin *et al.*, 2001; Senkevich *et al.*, 1997) quindi non stupisce che anche i DNA virus a grande genoma abbiano acquisito un determinato numero di geni dai loro ospiti durante il corso dell'evoluzione. Questi geni sono stati incorporati in vari sistemi funzionali dei virus e, sulla base della funzione per i quali sono stati reclutati e del tempo da cui si sono distaccati dalla loro origine cellulare, essi mostrano gradi differenti di modificazione in termini di architettura dei domini e divergenze di sequenza. Questo genere di acquisizione è stata documentata in particolare per i poxvirus (Hughes e Friedman, 2005; Senkevich *et al.*, 1997).

La posizione nel genoma e la composizione dei geni può fornire ulteriori evidenze per la direzione del trasferimento, ovvero può spiegare se il virus ha catturato il gene dall'ospite o viceversa (Shackelton *et al.*, 2007). Se il gene è localizzato in diverse regioni fra virus correlati o ha pattern misti di presenza/assenza, l'ipotesi di acquisizione esogena è rafforzata, nonostante si possa considerare anche la perdita di geni dopo la duplicazione e il trasferimento genico laterale.

I grandi virus a DNA codificano numerose proteine omologhe a proteine cellulari coinvolte in funzione immunitarie. Molti di questi omologhi virali modulano il sistema immunitario dell'ospite, mimando o interferendo con le corrispondenti proteine cellulari. Alcune di queste molecole virali hanno dimostrato di reprimere la risposta immunitaria cellulo-mediata (Spencer *et al.*, 2002). Ad esempio, diversi virus a DNA, tra cui i parapoxvirus, codificano per un omologo dell'interleuchina-10 cellulare (IL-10), con un'identità aminoacidica superiore all'80% (Fleming *et al.*, 2000).

Le proteine virali possono essere omologhe alla loro controparte cellulare su tutta la proteina o solo su domini specifici. Il pattern di conservazione può essere indice del ruolo che le proteine virali rivestono nella modulazione immunitaria. Per esempio, tra i poxvirus alcuni recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF), nonostante siano omologhi alla loro controparte cellulare nella regione del legame al ligando N-terminale, differiscono nella regione C-terminale e codificano per un peptide segnale. Questo ha come esito finale la loro secrezione, permettendo loro di legarsi competitivamente ai mediatori del segnale immunitario presenti nello spazio extracellulare (Hu *et al.*, 1994).

Le proteine immunitarie omologhe a quelle dell'ospite potrebbero avere un ruolo nell'adattamento del virus al proprio ospite (Holzerlandt *et al.*, 2002). Data l'ubiquità e l'utilità degli omologhi immunitari nel modulare la difesa dell'ospite, è curioso notare come i virus a RNA non siano oggetto di questo fenomeno di cattura di queste proteine. Una spiegazione plausibile è la limitata grandezza del loro genoma, funzione stessa della bassa fedeltà dell'RNA polimerasi RNA-dipendente e della conseguente soglia di errore (Holmes, 2003). Ci sono sempre più prove a favore di importanti restrizioni nell'evoluzione degli RNA virus. L'alto tasso di mutazione degli RNA virus, oltre a produrre una notevole variazione genetica, è fondamentale dal punto di vista evolutivo perché può avvicinarsi alla teorica "soglia di errore". Oltre questa soglia, definita come l'inverso della grandezza del genoma, si verificano così tante mutazioni deleterie, durante ogni ciclo replicativo, che i genomi perdono la capacità di riprodursi fedelmente e alla fine la popolazione si estingue (Eigen, 1996). Questa teoria quindi stabilisce un limite massimo di grandezza del genoma, essendo impossibile replicare lunghi filamenti di RNA per l'accumulo delle troppe mutazioni. Infatti, la maggior parte degli RNA virus presenta genomi che non superano le 15 kb, perché questa è la dimensione del genoma normalmente definita dalla soglia di errore (Holmes, 2003).

Le proteine omologhe virali sono coinvolte in molteplici strategie di modulazione cellulare. Tra le strategie di elusione della risposta infiammatoria e immunitaria,

alcuni virus possono prevenire sia la loro stessa eliminazione che il danno all'ospite attraverso l'instaurazione del fenomeno della latenza, come nel caso degli herpesvirus. Al contrario, gli RNA virus dipendono dal loro alto livello di mutazioni per evadere la pressione immunitaria dell'ospite (Chaston e Lidbury, 2001). Per quanto riguarda la diversa tendenza in termini di acquisizione genica fra DNA grandi e piccoli, al momento non si conoscono i fattori che contribuiscono ad essa. L'ordine dei geni all'interno del genoma dei ssDNA virus è spesso strutturato "funzionalmente", inoltre la presenza di *open reading frame* (ORF) sovrapposte potrebbe limitare ancora di più l'acquisizione di geni esogeni (Shackelton e Holmes, 2004). È anche possibile che alcuni virus a DNA più piccoli, avendo un tasso di mutazioni vicino a quello degli RNA virus (Shackelton *et al.*, 2005), siano soggetti alla soglia di errore che, come è stato spiegato, impone un limite di grandezza del genoma (Holmes, 2003).

1.3.2 Trasferimento genico orizzontale da altri patogeni

Così come possono acquisire geni dell'ospite, i virus a DNA ad ampio genoma possono acquisire geni attraverso la ricombinazione tra genomi virali e la duplicazione genica. I geni virali possono essere classificati come geni di base (principali) o geni genere- o specie-specifici. I geni di base sono conservati fra tutti i membri di una famiglia ed erano già presumibilmente presenti in quelli della famiglia dell'ultimo antenato comune. Al contrario, i geni genere- e specie-specifici sono stati acquisiti successivamente all'evoluzione di ogni genere specie virale. Nella maggior parte dei DNA virus a grande genoma, i geni di base sono localizzati nella parte centrale del genoma mentre i geni genere e specie-specifici si ritrovano nelle porzioni terminali. I primi solitamente svolgono funzioni generali come la replicazione e l'incapsidazione, mentre gli ultimi sono la causa di interazioni uniche virus-ospite, responsabili della modulazione del sistema immunitario dell'ospite, e sono quelli che più verosimilmente sono stati acquisiti in tempi più recenti (Davison *et al.*, 2003; Gubser *et al.*, 2004; Koonin *et al.*, 2001).

Il trasferimento orizzontale tra virus, che risulta dalla ricombinazione fra virus co-infettanti la stessa cellula, è responsabile di questa acquisizione genica. In accordo con la teoria modulare dell'evoluzione, nuovi virus possono essere il risultato della combinazione di elementi virali pre-esistenti, presenti all'interno delle cellule in seguito ad infezione o inseriti nel genoma cellulare come virus latenti (Bamford, 2003). Il trasferimento di geni è un processo frequentemente osservato fra batteriofagi mentre è ancora da chiarire l'incidenza di questo fenomeno nell'evoluzione dei DNA virus degli eucarioti. La rapida evoluzione delle proteine virali rappresenta il motivo per il quale il trasferimento genico tra virus è più difficile da stabilire; ad ogni modo, casi evidenti di questo processo possono essere rilevati dall'analisi comparativa delle sequenze proteiche dei grandi DNA virus. In particolare, è stato osservato, che diversi geni degli entomopoxvirus, degli iridovirus degli insetti e dei baculovirus sono correlati l'uno con l'altro, indicando un ripetuto scambio genico tra i diversi virus degli insetti. Plausibilmente, quando un gene garantisce un maggiore adattamento in un determinato ospite o tipo cellulare, c'è la possibilità che questo gene possa essere utile ad altri virus che infettano lo stesso ospite (Iyer *et al.*, 2006). Un esempio di questo processo è derivato dall'analisi del genoma del fowlpoxvirus (FPV), prototipo virale del genere *Avipoxvirus*, famiglia *Poxviridae*, che infetta polli e tacchini. Nel genoma di FPV sono stati identificati geni che potrebbero derivare dal trasferimento genico da altri virus. Ad esempio, il gene FPV063 è un ortologo della proteina non strutturale (NS-S) di bunyavirus, un RNA virus a filamento negativo appartenente alla famiglia *Bunyaviridae* in grado di infettare i polli, che potrebbe essere stato acquisito da FPV durante la co-infezione in fase di retrotrascrizione del gene NS-S. Questa proteina non strutturale è espressa dal segmento S del genoma virale del bunyavirus e sembra avere una funzione di antagonista dell'interferone. Il gene FPV217, codificante per una proteina non caratterizzata, sembra essere stato incorporato da una fonte baculovirus-like (Iyer *et al.*, 2006). Ancora, il rilevamento di omologhi strettamente correlati nei generi di altre due famiglie, come quelli trovati in

alcuni *Adenoviridae* e *Herpesviridae*, supporta l'azione del trasferimento genico (Davison *et al.*, 2003).

1.4 Evoluzione dei Poxvirus

La famiglia *Poxviridae* rappresenta un gruppo di grandi virus a DNA in grado di infettare numerose specie di vertebrati ed invertebrati e responsabili di patologie negli animali e nell'uomo. I poxvirus replicano nel citoplasma cellulare e possiedono un genoma costituito da un DNA lineare a doppio filamento di dimensioni variabili da 130 a 360 kb che consiste quasi completamente di sequenze geniche codificanti, prive di introni. Per adattarsi al loro stile di vita citoplasmatico, questi virus codificano numerose proteine coinvolte nella replicazione del DNA, nella sintesi dell'mRNA e alcuni fattori responsabili della virulenza (Moss, 2001). Il genoma contiene circa 150 geni, dei quali solo una parte è comune a tutti i generi virali. Inoltre, i poxvirus presentano una percentuale di guanina e citosina (G+C) che varia da un 64% nei Parapoxvirus ad un 25% nei Capripoxvirus. Nella maggior parte dei genomi di questi virus, i geni sono organizzati in gruppi che vengono trascritti nella stessa direzione probabilmente per ridurre collisioni tra i complessi di trascrizione. Considerando il genoma diviso in quarti, si può affermare che i geni collocati nel primo e nell'ultimo quarto vengono trascritti in direzione di ciascuna regione terminale, mentre i due quarti centrali sono trascritti verso il centro del genoma.

I poxvirus rappresentano un antico gruppo di patogeni intracellulari, le loro elevate dimensioni, il loro complesso genoma e la loro capacità di replicare nel citoplasma, in maniera indipendente dal nucleo cellulare, ha fatto ipotizzare che questi virus derivino da agenti microbici extracellulari che si sono evoluti adattandosi ad un più sicuro parassitismo intracellulare. L'origine molto antica dei virus appartenenti alla famiglia *Poxviridae* si riflette nella loro divisione in due sottofamiglie, (ChPV) che include virus in grado di infettare i vertebrati ed *Entomopoxvirinae* (EnPV) alla quale appartengono virus che infettano gli insetti. Nella sottofamiglia *Chordopoxvirinae* sono compresi otto generi: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*,

Molluscipoxvirus, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, mentre la sottofamiglia *Entomopoxvirinae* comprende tre generi: *Entomopoxvirus* A, *Entomopoxvirus* B, *Entomopoxvirus* C. I membri di ciascun genere sono correlati dal punto di vista genomico ed antigenico oltre a possedere una morfologia simile.

Sebbene l'organizzazione genomica, la replicazione, lo spettro d'ospite e la patogenesi dei poxvirus siano state ampiamente studiate (Moss, 2001), la conoscenza riguardo i meccanismi evolutivi di questi virus è ancora limitata (Gubser *et al.*, 2004).

McLysaght e collaboratori (2003) hanno proposto che l'evoluzione dei poxvirus sia stata un processo di adattamento caratterizzato da frequenti eventi di perdita e acquisizione di geni che hanno permesso la co-evoluzione del virus con il proprio ospite specifico. La cattura o trasferimento orizzontale di geni dall'ospite al virus è considerato un meccanismo fondamentale e rappresenta un evento di particolare interesse dato che aumenta la virulenza di questi virus attraverso la codifica di omologhi del sistema immunitario dell'ospite e l'interferenza con questo (Barry e McFadden, 1997; Ochman *et al.*, 2000). Un altro meccanismo di acquisizione di nuovi geni responsabile della rapida evoluzione dei poxvirus è rappresentato dalla ricombinazione omologa. Questo processo è stato ampiamente dimostrato e ben documentato *in vitro*, fra diversi genomi virali e DNA plasmidico (Panicali e Paoletti, 1982; Mackett *et al.*, 1982) o mediante ricombinazione intramolecolare (Ball, 1987), e *in vivo*, attraverso la ricombinazione intermolecolare fra isolati di una stessa specie (Upton *et al.*, 1988; Gershon *et al.*, 1989).

Negli ultimi anni, il numero di sequenze genomiche disponibili è aumentato considerevolmente, permettendo studi più approfonditi sull'evoluzione di questi virus, attraverso la comparazione della grandezza dei genomi, del numero di geni conservati e di quelli unici e la loro posizione all'interno del genoma (Gubser *et al.*, 2004). Dall'analisi è emerso che l'organizzazione generale del genoma dei Chordopoxvirus e il suo contenuto sono conservati. La regione centrale del genoma contiene 88 geni che sono presenti in tutti i Chordopoxvirus e che codificano principalmente per fattori coinvolti nella replicazione, nella trascrizione e nel

metabolismo degli acidi nucleici (Delhon *et al.*,2004; Upton *et al.*,2003). Al contrario, i geni che si ritrovano nelle regioni terminali variano fra i diversi generi, fra specie all'interno di un genere e anche tra ceppi della stessa specie (Gubser *et al.*,2004). Molti di questi geni non sono essenziali per la replicazione in coltura cellulare, ma codificano per proteine responsabili dello spettro d'ospite, della virulenza o dell'interazione con il sistema immunitario dell'ospite (Moss, 2001). La disponibilità di sequenze genomiche complete delle specie animali ospiti ha reso inoltre possibile l'individuazione di geni omologhi a quelli virali (Hughes e Friedman, 2005). Infatti, numerosi studi evidenziano l'acquisizione nel tempo di geni cellulari da parte dei poxvirus e l'incorporazione all'interno del loro grande genoma. In base all'organismo ospite specifico e al sito primario o esclusivo di replicazione virale, i diversi poxvirus si sono evoluti per poter utilizzare strategie che influenzano la patogenesi nell'ospite o nel tessuto colpito. L'acquisizione di nuovi geni, da parte dei poxvirus, costituisce la base della loro evoluzione, che ha portato nel tempo, all'adattamento di ciascuna specie virale al proprio reservoir naturale. La co-evoluzione dei poxvirus con i sistemi immunitari delle specie di mammiferi ospiti ha portato all'acquisizione e allo sviluppo di omologhi virali di geni cellulari immunomodulatori coinvolti nella risposta dell'ospite all'infezione (Smith *et al.*,1997; McFadden *et al.*,1998). Sono stati introdotti termini come “virocettori” per recettori di citochine virali solubili (Upton *et al.*,1991) o “modificatori della risposta citochinica” per i geni immunomodulatori dei poxvirus (Hu *et al.*,1994; Pickup, 1994). In particolare, i geni della virulenza codificano fattori che hanno la funzione di sovvertire la risposta antivirale messa in atto dall'ospite andando ad interferire con l'apoptosi, la presentazione e il riconoscimento antigenico, le funzioni dell'interferone e i segnali mediati dalle citochine. Il termine “omologo poxvirale del gene cellulare” è definito come segue: geni virali di poxvirus dei vertebrati che hanno omologie di sequenze aminoacidiche significative con le proteine cellulari o motivi aminoacidici altamente conservati, ma che non sono essenziali per la replicazione nelle cellule o in coltura cellulare. Le basi necessarie per gli studi comparativi sugli

omologhi poxvirali di geni cellulari sono le sequenze nucleotidiche del genoma dei poxvirus. Gli Orthopoxvirus sono i membri della famiglia *Poxviridae* più studiati e conosciuti e, di conseguenza, rappresentano l'oggetto della maggior parte degli studi sui meccanismi evolutivi (Bugert e Darai, 2000).

Esistono diversi approcci allo studio dei meccanismi che possono essere utilizzati in congiunzione per un'analisi più efficace per dimostrare il trasferimento genico orizzontale (Lawrence e Ochman, 2002). Analisi filogenetiche che includano sequenze sia virali che di organismi cellulari possono fornire un'indicazione della cattura di geni, quando il gene virale è raggruppato con omologhi dell'ospite o con organismi correlati all'ospite. Una composizione di basi atipica per un determinato gene, per esempio un alto contenuto in GC che differisca significativamente da quello della maggior parte di geni nel genoma, può fornire un'altra evidenza che il trasferimento orizzontale ha avuto luogo recentemente e questo tipo di approccio è stato utilizzato per verificare regioni derivate dall'ospite nei poxvirus (DaSilva e Upton, 2005). Inoltre, un pattern misto di presenza e assenza di un particolare gene in un gruppo di organismi strettamente correlati può essere un'ulteriore indicazione di trasferimento orizzontale del gene in esame, ma può anche essere spiegato con un'origine ancestrale del gene e con la sua successiva perdita in qualche genoma virale (Bratke e McLysaght, 2008).

Dall'analisi di Bratke e McLysaght (2008) sono state riscontrate almeno 9 famiglie di proteine derivate da trasferimento genico nel genoma dei poxvirus e coinvolte in meccanismi di difesa dell'ospite. Queste comprendono il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I, le interleuchine 10 (IL-10), 24 (IL-24) e 18 (IL-18), il recettore per l'interferone gamma e il recettore II per il fattore di necrosi tumorale (Hughes e Friedman, 2005). Recenti studi hanno dimostrato la presenza in tutti i Parapoxvirus del fattore di crescita endoteliale (VEGF) dei mammiferi (Fleming *et al.*, 1997; Mercer *et al.*, 2002) e in alcune specie di omologhi dell'interleuchina 10 (IL-10).

L'IL-10 è una citochina multifunzionale che reprime l'infiammazione, la risposta antivirale e ha altre funzioni cellulari. Inibisce l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche e quindi riduce la loro abilità di presentare l'antigene e inibisce la sintesi di citochine mediante linfociti T e NK. Omologhi dell'IL-10 sono stati riscontrati in molti virus diversi (Vieira *et al.*, 1991; Fleming *et al.*, 1997; Kotenko *et al.*, 2000). L'IL-10 virale riveste un importante ruolo nello sviluppo dell'immunità acquisita da orf virus nell'uomo (Chan *et al.*, 2006) e da vaccinia nei topi (Kurilla *et al.*, 1993). L'origine di omologhi virali all'IL-10 è stata studiata ed è stato suggerito che il virus orf abbia catturato il gene dal genoma degli ovi-caprini dato l'alto livello di identità aminoacidica (80%) con l'IL-10 delle pecore (Fleming *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 2002), infatti la regione C-terminale, che comprende i due terzi della proteina virale, si è dimostrata identica a quella ovina (Fleming *et al.*, 1997).

Il fattore di crescita endoteliale (VEGF) è un mitogeno con alta affinità per le cellule endoteliali che ha l'abilità di indurre permeabilità vascolare (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Il VEGF svolge un importante ruolo nella vasculogenesi e nell'angiogenesi durante lo sviluppo embrionale e nell'angiogenesi è associato a numerose condizioni patologiche, inclusa la formazione di tumori (Senger *et al.*, 1983; Risau, 1997; Breier, 2000). La famiglia dei VEGF mammiferi consiste di 5 membri, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e il fattore di crescita placentare (PlGF). Sono tutti secreti come glicoproteine omodimere che condividono un'identità aminoacidica da 30 a 45%. Essi esercitano la loro attività biologica attraverso una famiglia di recettori tirosin chinasi, recettore VEGF-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 e VEGFR-3 (Clausen, 2000). Il VEGF-A lega e attiva sia VEGFR-1 che VEGFR-2, ma non VEGFR-3, mentre PlGF e VEGF-B legano solo VEGFR-1. IL VEGF-C e il VEGF-D legano sia il VEGFR-2 che il VEGFR-3 ma non il VEGFR-1.

Il gene codificante per questo fattore di crescita è stato ritrovato in tutte e quattro le specie appartenenti al genere Parapoxvirus, orf virus (ORFV), pseudocowpoxvirus (PCPV), virus della stomatite papulosa del bovino (BPSV) e parapoxvirus del cervo della Nuova Zelanda (PVNZ). In tutti VEGF isolati da orf virus è stata riscontrata

l'esistenza del motivo funzionale così detto "cystine-knot motif", che è una successione di 8 residui cisteinici coinvolti in ponti disolfuro intra e intercatena, e la presenza di un motivo unico conservato in tutti i VEGF virali, ovvero il susseguirsi di treonina e prolina nel terminale carbossilico della sequenza ("threonine/proline-rich motif), che insieme giustificano l'inserimento di questo fattore virale nella famiglia dei VEGF, con il nome di VEGF-E (Meyer *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 1999).

Diversi studi sono stati condotti per caratterizzare a livello molecolare e funzionale le quattro proteine virali. I risultati di queste indagini hanno evidenziato un'elevata divergenza di sequenza fra i diversi VEGF, in particolare l'orf virus presenta due varianti, VEGF_{NZ2} e VEGF_{NZ7}, che mostrano una bassa identità di sequenza (41%) fra di loro (Lyttle *et al.*, 1994) mentre la correlazione di sequenza tra il VEGF del PCPV e il VEGF dell'ORFV_{NZ7} è risultata essere maggiore (61%) anche nelle sequenze immediatamente adiacenti al gene. E' solo in sequenze più lontane dal gene del VEGF che la correlazione tra NZ2 e NZ7 diventa più evidente. Queste evidenze hanno fatto ipotizzare che il ceppo NZ7 sia un ricombinante naturale fra i ceppi ORFV e PCPV e che i segmenti di DNA adiacenti al gene del VEGF del ceppo NZ7 siano derivati dal PCPV (Ueda *et al.*, 2003). La sovrapposizione dello spettro d'ospite dei parapoxvirus (Inoshima *et al.*, 2001; Robinson e Lyttle, 1992) potrebbe fornire un'opportunità per questi eventi di ricombinazione, già dimostrata per il virus del fibroma maligno del coniglio, derivato dalla ricombinazione genetica fra virus del fibroma di Shope e del mixoma virus (Block *et al.*, 1985). Per quanto riguarda il VEGF di BPSV, questo mostra una maggiore identità con il VEGF-A di mammifero (51%) rispetto agli altri VEGF di parapoxvirus (31- 46%). Saggi biologici hanno inoltre dimostrato che questo VEGF è funzionalmente più simile al VEGF-A dato che è in grado di legarsi al recettore VEGFR-1 oltre che al VEGFR-2 diversamente dagli altri VEGF virali che non sono in grado di legare il VEGFR-1. Questi dati suggeriscono che il VEGF del BPSV sia un intermedio fra il VEGF-A e gli altri VEGF dei parapoxvirus, sia dal punto di vista evolutivo che funzionale. Il significato evolutivo della divergenza di sequenza e di funzione tra il VEGF del BPSV e le

altre principali varianti dei parapoxvirus è ancora da chiarire. Un'ipotesi è che il VEGF del BPSV rappresenti un VEGF-like di mammifero più ancestrale che è stato sottoposto a pressione selettiva per perdere la capacità di legame al recettore VEGFR-1, o che derivi da un più recente e indipendente evento di ricombinazione tra un VEGF di mammifero ed il BPSV (Inder *et al.*,2007).

Altri geni probabilmente acquisiti mediante trasferimento sono la Glutazione perossidasi (GP) e la deossiribodipirimidina fotoliasi (DP). La GP virale protegge il virus e le cellule infette dal danno ossidativo conseguente all'interazione con il sistema immunitario (Moss *et al.*,2000). Le fotoliasi sono enzimi che catalizzano la riparazione del DNA danneggiato da UV. Nei poxvirus, la DP fotoliasi è coinvolta nella sopravvivenza del virus all'esterno della cellula ospite nell'intervallo fra le infezioni (Srinivasan *et al.*,2001). Insieme questi geni sono noti per aumentare la sopravvivenza del virus alla risposta immunitaria dell'ospite (IL-10) e al "danno ambientale" (GP e DP). È facile ipotizzare come essi siano particolarmente vantaggiosi per il virus, e il fatto che siano stati trasferiti con successo all'interno del genoma dei poxvirus supporta questa tesi (Bratke e McLysaght, 2008).

Non è ancora chiaro come una famiglia di DNA virus citoplasmatici che non entra nel nucleo e che mantiene la replicazione virale anche in cellule enucleate riesca ad acquisire copie di geni cellulari. Dal momento che il pool del DNA eucariotico cellulare è sequestrato nel nucleo, i virus a DNA citoplasmatici non possono accedere al template e all'apparato enzimatico teoricamente richiesto per il trasferimento genico basato sulla ricombinazione omologa. Nonostante la mancanza di meccanismi nucleari associati alla ricombinazione omologa intranucleare, un grande numero di geni omologhi a quelli cellulari sono stati identificati nel genoma di molti membri della famiglia dei poxvirus (Bugert e Darai, 2000). La mancanza di introni nei geni dei poxvirus suggerisce che il trasferimento genico dalla cellula al virus avviene nel citoplasma a livello di RNA. Shuman e colleghi hanno indagato le proprietà biochimiche della DNA ligasi del Vaccinia Virus (VAV) (Sekiguchi e Shuman, 1997). Dallo studio è emerso che questo enzima catalizza in maniera efficiente il

legame dell'RNA al DNA fornendo un possibile meccanismo per l'avvio della ricombinazione basata sull'RNA. Si suppone che il 3'-terminale di un mRNA cellulare possa essere covalentemente legato al DNA genomico del vaccinia virus dalla DNA ligasi. Questo richiederebbe una complementarità fra il 3'-OH terminale dell'mRNA e le sequenze dello stampo virale. Il filamento di mRNA viene poi copiato in cDNA sia dalla retrotrascrittasi dell'ospite che dalla stessa DNA polimerasi virale. È noto che "retro elementi" endogeni possano costituire una buona parte dei genomi eucariotici dell'ospite, di conseguenza la retrotrascrittasi potrebbe essere presente nel citoplasma delle cellule infettate dai poxvirus e quindi trascrivere copie di mRNA citoplasmatico che sarebbero poi soggette a ricombinazione da parte dell'apparato enzimatico del virus (Bugert e Darai, 2000). Questo rappresenta una via possibile di integrazione di geni dell'ospite nel genoma di questi virus e spiegherebbe la mancanza di introni negli omologhi dei poxvirus e nel genoma di tutti i virus che replicano a livello di citoplasma (Sekiguchi e Shuman, 1997).

Come già detto in precedenza, un altro fondamentale meccanismo di evoluzione nei poxvirus è la ricombinazione omologa. Inizialmente questo processo è stato dimostrato mediante l'analisi dei prodotti genetici dopo la co-infezione delle cellule con vaccinia virus differenti (Fenner, 1959; Fenner e Comben, 1958). In seguito, la ricombinazione è stata dimostrata dopo trasfezione del DNA in cellule infettate da poxvirus (Nakano *et al.*, 1982) ed è stata utilizzata per introdurre DNA esogeno nel vaccinia virus per l'espressione di alcune proteine (Mackett *et al.*, 1982; Panicali e Paoletti, 1982). Più recentemente sono state condotte indagini molecolari in cui i genomi virali hanno mostrato di processare rapidamente sequenze ripetute inserite all'interno del genoma formando prodotti di ricombinazione inter e intramolecolari (Ball, 1987). L'analisi dei polimorfismi di restrizione (RFLP) rivela che i genomi dei poxvirus contengono delle aree di instabilità (Cottone *et al.*, 1998) localizzate a livello delle ripetizioni terminali inverse (ITR). Queste regioni sono sottoposte a delezione, reiterazione e ri-duplicazione di frammenti più piccoli ed anche ad inserzione di sequenze di DNA più grandi mediante ricombinazione intragenomica durante la

replicazione virale (Shchelkunov e Totmenin, 1995; Kriajevska *et al.*,1994). Sono stati studiati molti aspetti della ricombinazione dei poxvirus e le sue relazioni con la replicazione ed è emerso che la ricombinazione richiede prodotti di geni precoci, mentre la risoluzione dei concatenameri genomici per la replicazione richiede prodotti di geni tardivi (Merchlinsky, 1989) e che il processo di scambio genico è altamente preciso (Ball, 1995). È inoltre stato osservato che la DNA ligasi e la DNA polimerasi sono coinvolte nella ricombinazione ma con funzioni indipendenti dalla replicazione (Colinas *et al.*,1990).

Gli eteroduplex di DNA possono rappresentare gli intermedi chiave nella produzione di molecole ricombinanti. Questa idea è stata in origine dedotta dagli esperimenti con i fagi T (Levinthal, 1954) e poi incorporati nel modello di ricombinazione di Whitehouse (1963) e Holliday (1964) nello sforzo di razionalizzare alcune proprietà dei ricombinanti ottenuti dalla meiosi dei funghi. Da quel momento in poi, la maggior parte dei modelli proposti richiede la formazione di eteroduplex di DNA, di varia lunghezza, durante il processo di ricombinazione (Nash *et al.*,1981; Szostak *et al.*,1983). La diversità tra gli organismi che catalizzano la formazione di eteroduplex ha portato ad ipotizzare che queste molecole eteroduplex si possano essere formate anche durante la replicazione e la ricombinazione dei virus dei mammiferi. È noto da più di 30 anni che i virus possono ricombinare (Wildy, 1955; Fenner e Comben, 1958), ma si conosce ancora poco sul meccanismo di ricombinazione virale e ad oggi un unico esperimento con l'herpes simplex virus ha dimostrato la produzione di intermedi eteroduplex durante la ricombinazione virale deriva da esperimenti (Brown e Ritchie, 1975).

Fisher e collaboratori (1991) hanno investigato il meccanismo tramite il quale i poxvirus ricombinano. Questi virus hanno un genoma di grandi dimensioni (>150 kb) che replica quasi autonomamente nel citoplasma delle cellule infette e catalizza ad alte frequenze la replicazione e la ricombinazione in una maniera sequenza-indipendente (DeLange e McFadden, 1986; Evans *et al.*,1988). I risultati di questo studio hanno suggerito che, le molecole eteroduplex si formano durante la

progressione dell'infezione, e ipotizzano due meccanismi base tramite i quali si formano i ricombinanti nei poxvirus. Una possibilità è che la formazione delle molecole eteroduplex sia associata al crossing-over responsabile della generazione dei ricombinanti. Questa associazione è stata ben documentata nei funghi e nei fagi ed è compatibile con l'efficienza di ricombinazione plasmide-poxvirus documentata da diversi autori (Ball, 1987; Spyropoulos, 1988). Un'altra ipotesi è che i tratti eteroduplex siano corti (Parks e Evans, 1991) e si formino con alta frequenza, la ricombinazione sarebbe quindi legata a trasferimenti multipli associati alla replicazione siano responsabili della formazione della ricombinazione. Scambi di elementi genetici fra diversi poxvirus, la cosiddetta ricombinazione intergenomica, sono stati osservati e documentati, e presumibilmente avvengono durante la replicazione dei due diversi virus in cellule co-infettate (Ball, 1987; Bedson e Dumbell, 1964; Chernos *et al.*, 1985). La generazione, mediante ricombinazione genetica, di un poxvirus con patogenicità modificata è già stata dimostrata per il genere Leporipoxvirus nel quale il virus ricombinante maligno del coniglio (MRV) è il prodotto della ricombinazione tra il virus del fibroma di Shope (SFV) e il mixoma virus (MXV), entrambe appartenenti allo stesso genere. Nelle prime fasi delle infezioni MRV induce un fibroma che è indistinguibile da quello dell'SFV, tuttavia nelle fasi tardive il tumore generalizza e metastatizza con un profilo invasivo simile a quello dell'MXV (Strayer e Sell, 1983; Strayer *et al.*, 1983). MRV ha uno spettro d'ospite più ampio rispetto all'SFV, simile a quello del mixoma virus; la digestione con enzimi di restrizione del DNA genomico di MRV mostra una stretta relazione sebbene non identica con il mixoma virus (Strayer *et al.*, 1983, 1987). Esperimenti di Southern blotting, in cui il DNA da analizzare viene digerito con enzimi di restrizione e dopo corsa elettroforetica, trasferito su membrane di nitrocellulosa per la successiva ibridazione con sonde specifiche di DNA, hanno confermato che l'MRV è un ricombinante naturale fra l'SFV e il mixoma virus (MYXV) e hanno mostrato che il suo genoma è composto prevalentemente di sequenze derivate dal MYXV, con meno di 10 kb dell'MRV derivato dalle ripetizioni terminali invertite (TIR) e sequenze

uniche adiacenti dell'SFV (Block *et al.*,1985). Apparentemente, la sostituzione di queste piccole regioni del genoma del mixoma virus con sequenze correlate derivate dall'SFV sarebbero sufficienti a produrre le differenze fenotipiche osservate fra mixoma e MRV (Upton *et al.*,1988; Block *et al.*,1985; Upton e McFadden, 1986).

Gershon e collaboratori (1989) hanno analizzato ceppi isolati di Capripoxvirus mediante digestione con enzimi di restrizione suddividendoli in 4 tipi: isolati di tipo 1 derivanti solo da pecora; tipo 2 solo da capra; tipo 3 da pecora, capra e vacca ma ristretti all'Africa; tipo 4 da capra e da pecora provenienti dall'Africa e dal Medio Oriente. Dalle analisi condotte, gli Autori suggeriscono che gli isolati di tipo 4 Yemen goat-1 (YG-1) sono derivati dalla ricombinazione genetica fra gli isolati di tipo 2 Iraq goat-1 (IrG-1) e 3 Kenya cattle-1 (KC-1). Tre dei quattro isolati studiati sono ceppi di campo derivati direttamente da animali infetti, il quarto isolato, IrG-1, è un ceppo vaccinale. Questa ricombinazione genetica fra genomi di poxvirus, avvenuta in natura, evidenzia un possibile rischio che può derivare dall'uso di vaccini basati sui poxvirus. La ricombinazione genetica fra questi tipi di vaccino e un ceppo wild-type potrebbe generare un nuovo virus con caratteristiche di patogenicità e virulenza diverse.

Recentemente, l'analisi filogenetica condotta da Gubser e collaboratori (2004) a partire da sequenze di proteine di virus appartenenti a diversi, ha evidenziato possibili eventi di ricombinazione fra specie diverse all'interno di uno stesso genere. In particolare, sembra che questo meccanismo evolutivo sia avvenuto all'interno delle regioni destre del genoma tra il cowpoxvirus, ceppo Brighton Red (BR) e il virus ectromelia, ceppo Naval.

Nonostante il meccanismo di ricombinazione dei poxvirus resti incerto, è sicuramente diverso da quello di altri virus dei mammiferi come SV 40 e adenovirus. Questi ultimi virus replicano infatti secondo meccanismi molto diversi dai poxvirus (Challberg e Kelly, 1989) e, come hanno indicato Volkert e Young (1983), la ricombinazione di questi virus potrebbe dipendere da prodotti dei geni dell'ospite. Al contrario, i poxvirus replicano in strutture isolate nel citoplasma delle cellule infette

che gli potrebbero garantire protezione da enzimi nucleari di riparazione con l'opportunità di sviluppare vie diverse per la generazione di ricombinanti (Fisher *et al.*,1991).

1.5 Metodi sperimentali per lo studio delle ricombinazioni

Come già discusso in precedenza, l'evoluzione dei virus a DNA è avvenuta attraverso tre meccanismi principali: mutazioni durante la replicazione del DNA, acquisizione di geni dall'ospite, e ricombinazione fra ceppi o specie diverse co-infettanti lo stesso ospite. Quest'ultima è considerata un'importante fonte di variabilità genetica poiché consente combinazioni di geni presenti in virus diversi e quindi l'insorgenza di nuove varianti con patogenicità e virulenza differenti.

Sono stati sviluppati una serie di metodi per lo studio delle ricombinazioni che comprendono saggi *in vitro* ed *in vivo*, co-infezione di substrati permissivi o specie animali recettive, caratterizzazione molecolare delle specie virali isolate ed analisi filogenetiche mediante algoritmi e programmi specifici, che possono essere applicati contemporaneamente per un'analisi più completa ed accurata. La maggior parte degli studi *in vitro* ed *in vivo* sulle ricombinazioni dei virus a DNA di grandi dimensioni sono stati condotti sui membri della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (Schynts *et al.*,2003; Meurens *et al.*,2004; Thiry *et al.*,2005). Al riguardo, sono state messe a punto varie tecniche per l'analisi di ricombinazioni intra ed interspecifiche che hanno permesso di individuare diversi fattori fondamentali in grado di influenzare gli eventi di ricombinazione e che devono essere tenuti in considerazione durante il disegno sperimentali di prove *in vivo* e *in vitro*. Questi possono essere suddivisi in tre categorie: fattori dell'ospite, della cellula e virali (Figura 1).

Fra i fattori dell'ospite sono importanti la risposta immunitaria che può limitare la popolazione virale in modo tale da prevenire le infezioni multiple delle cellule e i fattori genetici che possono interferire con l'entrata delle particelle virali. Inoltre di primaria importanza è la distanza del sito di inoculazione dei due diversi virus. Si è osservato che la ricombinazione avviene di preferenza quando alte dosi di entrambe i

virus sono somministrate nello stesso sito (Schynts *et al.*,2003). I fattori cellulari da considerare per la riuscita della ricombinazione sono la produzione di interferone e altre chemochine, la sensibilità e la permissività delle cellule target e il loro ciclo cellulare (Meurens *et al.*,2004). I fattori virali sono diversi e forse i più importanti, alcuni dei quali strettamente correlati a quelli cellulari. In particolare, studi *in vivo* hanno dimostrato che la ricombinazione tra due ceppi virali è dose-dipendente (Glazenburg *et al.*,1994). Alte dosi infettanti aumentano il tasso di ricombinazioni ed evitano, quando simili tra i due ceppi virali, la dominanza di un virus parentale sull'altro (Dangler *et al.*,1994). L'intervallo di tempo tra l'inoculazione del primo e del secondo ceppo virale può influenzare l'esito delle ricombinazioni. Dal momento che la penetrazione e la cinetica di replicazione dei virus parentali possono essere molto diverse, si può ipotizzare una certa influenza di questi parametri sugli eventi di ricombinazione. Solo infezioni simultanee o molto ravvicinate nel tempo con due virus parentali diversi, porta alla produzione di notevoli quantità di virus ricombinante *in vitro* (Murens *et al.*,2004). L'omologia genetica tra i due stipiti virali è un altro importante parametro: un alto grado di omologia di sequenza favorisce la ricombinazione (Thiry *et al.*,2005). Infine la virulenza: una differenza in termini di virulenza ed invasività fra due ceppi co-infettanti influenza il decorso temporale della replicazione virale e della diffusione a favore del ceppo più virulento, indipendentemente dalla dose infettante (Kim *et al.*,1999).

Per caratterizzare ulteriormente i ceppi derivanti da eventi di ricombinazione possono essere applicate tecniche di biologia molecolare che sfruttano enzimi di restrizione e sonde specifiche per i genomi parentali. Nell'analisi delle mappe di restrizione, i genomi vengono confrontati a gruppi di tre e per ognuno di questi gruppi le mappe di restrizione vengono allineate l'una con l'altra. I siti di restrizione conservati fra tutti e tre i membri di ogni gruppo vengono rimossi, lasciando nella mappa solo i siti non conservati. Questi siti possono essere presenti in un genoma e assenti negli altri o viceversa. Quindi, all'interno di un gruppo, coppie di genomi possono condividere sia la presenza che l'assenza di ciascun sito non conservato. Un genoma che deriva da

ricombinazione fra due genomi parentali distinti, dovrebbe possedere alcune regioni sub-genomiche omologhe ad un progenitore e altre omologhe all'altro progenitore.

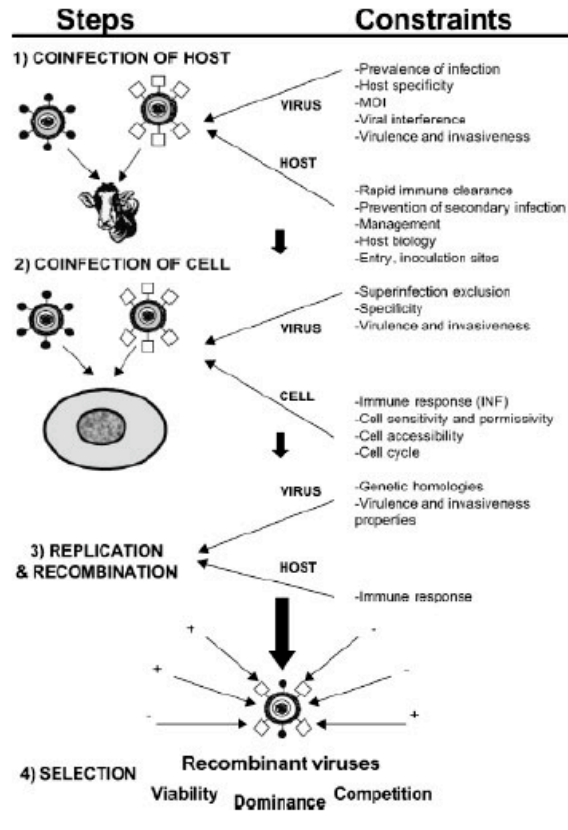


Figura 1. Produzione di ricombinanti vitali e possibili limitazioni. I fattori virali e cellulari possono bloccare le ricombinazioni limitando o prevenendo il completamento di uno dei quattro step (Thiry *et al.*,2005).

Una delle tecniche che sfruttano sonde specifiche per il riconoscimento di genomi ricombinanti è il Southern Blotting. Un esempio della sua applicazione e della sua utilità è rappresentato dallo studio di Upton e collaboratori (1988), che ha permesso di identificare con precisione le sequenze di DNA del virus del fibroma di Shope (SFV) trasferite al mixoma virus (MXMV) durante la creazione del poxvirus tumorigenico ricombinante, il virus del fibroma maligno del coniglio (MRV).

Data l'importanza delle ricombinazioni nell'analisi evolutiva delle sequenze e nel riarrangiamento della variabilità genetica, è importante avvalersi di metodi

bioinformatici in grado di identificarle per individuare i rapporti tra le unità ricombinanti e per valutare il loro impatto sulla ricostruzione della storia evolutiva virale (Posada *et al.*, 2002).

Per poter riconoscere le ricombinazioni fra le sequenze di acidi nucleici, devono essere soddisfatti alcuni criteri. Per prima cosa, ci deve essere una variabilità genetica sufficiente fra gli stipti virali per essere in grado di distinguere gli scambi genetici fra loro e separarli dalla variabilità che può derivare dall'accumulo di mutazioni puntiformi. In Secondo luogo, nella maggior parte dei casi, vengono richiesti segmenti genici relativamente lunghi per l'analisi. Infine, una divergenza troppo elevata delle sequenze dopo la ricombinazione può rendere difficile rilevare questo evento poiché la ricombinazione sarà mascherata dall'accumulo di mutazioni puntiformi (Salminen, 2004).

Durante gli ultimi 15 anni sono stati sviluppati numerosi metodi bioinformatici per verificare la presenza di ricombinazione, per identificare gli individui parentali e quelli ricombinanti e per mappare il punto di rottura della ricombinazione. Queste tecniche differiscono notevolmente nell'approccio e nell'applicabilità, ma possono essere classificate in 5 categorie: metodi basati sulla somiglianza, sulla distanza, sulla topologia filogenetica, sulla compatibilità e sulla distribuzione delle sostituzioni nucleotidiche. I metodi basati sulla "somiglianza" ipotizzano che una data sequenza, denominata *query*, presente all'interno di un set di sequenze, sia più simile ai virus dai quali si è evoluta più recentemente, mediante l'accumulo di mutazioni puntiformi. Con questo approccio viene analizzata la somiglianza della sequenza *query* rispetto a un set di sequenze di riferimento per tutta la sua lunghezza utilizzando una finestra a scorrimento; la sequenza mostrerà la più alta somiglianza ai membri dello stesso lineage evolutivo e la più bassa somiglianza a quelli meno correlati (Salminen, 2004). I metodi basati sulla "distanza" sono altamente efficienti e utilizzano un approccio basato sulla "stima della divergenza genetica" fra le sequenze analizzate mediante l'utilizzo di una finestra che scorre lungo tutto l'allineamento (Weiller, 1998). I "metodi filogenetici" deducono la ricombinazione quando i rapporti filogenetici di

regioni diverse del genoma mostrano una topologia discordante o quando geni ortologi di differenti specie clusterizzano insieme. Quando la comparazione di sequenze adiacenti produce un'incongruenza topologica, questa può essere il frutto di una ricombinazione (Holmes *et al.*, 1999; Martin and Rybicki, 2000). Questi metodi sono, attualmente, i più utilizzati per rilevare le ricombinazioni (Posada *et al.*, 2002). I metodi basati sulla "compatibilità" verificano le incongruenze filogenetiche in base alla parsimonia dei siti informativi identificati all'interno di un allineamento (Jakobsen *et al.*, 1997), intendendo per parsimonia il principio per cui una buona approssimazione della reale storia evolutiva di un gruppo di sequenze è data dal set di dati che hanno il numero inferiore di sostituzioni e che quindi minimizzano la i rapporti evolutivi intercorsi fra essi. Infine i metodi basati sulla "distribuzione delle sostituzioni" individuano regioni all'interno di un set di sequenze che sono significativamente simili o che raggruppano insieme, ed il livello di significatività è basato su una distribuzione statistica delle sostituzioni nucleotidiche (Maynard-Smith and Smith, 1998; Worobey, 2001).

Tutti questi metodi differiscono nel loro rendimento a seconda della quantità di eventi ricombinanti presenti all'interno delle sequenze analizzate, della diversità genetica dei dati e del tasso di variabilità tra i siti. Gran parte di queste tecniche sono efficienti ed hanno una buona capacità di identificare le ricombinazioni soprattutto quando questi eventi hanno elevati tassi di frequenza. Inoltre, la maggior parte di questi metodi, presenta performance migliori con alti livelli di divergenza fra le sequenze, probabilmente perché in questi casi ci sono più informazioni disponibili per riconoscere l'impronta della ricombinazione. Una diversità nucleotidica minima del 5% sembra essere necessaria per avere maggiore possibilità di individuare questi processi, e diversi eventi di ricombinazione sono necessari per dedurre la loro presenza. È inoltre, molto importante tenere presente che per quanto riguarda l'effetto delle ricombinazioni sulla genealogia, esistono tre tipi di eventi ricombinanti: quelli che non hanno effetti sulla lunghezza delle braccia dell'albero filogenetico, eventi

che modificano la lunghezza ma non la topologia dell'albero filogenetico ed infine eventi che cambiano anche la topologia (Wiuf *et al.*,2001).

1.5.1 Programmi per l'analisi delle ricombinazioni

1.5.1.1 SIMPLOT

Una delle applicazioni più versatili per lo studio delle ricombinazioni è il software Simplot ideato da Stuart Ray (1998) (Lole *et al.*,1999). Questo programma è in grado di leggere un allineamento di sequenze ed eseguire un tracciato di somiglianza/dissomiglianza della sequenza denominata *query*, nei confronti delle altre che si stanno analizzando. Simplot calcola e grafica la percentuale di identità della sequenza query rispetto alle sequenze di riferimento all'interno di una finestra che scorre lungo tutto l'allineamento (Figura 2). Diversi parametri dell'analisi possono essere variati, quali la grandezza della finestra di analisi, l'utilizzo della correzione della distanza evolutiva, i plot di somiglianza/dissomiglianza ed i grafici possono essere esportati in diversi formati.

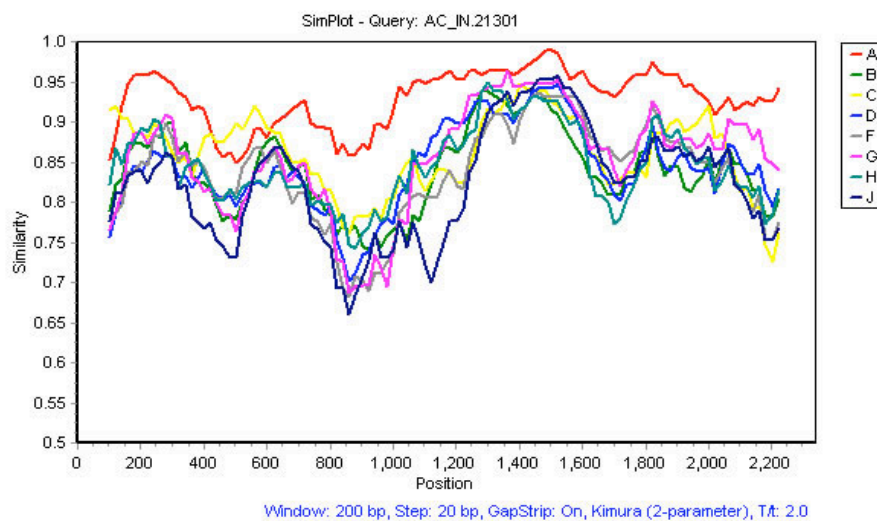


Figura 2. Finestra di Simplot che rappresenta il tracciato di similarità originato dall'analisi delle sequenze (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/simplot/Screenshots/images/Similar.jpg>).

Il programma permette la mappatura precisa del punto di rottura di ricombinazione riportando le posizioni nell'allineamento. Un'altra proprietà utile di Simplot è

l'abilità di esportare segmenti di un allineamento su file separati, che possono poi essere utilizzati per l'analisi filogenetica e per il controllo del punto di rottura mappato. Simplot può anche eseguire il metodo Bootscanning (Salminen *et al.*, 1995) per mappare il punto di rottura (Fig. 3). In questo tipo di analisi, i rapporti filogenetici delle sequenze in ogni finestra sono calcolati utilizzando il ri-campionamento "bootstrap" e vengono annotati i valori di bootstrap del cluster contenente la sequenza query e le sequenze di riferimento. Il vantaggio del metodo Bootscanning è che lo spostamento da un alto valore di bootstrap ad uno basso è molto pronunciato. In situazioni in cui la ricombinazione è avvenuta in tempi recenti, il relativo valore di bootstrap si sposterà rapidamente dal 100% allo 0% per uno dei due lineage parentali e dallo 0% al 100% per l'altro. Questo consente una mappatura più precisa del punto di rottura. Ad ogni modo, in un recente studio di simulazione, Posada e Crandall (2001) hanno mostrato che i metodi come il bootscanning, ovvero basati sulla ricostruzione filogenetica, non riescono ad individuare la ricombinazione quando questo tipo di eventi è raro e la variabilità nucleotidica nel set di dati è bassa.

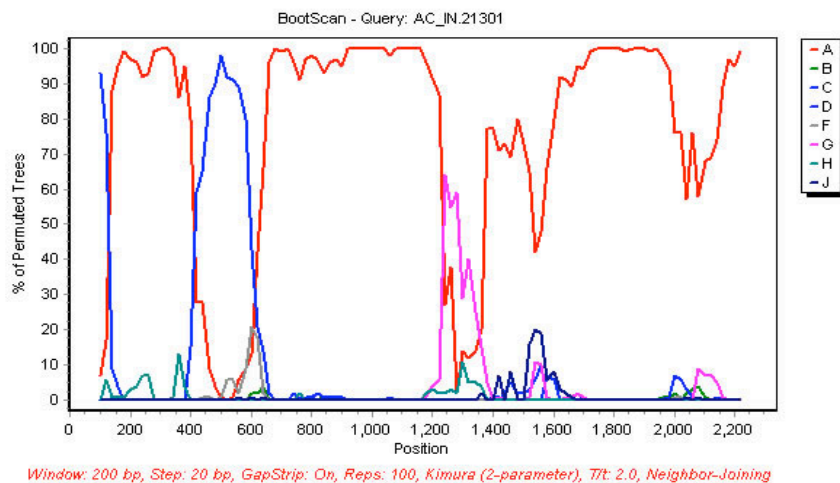


Figura 3. Finestra di Simplot che appare dopo analisi del punto di ricombinazione fra le sequenze (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/simplot/Screenshots/images/Bootscan.jpg>).

1.5.1.2 SPLITSTREE

Splitstree è un programma interattivo per l'analisi e la visualizzazione dei dati evolutivi, che implementa il metodo di decomposizione denominato "split

decomposition". L'analisi con Split decomposition consente la scomposizione di qualsiasi misura di distanza, come ad esempio la distanza genetica generata da un set di sequenze nucleotidiche o aminoacidiche allineate, in una somma di splits metrici. In generale, se le distanze fornite sono di tipo tree-like, lo split graph produrrà un albero; network più complessi vengono generati quando le distanze deviano dalla situazione precedente. Il vantaggio di utilizzare uno split graph piuttosto che un albero filogenetico per rappresentare i rapporti evolutivi fra un dato set di sequenze, è che l'albero presume sempre che i processi evolutivi siano biforcati o multiforcati al contrario di uno split graph. In presenza di ricombinazione, i dati mostreranno segnali filogenetici contrastanti poiché ripartizioni differenti potrebbero supportare differenti storie evolutive. Gli split graph consentono una maggiore flessibilità nel rappresentare questi dati dal momento che il segnale contrastante non sarà necessariamente forzato all'interno di un albero. Uno studio condotto da Salemi e collaboratori (2003) infatti, suggerisce che il metodo dello "split decomposition" abbia il vantaggio di non forzare i dati in un albero sbagliato ma lo svantaggio di essere poco intuitivo quando, molteplici segnali contrastanti presenti nei dati, producono network complessi. L'algoritmo diventa inaffidabile quando vengono analizzati più di 15 o 20 taxa, e con un numero così grande di ceppi esso tende a dare un grafico di tipo star-like con una risoluzione scarsa o assente. Nonostante la decomposizione, condotta con questo metodo, rappresenti una valida applicazione per visualizzare i rapporti evolutivi fra le sequenze non tree-like, questa non permette la mappatura del sito di ricombinazione e non fornisce un supporto statistico (Holmes *et al.*, 1999).

Per questa ultima ragione, Splitstree supporta l'analisi bootstrap (Felsenstein, 1985) per verificare l'attendibilità statistica dei grafici splits calcolati. Il programma genera ripetutamente e casualmente nuovi set di dati e per ognuno di questi set di dati viene calcolato uno split graph. Alla fine della procedura, ad ogni split generato nel grafico originale verrà associata una percentuale indicante l'attendibilità statistica dello split stesso e quindi del metodo.

1.5.1.3 RDP

Il *Recombination Detection Program* (RDP) utilizza un approccio basato sulla “scansione a coppia”. Iniziando con un allineamento multiplo di sequenze in formato Phylip, Fasta o Clustal, il software esamina ogni possibile combinazione di tre sequenze per evidenziare la ricombinazione secondo una procedura in tre step. Nel primo step tutti i siti non informativi, dal punto di vista filogenetico, sono scartati dal gruppo delle tre sequenze per ottenere sub-sequenze più ricche di informazioni. Nel secondo step, una finestra dalla larghezza definita dall’utente viene spostata un nucleotide alla volta lungo le sub-sequenze allineate e una media della percentuale di identità per ognuna delle tre possibili coppie di sequenze viene calcolata ad ogni posizione. Le sequenze che possono avere una possibile origine ricombinante sono definite come regioni in cui la percentuale di identità di una sequenza A e C o B e C sono più alte che per le sequenze A e B. Nel terzo step, viene calcolata la probabilità che l’arrangiamento nucleotidico nelle regioni identificate come più strettamente correlate tra le sequenze in analisi potrebbe essere capitato per caso. Una volta che ogni combinazione di tre sequenze è stata analizzata, un’interfaccia grafica consente all’utente di accedere alle informazioni generate. Recentemente Martin e collaboratori (2005) hanno creato la versione aggiornata RDP2, in cui oltre ad essere presente il metodo basato sulla scansione a coppia, il programma ha implementato diversi altri algoritmi per l’analisi delle ricombinazioni. Il confronto condotto da Posada (2002) sulla capacità di 14 diversi metodi, utilizzati per l’individuazione degli eventi ricombinanti a partire da un set di dati simulati e reali, ha dimostrato che nonostante alcuni siano più efficienti di altri, non esiste un singolo metodo capace di individuare meglio le ricombinazioni (Posada and Crandall, 2001; Posada, 2002). RDP2 presenta una varietà di metodi non parametrici per individuare le ricombinazioni ed è in grado di utilizzare qualsiasi combinazione di questi metodi per identificare automaticamente le sequenze parentali da quelle ricombinanti, stimare la posizione dei punti di rottura, e calcolare gli indici di probabilità per potenziali eventi di ricombinazione. Una volta che tutti i potenziali eventi di questo tipo vengono

identificati, RDP2 seleziona i risultati dell'analisi e cerca di determinare il numero degli eventi di ricombinazione a partire dall'allineamento. RDP2 può essere programmato per filtrare automaticamente gli eventi ricombinanti individuati da un particolare algoritmo rispetto ad un numero specificato di metodi, per identificare le sequenze consenso parentali e per determinare la posizione del più probabile punto di rottura. Per ogni evento rilevato, possono essere visualizzate le informazioni sul tipo di metodo utilizzato per l'analisi, la posizione del punto di rottura, le sequenze parentali, i valori di probabilità, i gradi di accordo dei risultati ottenuti con altri metodi analitici, i siti informativi nell'allineamento e nell'albero filogenetico, semplicemente cliccando sulla rappresentazione grafica dell'evento. Quando un evento è selezionato per studi più dettagliati, si può testare l'evidenza della ricombinazione utilizzando 10 diversi metodi di identificazione delle ricombinazioni semplicemente selezionando il metodo dal menu principale. Per facilitare la valutazione della ricombinazione, RDP2 può anche utilizzare contemporaneamente i componenti di PHYLIP (Felsenstein, 1989; Olsen *et al.*, 1994) per visualizzare gli alberi filogenetici costruiti da differenti porzioni dell'allineamento. Recentemente è disponibile la versione RDP3.

2 PARAPOXVIRUS

2.1 Etiologia: aspetti generali

I Parapoxvirus (PPV) causano malattie eruttive della cute che colpiscono mammiferi domestici, selvatici e l'uomo. Il genere Parapoxvirus comprende cinque specie: il virus orf (OV) responsabile dell'ectima contagioso degli ovi-caprini, il virus della stomatite papulosa del bovino (BPSV), il virus dello pseudovaiolo bovino (PCPV), il Parapoxvirus del cervo della Nuova Zelanda (PVNZ). L'attuale classificazione è basata sugli ospiti naturali delle diverse specie virali, sulla struttura genomica e sul profilo delle mappe di restrizione (Murphy *et al* 1995).

I Parapoxvirus condividono diverse caratteristiche con gli altri membri della famiglia *Poxviridae* come le grandi dimensioni, la complessa morfologia del virione, l'organizzazione genomica, le caratteristiche patogenetiche e la cross-reattività di alcune proteine. Oltre a queste somiglianze possiedono però anche delle peculiari caratteristiche che li distinguono dagli altri generi della famiglia come l'elevato contenuto in G/C che, in questo genere, è del 63% e negli altri è del 36-40%, e la diversa morfologia. I virioni sono di forma ovoidale con l'asse maggiore di 260 nm e quello minore di 160 nm (Naginton *et al.* 1964), queste caratteristiche differiscono da quelle degli altri membri della famiglia *Poxviridae* che si presentano più squadrati in una forma definita "brick shape" e di dimensioni maggiori con l'asse maggiore di 350 nm e quello minore di 250 nm (Figura 1).

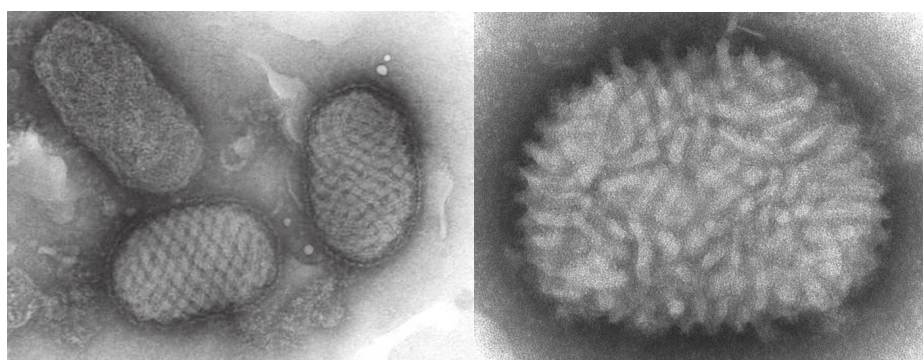


Figura 1. OV a sinistra e VACV a destra. (Foto eseguite in microscopia elettronica colorazione in contrasto negativo. Tratte da www.virustaxonomyonline.com)

In generale, i virus isolati dal terreno di coltura di substrati cellulari infetti possono presentarsi liberi EEV (extracellular enveloped virions) o associati alla cellula CEV (cell-associated enveloped virions) e si presentano circondati esternamente da una struttura a membrana che, analogamente a quanto accade per il Vaccinia virus, probabilmente deriva dall'apparato di Golgi (Robinson e Lyttle, 1992), ha uno spessore di 9-18nm (Rosembruch e Reed, 1983) ed è strettamente adesa alla membrana esterna sottostante.

L'osservazione al microscopio elettronico di criolisati cellulari infetti mostra infatti due diversi tipi di virioni, quelli dotati di envelope che presentano una superficie liscia e quelli con tipico aspetto a "gomitolo di lana", solitamente più numerosi e detti anche "IMV"(intracellular mature virion). Questo particolare aspetto si deve alla presenza del filamento tubulare che si avvolge a spirale attorno alla particella virale inserendosi direttamente sulla membrana superficiale (Naginton e Horne, 1962).

La conoscenza della biologia molecolare dei Parapoxvirus è ancora limitata se paragonata a quella degli orthopoxvirus, in particolare del vaccinia virus, ma negli ultimi dieci anni si sono compiuti numerosi passi avanti, in particolare è stato sequenziato l'intero genoma di tre isolati virali di OV, SA00 e IA82 (Delhon *et al.* 2004), NZ2 (Mercer *et al.*,2005) e dell'isolato AR02 di BPSV (Delhon *et al.* 2004). Questo ha portato a nuove conoscenze riguardo alle proprietà peculiari del genere parapoxvirus e ha permesso di confrontarne il genoma con quello degli altri membri delle *Chordopoxvirinae*.

Il genoma dei parapoxvirus, come quello di tutti i poxvirus, è costituito da un doppio filamento di DNA con le estremità che si presentano saldate da legami covalenti e dotate di sequenze ripetute invertite (ITR), di circa 3,2 Kbp, che determinano una struttura a "molletta " (hairpin loop) (Mercer *et al.*,1987). Il genoma del BPSV è di circa 135 Kbp mentre quello dell'OV è di circa 139 Kbp e sono fra i genomi più piccoli nella sottofamiglia delle *Chordopoxvirinae*. La composizione nucleotidica media sia per il BPSV che per i tre isolati di OV è di 64% G+C, ma non è uniformemente distribuita lungo il genoma, il contenuto in G+C infatti diventa

inferiore al 50% sia in regioni codificanti, ad esempio le ORF (oper reading frame) 127 (IL-10) e 006/132 (VEFG), che in quelle intergeniche regolatorie.

L'eterogenicità del pattern genomico di restrizione dei Parapoxvirus, dimostrata non solo fra le specie, ma anche fra i ceppi e gli isolati virali (Wittek *et al.* 1979; Robinson *et al.* 1992; Gassmann *et al.* 1985) è stata confermata con il sequenziamento dei tre ceppi di OV. Nonostante i Parapoxvirus si siano dimostrati geneticamente eterogenei, l'organizzazione e la regolazione genomica sono strettamente correlate a quelle degli altri Poxvirus. Il genoma del Vaccinia virus possiede 60 kbp in più rispetto a quello dell'Orf e ha un contenuto in G+C inferiore (34%) (Wittek *et al.* 1979), ma le sequenze genomiche di questi virus possono essere allineate (Fleming *et al.* 1993) dimostrando un elevato grado di omologia. In particolare, la porzione centrale del genoma dei PPV contiene 88 geni comuni a tutti i chordopoxvirus e rappresenta il 70% del genoma dell'OV (Gubser *et al.* 2004) mentre le porzioni terminali sono costituite da sequenze più variabili che presentano un elevato grado di divergenza tra il virus orf e il Vaccinia virus.

L'analisi genomica, condotta da Mercer e collaboratori, ha predetto 132 geni nel genoma dei tre isolati virali dell'OV e 133 per il BPSV. Per quanto riguarda gli altri due membri del genere Parapoxvirus, PCPV e PVNZ, sono stati pubblicati su GenBank solo sequenze di singoli geni, ma la comparazione di altre sequenze geniche non ancora pubblicate confermano che OV, BPSV, PCPV e PVNZ costituiscono un genere distinto all'interno delle *Chordopoxvirinae*.

La porzione centrale del genoma del BPSV e dell'OV contiene geni omologhi del VACV coinvolti nella replicazione e nella trascrizione del genoma così come geni coinvolti nella morfogenesi e struttura del virus: DNA polimerasi (VACV E9L), dUTPasi (VACV F2L), RNA polimerase (VACV H4L), DNA topoisomerasi.

Le porzioni terminali del genoma dei Parapoxvirus rappresentano circa il 20% del genoma e mostrano caratteristiche peculiari rispetto agli altri poxvirus. Per esempio nel genoma dell'OV ci sono 31 geni che non hanno omologhi nel VACV e 19 di questi si trovano in una regione di 25 Kbp della porzione terminale destra del genoma

e codificano per fattori responsabili della virulenza e della patogenesi; tra questi troviamo il fattore di crescita endoteliale (ORF 132, Savory *et al.* 2000), un omologo dell'IL-10 (ORF 127, Fleming *et al.* 1997), un inibitore del GM-CSF e dell'IL-2 (ORF 117, Deane *et al.* 2000) e una chemokine-binding protein (ORF 112, Seet *et al.* 2003), un fattore di resistenza all'interferone (ORF 020, Haig *et al.* 1998). Questi geni sono presenti nel BPSV e mostrano un'identità amminoacidica con i geni dell'OV che secondo la predizione varia dal 37 al 77% (Delhon *et al.* 2004). L'analisi di sequenze di 25 Kbp di PCPV e PVNZ hanno mostrato la presenza di questa regione caratteristica anche in queste specie (Mercer, dati non pubblicati).

In particolare, nelle regioni terminali, sono stati individuati specifici punti del genoma (porzioni geniche 102-104 e 109-112) in cui il contenuto in G+C diminuisce drasticamente e uniformemente in tutti e quattro i Parapoxvirus sequenziati: 43,1% NZ2, 42,8% SA00, 41,7% IA82 e 46,1% BPSV come fosse una caratteristica distintiva del genere Parapoxvirus (Figura 2).

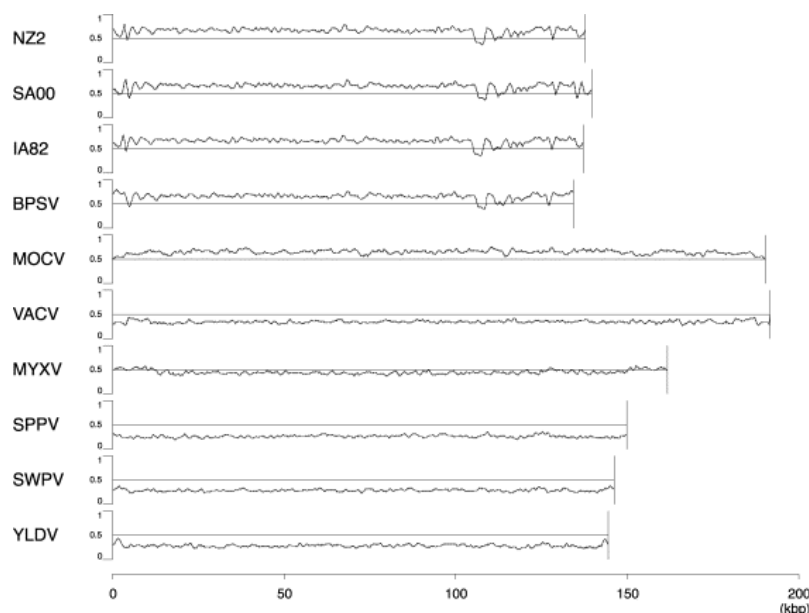


Figura 2. Profilo del contenuto di G+C nel genoma delle Chordopoxvirinae. Ogni tracciato rappresenta il contenuto in % di G+C del genoma virale con il valore di 1 che corrisponde al 100% (Mercer *et al.* 2005).

Queste regioni genomiche corrispondono in alcuni casi anche alle regioni di maggiore variabilità che si sono individuate fra i tre isolati dove le identità

amminoacidiche scendono dal 97,5 al 51,4%. Questi risultati sembrano suggerire la presenza di una pressione selettiva nel mantenere regioni a basso contenuto in G+C indipendentemente dalla sequenza nucleotidica.

L'analisi genomica dei tre isolati di OV ha mostrato un grado di variabilità insolita delle sequenze amminoacidiche per la sottofamiglia *Chordopoxvirinae*. Come già detto, questa variabilità tra isolati virali è più pronunciata nei geni presenti nelle porzioni terminali del genoma e la maggior parte di questi geni non sono presenti in altri poxvirus o hanno funzione sconosciuta (Figura 3).

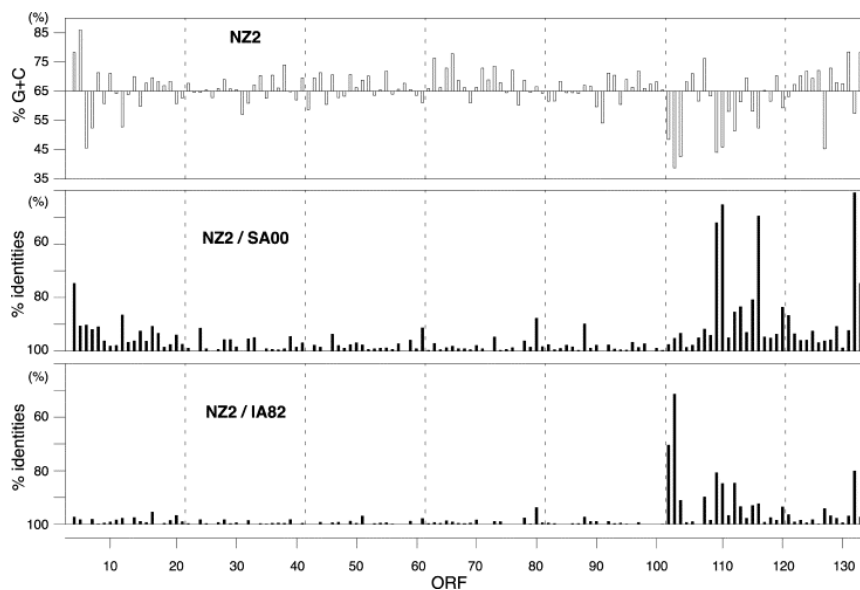


Figura 3. Analisi della variabilità delle regioni codificanti dell'OV. Ogni finestra rappresenta il genoma dell'OV NZ2 con tutte le 132 ORF predette in questo studio. La finestra più in alto rappresenta il contenuto in G+C % e la sua variabilità rispetto alla media del 65%. La finestra centrale e la terza finestra in basso mostrano la percentuale di identità amminoacidica rispettivamente fra NZ2 e SA00 e NZ2 e IA82 (Mercer *et al.* 2005).

Tutti i Parapoxvirus replicano facilmente in coltura cellulare dando un caratteristico effetto citopatico (CPE) con degenerazione palloniforme delle cellule che si staccano dal monostrato lasciando aree di discontinuità nel tappeto cellulare fino alla sua completa distruzione (Figura 4).

Le prime cellule utilizzate per l'isolamento e l'identificazione dell'orf virus sono state quelle di cute embrionale ovina (Greig, 1957), ma oggi generalmente vengono utilizzate colture cellulari di testicolo e rene ovino (Plowright *et al.* 1959). Inoltre possono essere impiegate cellule di polmone e di milza ovina (Housawi *et al.* 1991), colture primarie di fibroblasti ovini o bovini (McFadden, 2005), colture di testicolo fetale ovino (TFO o LT) (Kottaridi *et al.* 2006), cellule di muscolo fetale d'agnello (FLM) e colture primarie di cheratinociti ovini o caprini (PLK, PKK) (Scagliarini *et al.* 2005). I ceppi isolati dall'uomo sono stati invece coltivati in cellule amniotiche umane e di polmone embrionale umano (Gill, 1990).

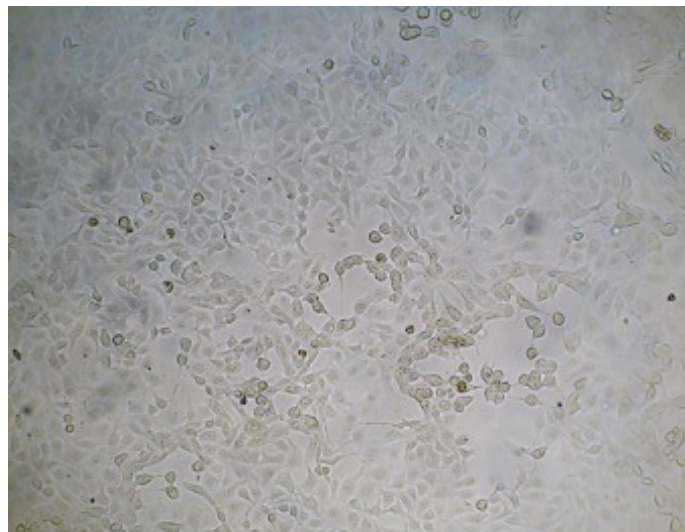


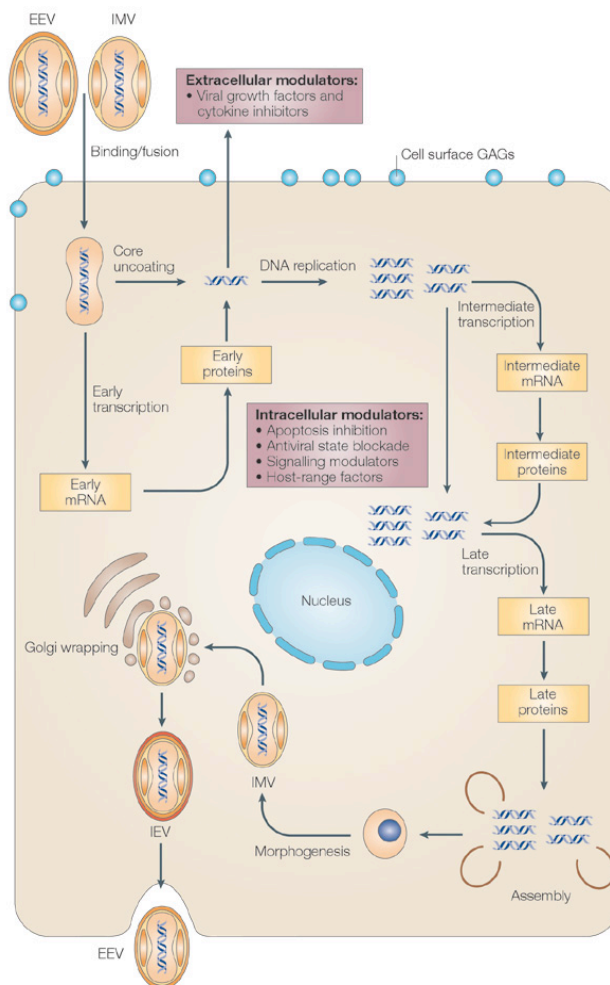
Figura 4. Effetto citopatico dovuto all'infezione da orf virus su coltura in monostrato di cheratinociti ovini.

Per la coltivazione *ex vivo* possono essere utilizzati colture organotipiche di cheratinociti di ovino ottenute a partire da prelievi bioptici di prepuzio di agnelli (Scagliarini *et al.*, 2005). Le cellule coltivate su un letto di collagene, tendono a riprodurre la struttura dell'epidermide.

Il virus orf è particolarmente resistente e all'interno del materiale crostoso è in grado di mantenersi infettante per alcuni anni tra 0°C e 20°C. La sua elevata capacità di resistenza nei ricoveri e nei pascoli è strettamente dipendente dalle condizioni climatiche. Nei mesi estivi infatti mantiene l'infettività per un massimo di 30-60

giorni se non viene esposto direttamente ai raggi solari mentre in autunno, quando la temperatura si abbassa, può mantenere la capacità infettante fino alla primavera successiva. Il virus si inattiva in poche settimane se esposto direttamente ai fattori ambientali, in caso di elevata umidità o di abbondanti piogge che provocano lo scioglimento delle croste (McKeever e Reid, 1986).

Tutti i Poxvirus replicano nel citoplasma cellulare grazie ad enzimi virali come la DNA polimerasi e la mRNA polimerasi. I Poxvirus, come gli Iridovirus, sono gli unici virus a possedere una mRNA polimerasi molto simile a quella delle cellule eucariotiche che gli consente di replicare nel citoplasma senza alcuna necessità di interagire con il nucleo (Ponti 1996) (Figura 5).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 5. Tutti i Poxvirus replicano nel citoplasma delle cellule infette mediante un complesso ma largamente conservato ciclo replicativo (illustrazione tratta da McFadden 2005).

I numerosi studi riguardanti la replicazione delle *Poxviridae* sono comunque stati effettuati sul Vaccinia virus mentre si conosce ancora molto poco riguardo ai Parapoxvirus.

L'adsorbimento del virione si realizza attraverso due fasi: la prima fase è aspecifica ed è regolata da forze di natura elettrostatica, la seconda è invece, correlata all'interazione dei determinanti antigenici virali con i recettori cellulari ed è specifica. Nella prima fase infatti il virus viene attratto dalle valenze acide della cellula, stabilendo attraverso i suoi residui basici dei legami molto labili.

Nella seconda fase invece il virus, interagendo con specifici recettori cellulari, instaura legami covalenti irreversibili con la cellula ospite che portano alla successiva fase di penetrazione (McFadden, 2005).

L'infezione può essere instaurata da due diversi tipi di particelle infettanti: i virioni maturi intracellulari (IMV) e i virioni con envelope extracellulari (EEV). Queste particelle virali posseggono differenti glicoproteine di superficie e un diverso numero di membrane, utilizzano quindi due meccanismi differenti per penetrare nelle cellule.

La penetrazione del virus all'interno della cellula può avvenire sia per endocitosi che tramite fusione dell'envelope con la membrana cellulare, probabilmente gli IMV penetrano per fusione con la membrana plasmatica a seguito della quale avviene la liberazione del core nel citoplasma. Gli EEV potrebbero invece necessitare della fusione con la membrana endosomiale per il rilascio del core.

La fase finale della penetrazione coincide con l'inizio del processo di "uncoating" (svestimento) al quale partecipano sia enzimi virali che cellulari e il rilascio del genoma virale. Il genoma contiene ORF (open reading frame) accuratamente distanziate e precedute da promotori virali specifici che regolano la trascrizione di tre classi di geni: i geni precoci, espressi già durante le prime fasi di uncoating, quelli intermedi, espressi durante la replicazione del DNA e necessari per la trascrizione dei geni tardivi. I geni tardivi codificano principalmente per le maggiori proteine strutturali del virione e per fattori di trascrizione dei geni precoci e sono espressi dopo la replicazione del DNA virale. I geni precoci codificano per proteine che

stimolano la crescita cellulare, la difesa nei confronti del sistema immunitario dell'ospite e la replicazione del genoma virale mentre i geni intermedi codificano principalmente per transattivatori dell'espressione dei geni tardivi. Nel virus orf, la replicazione del DNA è stata evidenziata a partire da 4-6 ore PI con un lento accumulo fino a 10 ore PI e un rapido aumento evidenziabile 12 ore PI. Questo aumento nella sintesi di DNA coincide con la presenza di nuove proteine virali nelle cellule infette (Balassu and Robinson, 1987). La nuova progenie di DNA virale serve da template per la successiva espressione dei geni intermedi e tardivi. Il passaggio della trascrizione dai geni precoci a quelli tardivi sembra avvenire 10-12 ore PI.

Già dopo 2-3 ore dall'infezione ha inizio l'assemblaggio dei virioni in zone del citoplasma dette "fabbriche virali" sedi della sintesi di DNA virale. La maggior parte della progenie virale è rappresentata da virioni intracellulari maturi (IMV) particelle ricoperte da una membrana lipoproteica privi di envelope. Gli IMV vengono rilasciati in seguito a lisi cellulare e sono importanti per la trasmissione da ospite infetto a ospite recettivo. Dopo la loro formazione, gli IMV possono spostarsi dalle fabbriche virali per essere avvolti da due ulteriori strati di membrane intracellulari e formare i virioni con envelope intracellulari (IEV). Gli IEV si spostano mediante i microtuboli verso la superficie cellulare dove la membrana esterna si fonde con la membrana plasmatica esponendo un virus con envelope sulla superficie cellulare. Le particelle che vengono ritenute sulla superficie cellulare si chiamano CEV (cell associated enveloped virus) mentre quelle che vengono rilasciate sono le EEV (extracellular enveloped virius), entrambe contengono una membrana in meno rispetto agli IEV. CEV inducono la formazione di code di actina che guidano i virioni nella diffusione da cellula a cellula. Gli EEV sono meno abbondanti degli IMV e dei CEV, ma sono importanti per la diffusione del virus a più ampio raggio ed hanno anche un ruolo importante nella virulenza.

2.2 Epidemiologia

OV, PCPV e BPSV sono diffusi in tutto il mondo, in particolare nei Paesi ad elevata densità di allevamenti bovini e ovi-caprini. Le infezioni da PPV possono essere considerate zoonosi neglette poichè causano malattie a diffusione endemica delle quali spesso non si conosce la reale incidenza e il cui impatto economico è fortemente sottostimato.

Il virus Orf è responsabile dell'Ectima contagioso, una malattia che colpisce prevalentemente gli ovi-caprini e può essere trasmessa anche all'uomo. L'Ectima contagioso è considerato fra le venti malattie virali degli ovi-caprini più importanti in termini di impatto economico sui paesi poveri. Una recente indagine svolta negli Stati Uniti ha dimostrato che circa il 40% degli allevamenti ovi-caprini sono stati colpiti dall'infezione da orf virus tra il 2004 e il 2007 (Lederman comunicazione personale).

La malattia ha una diffusione mondiale ed è maggiormente presente nelle aree ad elevata densità ovi-caprina; in queste regioni tende ad endemizzare provocando gravi perdite economiche legate alla morte o alla scarsa crescita degli agnelli ed alle complicazioni mammarie nelle pecore adulte che, nei casi più gravi, possono avere esito letale (Mazur e Machado, 1989; Gilray *et al.* 1998). Negli ovi-caprini domestici la malattia può colpire animali di tutte le età ma le forme cliniche più gravi si osservano in genere nei giovani (Buddle e Pulford, 1984).

In molti Paesi non ci sono dati relativi ai costi e all'impatto di questa malattia, negli allevamenti. La morbilità può raggiungere percentuali molto alte, fino al 100%, ma la letalità è in genere piuttosto limitata (1%) anche se, in seguito a infezioni secondarie, sono stati riportati focolai con letalità del 10% (Grumbrell e McGregor, 1997; Guo *et al.* 2003). La letalità è spesso legata all'impossibilità di suggere degli agnelli dovuta alla presenza di lesioni labiali o orali e all'immunodepressione, oltre che ad infezioni batteriche secondarie che possono contribuire all'instaurarsi di uno stato setticemico (Greig *et al.* 1984; Abu Elzein e Hosawi, 1997). La diffusione e l'endemizzazione dell'infezione nei greggi sono correlate all'elevata diffusione del virus nell'ambiente e alla limitata durata dell'immunità che non è in grado di proteggere gli animali dalle

successive re-infezioni. Il virus si diffonde nell'ambiente tramite le croste di animali infetti che contengono alti titoli virali e derivano dalle lesioni conseguenti ad infezione naturale o agli interventi vaccinali (Robinson e Balassau, 1981; Gilray *et al.* 1998).

Il virus infatti è in grado di mantenersi nell'ambiente, protetto dal materiale crostoso, anche per alcuni anni contaminando pascoli e ricoveri divenendo, di conseguenza, ulteriore fonte d'infezione (Livingstone *et al.* 1960; Reid, 1994). Gli animali con forme asintomatiche e quelli con infezioni persistenti possono fungere da reservoir (Greig *et al.* 1984; Mckeever, 1988; Reid, 1994) contribuendo al mantenimento e alla diffusione del virus nell'ambiente.

La trasmissione del virus può avvenire sia per contatto diretto con animali infetti che indiretto con i loro prodotti o con oggetti e ambienti contaminati, la presenza di soluzioni di continuo come abrasioni, escoriazioni e ferite cutanee è però essenziale per permettere l'ingresso del virus nella cute. Situazioni di rischio sono quindi rappresentate dalla tosatura, dalla marchiatura, dal dipping, ma anche la trasmissione dalle madri agli agnelli lattanti è molto diffusa (Lewis, 1996). Le specie recettive all'infezione da Parapoxvirus sono molto meno numerose di quelle di altri membri della famiglia Poxviridae (Robinson e Lyttle, 1992). Non si sa realmente quale sia la diffusione delle infezioni da Parapoxvirus in natura anche se sono state segnalate in specie domestiche sia al pascolo che stabulate, così come in specie selvatiche. Oltre alle specie ovi-caprine, che sono quelle tipicamente interessate dall'infezione da orf virus, si sono dimostrate recettive altre specie di artiodattili domestici come il cammello, il dromedario, l'alpaca e il lama (Robinson e Balassau, 1981) ed alcune specie selvatiche come la renna (Kummeneje e Kosgrud, 1979), la gazzella (Yeruham *et al.* 1994), il camoscio (Guarda, 1959) e il muflone (Zanin *et al.* 1997).

Il PVNZ è chiaramente differente dalle altre specie di PPV (Robinson and Mercer 1995). Questa malattia è stata riportata solo in Nuova Zelanda (Horner *et al.* 1987) anche se il cervo rosso è stato introdotto in questo paese dall'Europa nel diciannovesimo secolo e la Nuova Zelanda non ha specie di ungulati autoctoni.

Queste osservazioni fanno ipotizzare che il PVNZ sia presente anche in altri Paesi. Il sequenziamento dell'intero genoma del poxvirus del cervo ha confermato che rappresenta un nuovo genere, che non appartiene ai parapoxvirus e che è differente dal PVNZ (Afonso *et al.* 2005).

Una caratteristica comune di tutti i membri della famiglia Parapoxvirus è quella di essere completamente apatogeni per le più comuni specie di animali da laboratorio, questo ha di fatto limitato studi sulla biologia di queste specie virali utilizzando modelli sperimentali.

Tutti i membri del genere Parapoxvirus possono infettare l'uomo, l'infezione da orf virus è una zoonosi di tipo professionale, in particolar modo sono interessate le categorie di lavoratori che vengono a contatto diretto con gli animali infetti o con i loro prodotti (lana, pelli, carne) mentre si sono registrati rarissimi casi d'infezione uomo/uomo (Bodnar *et al.* 1999). La trasmissione all'uomo è riportata anche in occasione di riti religiosi in cui la macellazione si svolge a mani nude come quello ebraico di "kasherizzazione" o quello musulmano di "Aid el Kebir" (Guibal *et al.* 1996; Gunduz *et al.* 2005; Ghislain *et al.* 2001). Anche i bambini possono essere esposti all'infezione da PPV in seguito allo svolgimento di attività ricreative con animali o in caso vivano in ambienti rurali a stretto contatto con gli animali, (Lederman *et al.* 2007). Nelle zone rurali e nelle categorie a rischio, l'infezione è considerato un evento frequente ma, almeno in Italia, se ne ignora la reale incidenza, poiché l'aspetto clinico delle lesioni è ben conosciuto e data la spontanea risoluzione delle forme benigne, l'intervento del medico di base viene raramente richiesto (Scagliarini *et al.* 2001; Scagliarini *et al.* 2004). Nei Paesi anglosassoni, in Nuova Zelanda e in Australia, dove le infezioni da Orf sono molto più diffuse, sono stati fatti numerosi studi epidemiologici e l'incidenza della malattia è conosciuta. Il Centre for Disease Control di Atlanta ha riportato 4 casi sporadici di ectima contagioso nell'uomo nei soli anni 2004-2005 in California, Tennessee, Illinois e New York. In seguito a questo primo report, il CDC ha effettuato una indagine più ampia negli

allevamenti ovi-caprini di questi Stati dimostrando tassi di incidenza del 34% nelle categorie di lavoratori a rischio (Lederman comunicazione personale).

2.3 Patogenesi e sintomatologia

I PPV presentano uno spiccato epiteliotropismo, penetrano nella cute e nelle mucose tramite soluzioni di continuo per poi replicare nei cheratinociti danneggiati e neoformati a livello di strato malpighiano. La presenza di ferite ed abrasioni preesistenti è infatti indispensabile per la penetrazione dei virus nella cute poiché la perdita dello strato superficiale e il danneggiamento dei cheratinociti, provocano l'attivazione dei fibroblasti, il richiamo dei neutrofili e la proliferazione cellulare che dà inizio ai processi riparativi dell'epidermide e diviene sede di elezione per la proliferazione virale (McKeever *et al.* 1988).

La replicazione virale provoca lesioni localizzate che progrediscono tipicamente attraverso gli stadi di macula, papula, vescicola, pustola e crosta. La possibilità di diffusione sistemica è ancora oggetto di discussione. L'utilizzo di elevate dosi virali per l'induzione di un'infezione sistemica sperimentale con OV nelle pecore non ha portato allo sviluppo di segni clinici (Buttner e Rziha, 2002) mentre il PCPV è stato isolato all'interno di leucociti bovini in seguito ad infezione sperimentale (Sentsui *et al.* 1999). Il tempo di latenza tra l'infezione e la comparsa delle tipiche lesioni varia da 48-120 ore mentre la risoluzione si realizza in 4-6 settimane in caso di lesioni non complicate. Le lesioni iniziano con arrossamento ed edema attorno al sito d'inoculazione che porta allo sviluppo di vescicole in 24 ore. Le vescicole evolvono poi in pustole, costituite dalla massiva infiltrazione di cellule polimorfonucleate, nel giro di alcuni giorni. In seguito la pustola viene ricoperta da una crosta scura che distaccandosi evidenzia la presenza di tessuto granulomatoso e in alcuni casi si osserva sanguinamento. Le caratteristiche istopatologiche delle infezioni da OV (Robinson e Lyttle 1992; McKeever *et al.* 1988), PCPV (Groves *et al.* 1991) e BPSV (Griesemer *et al.* 1960) sono state descritte per tutti e tre i virus e mostrano delle caratteristiche comuni.

L'epidermide infetta è caratterizzata da vacuolizzazione e degenerazione palloniforme dei cheratinociti dello strato spinoso già a partire dal secondo giorno PI. Le cellule degenerate iniziano a confluire dando origine a una vescicola intraepiteliale generata dall'accumulo di liquido sieroso tra i piani cellulari dissociati. A livello di epidermide e strato papillare sottostante, iniziano ad accumularsi linfociti, plasmacellule e neutrofili che portano alla progressione dallo stadio di vescicola a quello di pustola. I corpi intracitoplasmatici eosinofili sono visibili all'interno dei cheratinociti già 72 ore PI. L'epidermide scomposta rende visibile lo strato papillare necrotico densamente infiltrato da polimorfonucleati che viene successivamente ricoperto dalla crosta: l'epidermide sottostante inizia a rigenerarsi. La crosta si distacca quando l'epidermide è completamente formata. In un primo momento la superficie cutanea neoformata presenta un aspetto ipertrofico di tipo papillomatoso, successivamente, in seguito alla scomparsa dell'infiltrato cellulare, si assottiglia riacquistando il suo aspetto fisiologico. Le lesioni causate da PCPV e BPSV si localizzano normalmente nelle mammelle e nella cavità orale degli animali (Figura 6) rendendo a volte difficoltosa la diagnosi differenziale con altri agenti, emergenti e ri-emergenti, responsabili di malattie vescicolari quali FMDV (Food and Mouth disease virus), BVDV (Bovine viral diarrhoea virus), BHV (Bovine Herpesvirus), vaccinia, BPXV (Buffalopoxvirus).



Figura6. Lesioni da BPSV a sinistra e da PCPV a destra.

Le lesioni da OV, negli agnelli si localizzano a livello labiale ed orale (Figura 7).



Figura 7. Lesioni labiali da OV

Tali lesioni possono assumere carattere proliferativo a causa delle continue perdite di sostanza che portano ad un prolungamento dei processi riparativi e ad iperplasia epiteliale. In fase di finissaggio gli agnelli possono anche essere colpiti da una particolare forma podale, detta “strawberry footrot”, che colpisce gli arti posteriori provocando una caratteristica andatura saltellante. Frequenti sono le lesioni mammarie che si estendono a partire dal capezzolo portando ad una temporanea perdita della funzionalità dell’organo che nei casi più gravi può divenire permanente (Lewis, 1996). La dolorosità delle lesioni può impedire alle madri di alimentare gli agnelli contribuendo ad un loro indebolimento (Figura 8).

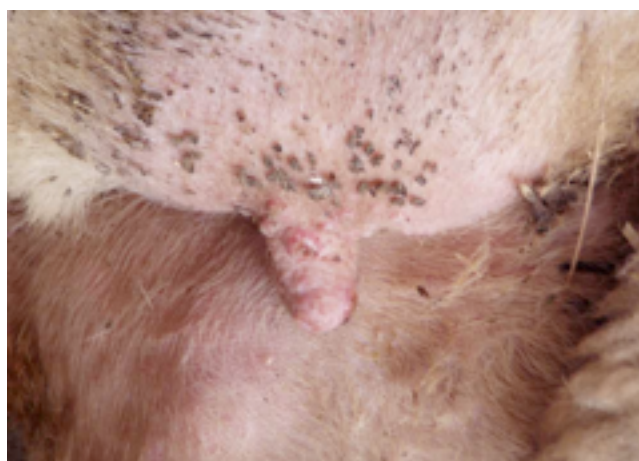


Figura 8. Lesioni a carico della mammella.

Piuttosto comune è la localizzazione a livello di cercine coronario (Greig *et al.* 1984) che porta solitamente a zoppicatura e nel caso di complicanze batteriche secondarie delle lesioni a pedaina. Nei casi più gravi le lesioni che originano dagli spazi interdigitali possono estendersi a tutta la gamba portando a zoppicatura o a decubito permanente. Meno frequenti sono le lesioni a livello di cute perioculare e del padiglione auricolare e di solito sono conseguenti alla marchiatura.

Sia gli animali adulti che gli agnelli possono essere colpiti da sempre più frequenti forme atipiche di Ectima contagioso a carattere proliferativo o maligno dette forme di “persistent Orf” o “malignant Orf” (Greig *et al.* 1984; Abu Elzei e Housawi, 1997; Guo *et al.* 2003) (Figura 9).



Figura 9. Lesioni particolarmente gravi in un ovino

Le lesioni derivano da una proliferazione esuberante dello stato epidermico che va oltre la guarigione della lesione, hanno un aspetto “a cavolfiore” e sono facilmente sanguinanti. Queste lesioni possono persistere per più di sei mesi ma non è ancora chiaro quale sia la causa di queste forme atipiche, se la particolare virulenza dei ceppi o un’inefficiente risposta immunitaria dell’ospite. Recentemente è stato dimostrato il ruolo determinante del VEGF nell’evoluzione clinica delle lesioni: virus VEGF deleti provocano infatti lesioni molto meno estese rispetto a quelle provocate da ceppi selvaggi, caratterizzate da una sostanziale riduzione della proliferazione vasale e cellulare (Savory *et al.* 2000). Una particolarità delle forme atipiche è il maggiore coinvolgimento dei soggetti adulti rispetto agli agnelli e la tendenza a persistere senza

andare incontro ad una spontanea risoluzione come nel caso delle forme classiche. Anche la localizzazione delle lesioni è insolita, vengono interessate la mucosa della cavità buccale e della lingua oppure degli arti (Figura 10). Le lesioni hanno l'aspetto di estese erosioni ulcerativo-necrotiche, accompagnate da imponente edema e cianosi della lingua, aspetto che impone una diagnosi differenziale con la Blue-Tongue e l'Afta. Recentemente è stato condotto uno studio finalizzato a comparare l'attività angiogenetica *in vitro* di VEGF espressi da OV isolati da forme classiche e maligne ma, non è stata rilevata alcuna differenza, supportando l'ipotesi che il VEGF virale non sia coinvolto nel determinare le forme atipiche iperproliferative di ectima contagioso (Scagliarini *et al.* 2006).



Figura 10. Erosioni a livello buccale nella renna.

BPSV, PCPV e OV possono causare infezione nell'uomo. Nell'uomo le lesioni da Orf virus si localizzano prevalentemente sulle parti scoperte come le mani e gli avambracci e meno frequentemente sul tronco (Crumbie, 1998) (Figura 11).

Non di rado sono state segnalate anche lesioni al viso, cuoio capelluto, occhio e regione perianale (Bodnar *et al.* 1999). La lesione spesso è unica e circoscritta e le dimensioni vanno da alcuni millimetri a poco più di un centimetro di diametro ma si possono sviluppare anche lesioni multiple.

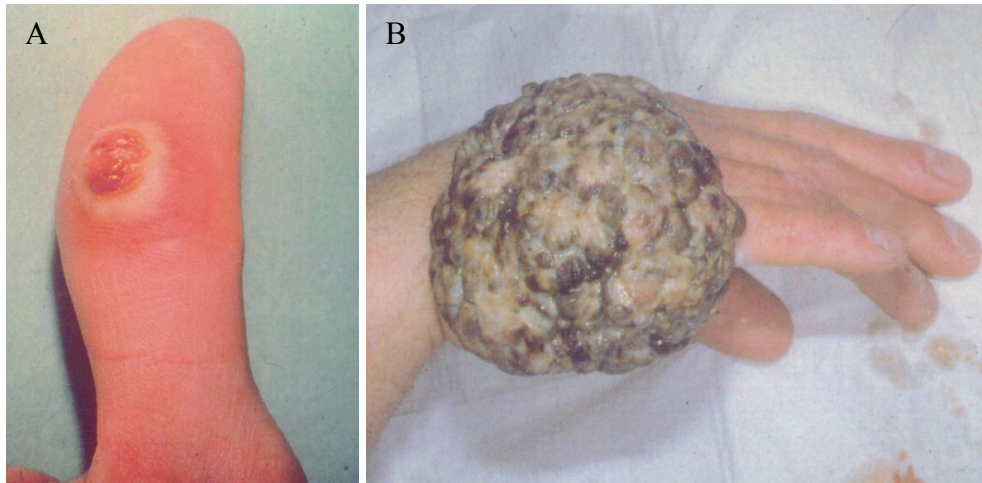


Figura 11. L'immagine A rappresenta l'aspetto di una lesione semplice ad un dito, mentre in B è illustrato l'aspetto simil-tumorale di una lesione giant orf nell'uomo.

L'aspetto clinico si presenta in maniera diversa a seconda dello stadio di evoluzione: nelle fasi precoci si possono osservare pustole e solo successivamente noduli grigiastri, il più delle volte di consistenza soda in genere non dolenti e non pruriginosi (Scagliarini *et al.* 2001). La progressione della malattia dal momento di infezione alla risoluzione viene suddivisa in 6 stadi (Leavell *et al.* 1968):

1. stadio di macula e papula (1°-7° giorno PI): la lesione è una macula eritematosa rilevata, caratterizzata microscopicamente dalla vacuolizzazione delle cellule dello strato superficiale dell'epidermide.
2. Stadio target (7°-14° giorno PI): il centro della lesione di colore rosso corrisponde microscopicamente a cellule con nucleo picnotico; intorno al centro rosso si forma un anello bianco composto da cellule epidermiche vacuolizzate e con corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici; alla periferia della lesione c'è un alone iperemico d'inflammazione.
3. Stadio acuto (14°-21° giorno PI): la lesione è costituita da un nodulo con lesione ulcerata e con fenomeni di trasudazione; istologicamente, in corrispondenza dell'area ulcerata c'è la perdita dell'epidermide, i follicoli piliferi appaiono dilatati e circondati da un'infiltrazione di cellule infiammatorie in tutto il derma.

4. Stadio rigenerativo (21°-28° giorno PI): la lesione è asciutta, rivestita da una sottile crosta di colore giallo nel cui spessore ci sono piccoli punti neri riconducibili microscopicamente a cellule necrotiche con nucleo picnotico; cominciano i fenomeni di rigenerazione dell'epidermide.
5. Stadio papillomatoso (28°-35° giorno PI): il nodulo presenta sulla superficie dei rilievi papillomatosi che corrispondono istologicamente a fenomeni di proliferazione delle cellule epidermiche, con formazione di proiezioni digitiformi che si insinuano nel derma anch'esso notevolmente ispessito.
6. Stadio di regressione (35°giorno PI fino alla risoluzione): la cute riacquista il suo normale spessore ricoperta da una crosta secca e piatta. Prima della completa guarigione è possibile che si formino in successione due o tre croste.

La malattia ha generalmente un carattere benigno autolimitante e tende a guarire spontaneamente in 35-40 giorni senza lasciare alcuna cicatrice.

Casi di infezione proliferative atipiche nell'uomo sono stati riportati sia in soggetti immunodepressi (Duprè *et al.* 1981; Lederman *et al.* 2007; Ara *et al.* 2008) che sani (Gurel *et al.* 2002). Lesioni particolarmente gravi si osservano in pazienti colpiti da leucemia (Hunskaar 1986) o da linfomi maligni (Savage e Black 1972) o ancora in pazienti trapiantati e in corso di terapia anti-rigetto (Degraeve *et al.* 1999; Geerinck *et al.* 2001): in tutti questi casi si sono osservate forme atipiche proliferative di "giant Orf", una formazione simil-granulomatosa, anche di dimensioni cospicue, simile ad una massa tumorale pedunculata che può in alcuni casi richiedere l'escissione chirurgica (Scagliarini *et al.* 2001).

Numerosi casi di complicazioni come eritema multiforme (Agger and Webster 1983; Mourtada *et al.* 2000), pemfigoide bolloso (Kahn e Hutchinson, 1980; Amichai *et al.* 1993; Van Lingen *et al.* 2006) deformità e parestesia (Uzel *et al.* 2004) e forme eruttive vescicolari autoimmuni (White *et al.* 2008) sono stati riportati come conseguenze dell'infezione da OV.

2.4 Diagnosi

Le infezioni da PPV negli animali e nell'uomo vengono generalmente diagnosticate mediante analisi clinica delle lesioni e la conferma del sospetto diagnostico avviene di solito mediante microscopia elettronica delle croste infette, i PPV presentano infatti un pattern a criss-cross caratteristico evidenziabile con colorazione in contrasto negativo. Le lesioni, nelle forme classiche, hanno una localizzazione e un'evoluzione caratteristica. Inoltre ai fini della diagnosi clinica in allevamento sono determinanti l'anamnesi individuale ma anche collettiva del gregge.

Recentemente è cresciuto l'interesse nella diagnosi delle infezioni associate ad OV a causa dell'aumento delle forme di Ectima contagioso "maligne" o atipiche e della possibilità di diagnosi errata nel caso di infezioni a carico di altri patogeni responsabili di malattie vescicolari. Per esempio è stato riportato che nel 2001, durante il focolaio di afta epizootica pan-asiatica di tipo O nel Regno Unito, ci sono stati il 23% di errori diagnostici (Watson 2004), una porzione dei quali potevano essere casi di ectima contagioso. L'afta epizootica è una patologia virale altamente contagiosa, caratterizzata da lesioni vescicolari a livello di mucosa buccale, linguale con possibile interessamento anche del cerchio coronario e della mammella. Nei piccoli ruminanti determina alta mortalità nei giovani, mentre nell'adulto si manifesta frequentemente in forma lieve, con poche vescicole che vanno presto incontro a rottura lasciando erosioni, a carico della parte colpita, che potrebbero essere confuse con quelle da ectima.

L'Europa attualmente sta osservando con preoccupazione la diffusione del virus della Blue Tongue (BTV). Nel caso di forme "maligne" di ectima infatti, la diagnosi clinica può risultare più complicata; in alcuni casi si possono determinare edemi della testa e congestione della lingua che possono portare alla diagnosi differenziale con la blue tongue.

Le lesioni cutanee causate dall'OV possono essere molto simili a quelle vaiolose, però il vaiolo ovino ha un interessamento cutaneo generalizzato delle aree glabre, mentre nell'ectima le lesioni si presentano di solito localizzate. Nel vaiolo ovino

inoltre, la comparsa delle eruzioni cutanee è sempre preceduta risentimento sistemico associato a ipertermia, anoressia e sospensione della ruminazione che non si manifestano in genere nel corso di ectima contagioso.

La comparsa di pustole da orf virus a carico degli spazi interdigitali potrebbe far confondere la patologia con la pedaina. Quest'ultima malattia, determinata da batteri anaerobi quale il *Fusobacterium necrophorum* e il *Dichelobacter nodosus*, causa però una zoppia molto importante e l'approfondirsi dell'infezione all'interno dei tessuti può causare addirittura la perdita dell'unghia.

Nell'uomo il sospetto diagnostico di infezione da PPV può essere formulato in base all'aspetto delle lesioni e all'anamnesi quando essa fornisce l'indicazione di un contatto con animali infetti. Nelle aree rurali le persone hanno familiarità con questo tipo d'infezioni e non ricorrono alle cure del medico. Una corretta diagnosi delle infezioni da OV nell'uomo è importante non solo per le conseguenze a cui possono essere esposti alcune categorie di pazienti come i bambini e i soggetti immunocompromessi ma anche perchè alcune manifestazioni cliniche possono portare a confondere l'infezione con altre zoonosi più pericolose come la tularemia e il carbonchio (Lederman *et al.* 2007).

Spesso alle lesioni localizzate sulle mani e sul volto si può accompagnare linfoadenopatia ciò può portare a confondere la malattia con altre infezioni come la sporotricosi, il micobatterio marino e la leishmaniosi.

L'esame istologico su campioni biotici rappresenta un valido ausilio diagnostico per la conferma del sospetto clinico poichè l'infezione da PPV può generare un quadro caratteristico: l'aspetto istopatologico con vacuolizzazione, picnosi e iperplasia dell'epidermide, edema dello strato Malpighiano e del derma, l'infiltrazione di neutrofili e eosinofili nonchè i corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici (Scagliarini *et al.* 2001).

L'isolamento virale può essere effettuato su diverse colture cellulari anche se generalmente si utilizzano colture cellulari di origine ovina. Il tipico effetto citopatico

può non essere evidente nei primi passaggi in coltura e in questo caso può richiedere diversi passaggi “ciechi” per permettere al virus di adattarsi alla replicazione *in vitro*. La ricerca di anticorpi anti-PPV può essere eseguita a scopo epidemiologico ma non ha valore dal punto di vista diagnostico. Tra le tecniche utilizzate, il test più sensibile e specifico risulta essere l'ELISA, (Housawi, 1992).

Negli ultimi anni comunque il metodo diagnostico maggiormente utilizzato si basa sulla PCR qualitativa o quantitativa. Ne sono state sviluppate diverse, una delle più utilizzate è la PCR qualitativa basata sull'amplificazione di una porzione molto conservata all'interno del genere PPV del gene B2L (Inoshima *et al.* 2000). A partire dalla stessa porzione genomica è stata sviluppata anche una real time in grado di amplificare il DNA di tutti i PPV (Gallina *et al.* 2006).

2.5 Profilassi

L'elevata resistenza del virus nell'ambiente rende difficile l'impostazione di un'efficace profilassi diretta nei confronti dell'infezione. In diversi paesi l'ectima contagioso è una malattia denunciabile e la legislazione veterinaria basa il controllo della malattia sulle misure di vaccinazione e quarantena. Quest'ultima è considerata fondamentale per evitare l'introduzione della malattia in un allevamento indenne.

La disinfezione dei locali, delle mangiatoie e degli attrezzi utilizzati per l'allevamento di animali infetti può essere ottenuta con prodotti alcalini come creolina al 5% o permanganato di potassio 1%. Molto più difficile è il controllo degli animali allevati in modo estensivo, soprattutto quando il pascolo viene frequentato da greggi diversi, poiché il risanamento ambientale è impraticabile proprio a causa dell'elevata resistenza del virus.

L'ingresso dell'infezione negli allevamenti indenni avviene mediante l'utilizzo di attrezzature e materiali contaminati o, principalmente, mediante l'introduzione di animali infetti quindi, per evitare questo rischio, gli animali di nuova introduzione devono essere controllati giornalmente mediante ispezione delle comuni sedi delle lesioni per un periodo di tempo superiore a quello d'incubazione. Nonostante questo

a causa della presenza di portatori asintomatici, l'acquisto di nuovi animali rappresenta sempre un potenziale rischio per gli allevamenti indenni (Lewis, 1996).

Nell'uomo, la profilassi si basa essenzialmente sul controllo della diffusione della malattia negli animali e su interventi di disinfezione di ambienti e oggetti contaminati, nonché su una corretta informazione dei soggetti a rischio di esposizione (pastori, macellatori, casalinghe, ecc) (Scagliarini *et al.* 2001). Infatti, nonostante le lesioni siano in genere circoscritte, possono comunque rivelarsi invalidanti stato stimato che nel 15% dei casi di infezione i pazienti sono costretti ad un periodo di assenza forzata dal lavoro con conseguenti perdite economiche (Buchan 1996).

Nonostante l'elevata diffusione della malattia e i danni economici da essa provocati, non è ancora stata sviluppata una strategia vaccinale in grado di prevenire l'infezione da Orf virus. In molti paesi la malattia viene controllata gestendo i focolai d'infezione in seguito alla loro comparsa. Negli allevamenti è pratica comune scarificare gli animali nel piatto interno della coscia con virus vivo virulento derivato da croste di animali infetti. Questa procedura vaccinale è in grado di proteggere gli animali per alcuni mesi nei confronti dell'infezione senza impedirgli di alimentarsi ed è efficace nel ridurre la gravità delle lesioni permettendo la diminuzione delle perdite di produzione dovute alla naturale infezione da Orf ma favorisce il mantenimento e la diffusione della malattia. Le lesioni conseguenti alla vaccinazione producono materiale crostoso contenente alti titoli virali che contaminano l'ambiente in maniera molto simile all'infezione naturale e che sono fonte di contagio per altri animali e per l'uomo. Sono stati messi a punto anche vaccini vivi attenuati in coltura cellulare in grado di proteggere gli agnelli in seguito a challenge per un periodo di circa sei mesi (Nettleton *et al.* 1996), ma anche in questo caso la durata dell'immunità è limitata a causa della capacità del virus di evadere i meccanismi immunitari tramite la sintesi di fattori della virulenza. Le nuove strategie vaccinali hanno l'obiettivo principale di sviluppare vaccini efficaci per un'immunizzazione completa e duratura degli animali impedendo la diffusione del virus. Le possibili formulazioni vaccinali includono:

vaccini a subunità, ceppi attenuati deleti o vettori virali che esprimono appropriati antigeni del virus Orf (Mercer *et al.* 1997).

2.6 Terapia

Non ci sono terapie per il trattamento delle infezioni da PPV negli animali. Ci sono tuttavia diverse segnalazioni di rimedi derivati dalla medicina tradizionale e da quella alternativa per il trattamento e la prevenzione dell'infezione da virus orf negli ovi-caprini.

Le lesioni da ectima contagioso nelle forme classiche si presentano normalmente autolimitanti e la regressione avviene spontaneamente nell'arco di 3-4 settimane.

In alcuni casi però possono insorgere infezioni secondarie che possono complicare notevolmente il quadro clinico e rendere necessaria una terapia antibiotica, rivolta a contrastare i batteri responsabili delle complicazioni (Greig *et al.* 1984). Per limitare le lesioni da orf sono stati anche utilizzati trattamenti con soluzioni di solfato di rame al 5%, vaselina fenicata al 3% o glicerina iodata o una sospensione acquosa al 6% di tiomalato di antimonio e litio (Sanderson, 1976), la cui efficacia si è però dimostrata molto scarsa.

Il problema di una terapia efficace si pone per le forme atipiche di ectima nell'uomo, in cui le lesioni si presentano progressive e molto diffuse o che non vanno incontro a risoluzione spontanea. In questi casi ha dimostrato di dare buoni risultati l'applicazione di soluzioni di idoxurina al 40% in DMSO (Huskaar, 1986), di pomate con nitrato ammoniacale d'argento (Grahm-Bonnalie, 1951) e una terapia omeopatica utilizzando Yersin serum (Gourreau *et al.* 1986), oppure in alcuni casi si è ricorsi all'uso della crioterapia (Degraeve *et al.* 1999). In letteratura sono riportati esempi di recidive in seguito ad un primo trattamento con la crioterapia o con l'INF α al quale sono seguiti l'asportazione chirurgica della lesione o nel peggiore dei casi dell'intera parte anatomica su cui si era sviluppata la lesione (Tan *et al.* 1991; Savage e Black, 1972). L'uso di creme a base di cortisonici nel corso di un'infezione da orf

virus complicata da dermatite atopica ha causato la disseminazione delle lesioni virali (Duprè *et al.* 1981).

Recentemente, è stata dimostrata la sensibilità dell'OV e del PCPV al cidofovir, sia *in vitro* (Nettleton *et al.* nel 2000) che *ex vivo* (Dal Pozzo *et al.* 2005). Inoltre una pomata all'1% di cidofovir è stata utilizzata con successo nella terapia di una forma "giant Orf" sviluppatasi in un paziente trapiantato, in cui la regressione completa della lesione in un dito ha evitato l'amputazione (Geerinck *et al.* 2001). Questo rappresenta il primo esempio di applicazione di una specifica terapia antivirale, a partire dalla quale sono stati realizzati degli studi di efficacia del cidofovir crema in agnelli infettati sperimentalmente con il virus orf. Questo studio ha dimostrato la potenzialità terapeutica *in vivo* del cidofovir nei confronti del virus orf (Scagliarini *et al.* 2007).

Recente è la segnalazione di successo nel trattamento topico con imiquimod (Aldara®) di un paziente con un linfoma non-Hodgkins che non aveva risposto positivamente alla rimozione chirurgica e alla terapia con cidofovir (Lederman *et al.* 2007).

PARTE SPERIMENTALE

Per lo studio delle ricombinazioni è necessario poter disporre di substrati cellulari permissivi per la replicazione delle diverse specie di PPV e conoscere le dinamiche di replicazione e gli eventuali fenomeni di interferenza tra virus co-infettanti.

Per questo, il primo obiettivo del nostro lavoro è stato quello di produrre colture primarie in monostrato di cheratinociti, target d'infezione *in vivo*, e colture organotipiche cutanee. E' stata inoltre messa a punto una metodica di isolamento ed espansione di cellule staminali cutanee. L'epidermide di individui adulti costituisce infatti una fonte di cellule staminali che possono essere utilizzate anche per ricostituire *in vitro* colture organotipiche di tessuto cutaneo stratificato e pienamente differenziato. L'obiettivo è stato quello di ottimizzare e standardizzare le metodiche di isolamento ed espansione clonale di cellule staminali epidermiche isolate da una singola biopsia cutanea allo scopo di aumentare la loro sopravvivenza *in vitro* mantenendo inalterate le loro capacità di espansione e differenziazione. La possibilità di disporre di cellule staminali cutanee potrebbe consentire ulteriori approfondimenti per lo studio delle ricombinazioni in substrati cellulari a minor grado di differenziazione in quanto, come dimostrato recentemente per altri virus epiteliotropi come il papilloma virus, le cellule staminali dello strato basale, potrebbero rappresentare un ulteriore target per la replicazione dei PPV *in vivo*,

Per lo studio *in vitro* delle ricombinazioni è necessario studiare in via preliminare le dinamiche di replicazione dei PPV in substrati permissivi, così come la cinetica di replicazione e a seguito di co-infezioni.

Infine, allo scopo di individuare possibili siti di ricombinazione ed aree di omologia di sequenza, è stata caratterizzata la regione terminale destra del genoma di PCPV sede di geni importanti nella patogenesi e di frequenti eventi di ricombinazione.

MATERIALI E METODI

1. Messa a punto dei substrati cellulari permissivi

1.1 Monostrati di cheratinociti ovini

Per la coltivazione del virus orf (OV) e dello pseudocowpoxvirus (PCPV) sono state utilizzate colture primarie di cheratinociti di origine ovina (PLK) isolati da tessuto prepuziale di agnelli. Il prelievo bioptico di prepuzio ovino è avvenuto nel rispetto della normativa sulla protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali (86/609/EEC, D.LVO 116/92). Il tessuto prepuziale, asportato mediante circoncisione in anestesia totale, è stato mantenuto a +4°C in tampone fosfato salino (PBS, Phosphate Buffered Saline) contenente l'1% di antibiotico/antimicotico (Gibco, invitrogen Corporation, UK) per una notte. Il giorno seguente, il tessuto è stato sminuzzato con l'ausilio di forbici sterili, immerso in tripsina/EDTA 0.05% (Gibco, invitrogen Corporation, UK) ed incubato a 37°C in oscillazione per 30 minuti. Al termine, l'azione enzimatica della tripsina è stata bloccata aggiungendo un uguale volume di terreno di crescita e tutto il materiale è stato prima filtrato mediante filtri da 70 µm (Beckton Dickinson) e poi centrifugato a 1500 rpm a +4°C per 10 min. La digestione del tessuto è stata ripetuta ulteriormente seguendo le medesime fasi. Il pellet cellulare ottenuto dalle centrifugazioni è stato risospeso nel terreno di crescita raft medium contenente 2/3 DMEM (Gibco), 1/3 HAM'S F12 (Gibco), arricchito con 10% di siero fetale bovino (SFB) (Lonza), 2mM di L-Glutamina (Gibco), 1mM di sodio piruvato (Gibco), 1% antibiotico/antimicotico (Gibco), 1% aminoacidi non essenziali (Gibco), 7.5% di bicarbonato di sodio (Gibco), 2ng/ml di EGF (Euroclone), 5 µg/ml di insulina (Sigma), 0.5 µg/ml di idrocortisone (Sigma), 5 µg/ml di transferrina (Sigma), 1.5 mg/ml di 3, 3'-triiodo-2-tironina (Sigma) e 0.1 nM di tossina colerica (Sigma). Le cellule sono state quindi poste, in fiasche trattate con collagene di tipo I (Collagen bed cell flask, BD) ed incubate a 37°C e 5% di CO₂. La crescita delle PLK è stata monitorata al microscopio ottico rovesciato e il terreno di coltura sostituito ogni due giorni con nuovo raft medium.

1.2 Cellule staminali adulte di cute ovina

Il prelievo biotico di prepuzio ovino è avvenuto nel rispetto della normativa sulla protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali (86/609/EEC). Il tessuto prelevato è stato mantenuto in PBS contenente antibiotico/antimicotico all'1% ed immediatamente processato per la raccolta delle cellule staminali. Inizialmente è stato sottoposto a disaggregazione meccanicamente, avvalendosi di forbici e pinze sterili, poi a trattamento enzimatico con tripsina all'1% (Gibco, Invitrogen) per 1 ora a 37°C in agitazione orizzontale a 400 rpm. Per bloccare l'azione della tripsina, alla preparazione è stato aggiunto SFB al 5% ed è stata eseguita un'ulteriore digestione con 10U/ μ l di DNasi I (Sigma) per 1 minuto a temperatura ambiente. La sospensione ottenuta è stata filtrata attraverso filtri da 70 μ m per rimuovere i pezzi di tessuto più grossolani ed in seguito centrifugata a 400xg per 5 minuti a temperatura ambiente. Il pellet cellulare è stato lavato con PBS, nuovamente centrifugato a 500xg per 5 minuti e, dopo eliminazione del surnatante, risospeso in 1 ml di terreno completo di crescita composto da: DMEM e HAM'S F12 in parti uguali, antibiotico/antimicotico all'1% e B-27 supplement (Gibco, Invitrogen), 20 ng/ml EGF (Euroclone) e 40 ng/ml bFGF (Euroclone). Le cellule sono state contate mediante camera di Burkner, seminate alla densità di $1-5 \times 10^5$ cellule/cm² in fiasche da 75 cm², aggiungendo 15 ml di terreno di crescita, ed incubate a 37°C e 5% di CO₂. Le cellule ottenute dalla raccolta sono state osservate giornalmente per verificarne la crescita e la formazione delle sfere in sospensione.

La proliferazione cellulare è stata quantificata seguendo la procedura ASC-N- proc1 messa a punto nell'ambito delle attività svolte da ASC-Lab (laboratorio di ricerca finanziato dal Programma Regionale per la Ricerca per la Ricerca Industriale, l'Innovazione e il Trasferimento Tecnologico PRIITT, Misura 4, Azione A). E' stata condotta quindi un'analisi parametrica mediante conta del numero di sfere generate dopo campionamento random con apposita griglia e analisi del diametro medio mediante software Image Proplus. A questo scopo, è stata creata una griglia per la conta delle sfere, basandosi sulla superficie piana di una fiasca da 75 cm², e le sfere

sono state contate e fotografate giornalmente. Inoltre è stato calcolato il tasso di proliferazione dato dal diametro medio dei clusters per il numero di sfere. Sono state dunque generate delle curve di crescita a diversi passaggi per studiare la capacità e l'andamento di crescita delle colture di cellule staminali adulte cutanee.

Dopo aver contato e fotografato le sfere, il terreno contenente le cellule è stato raccolto in una falcon da 50 ml e sottoposto a centrifugazione a 600xg per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso con 5 ml di tripsina allo 0,05% ed incubato per 2 minuti al fine di disgregare le sfere ed ottenere singole cellule. La tripsina è stata inattivata con 0,5 ml di SFB ed il pellet è stato ulteriormente disgregato mediante l'utilizzo di una pasteur di vetro. Dopo una centrifugazione a 800xg per 10 minuti, il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 ml di terreno completo per la conta cellulare. Infine le cellule sono state seminate in una nuova fiasca da 75 cm² con 10 ml di terreno fresco e 10 ml di terreno della coltura precedente appositamente filtrato con filtri da 0,22 µm.

Allo scopo di evidenziare i markers di staminalità e di differenziazione è stata messa a punto una metodica in Real Time RT-PCR per la quantificazione dei livelli di espressione della p63 e vimentina nei differenti passaggi cellulari. Uno standard plasmidico specifico per p63 e vimentina è stato ottenuto in via preliminare per definire una curva standard di riferimento sulla quale estrapolare, in base alla fluorescenza del singolo campione, la quantità di gene target.

1.3 Colture organotipiche

Le colture organotipiche o raft culture sono in grado di mimare la morfologia e la fisiologia dei tessuti da cui le cellule sono state prelevate, attraverso l'elevata capacità di differenziazione di tale cellule sotto l'effetto di fattori di crescita e di proliferazione. Come nella pelle, anche nei raft cutanei, si possono distinguere uno strato epidermico superficiale ed uno dermico sottostante con fibroblasti che svolgono funzioni trofiche per le cellule epiteliali.

A questo scopo una linea continua di fibroblasti murini 3T3J2 è stata coltivata a 37°C e 5% di CO₂, con terreno di mantenimento costituito da D-MEM al 10% si SFB,

supplementato con 2mM di L-glutamina, 1mM di sodio piruvato, 7.5% di sodio bicarbonato. Per l'allestimento dei "collagene bed", che fungono da supporto per il raft, è stata preparata una matrice di collagene costituita da reconstitution buffer 10X (soluzione al 22% di NaHCO₃, 2% di NaOH e 47.6% di Hepes), Ham's F-12 10X, collagene di tipo I (Becon Dickinson, Pharmigen, San Diego, CA) e fibroblasti 3T3J2. La matrice di collagene è stata distribuita in una piastra da 24 pozzetti (1 ml di volume per pozzetto) e fatta solidificare a 37°C e 5% di CO₂. Sulla superficie di ciascun collagen bed, sono stati posti 1x10⁵ cheratinociti sospesi in 1 ml di raft medium. La piastra è stata quindi incubata a 37°C e 5% di CO₂ per 24-48 ore. Al raggiungimento della confluenza dei cheratinociti sul cuscino di collagene, ciascun raft è stato sollevato dal pozzetto della piastra e adagiato su una griglia metallica all'interfaccia aria-terreno di coltura. In questo modo i fattori nutrizionali e di crescita presenti nel terreno di coltura, per diffusione attraverso la matrice di collagene, possono giungere ai cheratinociti consentendone lo sviluppo e la differenziazione. Ogni 2 giorni si è proceduto alla sostituzione del raft medium. Dopo un periodo di differenziazione di 10-12 giorni, i rafts sono stati sollevati dalle griglie e fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina e le sezioni istologiche sono state sottoposte a clorazione con ematossilina-eosina.

Allo scopo di verificare la permissività delle colture organotipiche, è stata eseguita un'infezione con entrambe le specie virali (360 Pfu/100 µl/raft), ponendo l'inoculo virale sulla superficie dei raft ed è stato caratterizzato l'effetto citopatico.

2 Studio del ciclo replicativo

2.1 Virus

Ai fini delle prove sperimentali sono stati utilizzati i parapoxvirus, orf IT987/04 isolato da un focolaio classico di ectima contagioso in un allevamento ovino dell'Emilia Romagna e 1303/05 isolato dalle mammelle di una bovina in Sicilia, utilizzati come ceppi di riferimento per il virus orf (OV) e per lo pseudocowpoxvirus (PCPV), rispettivamente.

2.2 Preparazione degli stock virali

Entrambi i ceppi virali sono stati coltivati su PLK. Per la preparazione degli stock virali sono state infettate fiasche confluenti, da 75 cm² di PLK, con 500 µl di ciascun inoculo virale e 5 ml di DMEM+HAM'S F12 al 2% di SFB. Dopo un'ora di incubazione a 37°C e 5% di CO₂ l'inoculo è stato rimosso e sostituito con 16 ml di terreno di crescita al 2% SFB. Al raggiungimento del 90% di CPE, le fiasche sono state congelate a -80°C per bloccare l'infezione. Dopo tre cicli di congelamento/scongelo, al fine di lisare le cellule per liberare il virus, è stato raccolto tutto il terreno e centrifugato a 1500 rpm per consentire la separazione dai detriti cellulari. Il surnatante è stato prelevato, suddiviso in aliquote da 1 ml ciascuna e congelato a -80°C. Ciascuna aliquota di stock virale è stata scongelata una sola volta per evitare una riduzione della carica virale conseguente a ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

La titolazione è stata eseguita su PLK utilizzando piastre da 96 pozzetti in presenza di un monostrato cellulare confluento. A partire dagli stock virali dell'OV e del PCPV sono state preparate le diluizioni in base dieci e, per ciascuna, sono stati seminati 100 µl per pozzetto in cinque ripetizioni. Dopo un'incubazione di un'ora a 37°C e 5% di CO₂, gli inoculi sono stati rimossi e sostituiti con 100 µl di terreno di crescita al 2% di SFB per pozzetto. Il quarto giorno post infezione è stata eseguita la lettura delle piastre valutando la presenza di CPE in ciascun pozzetto e in corrispondenza di ciascuna diluizione. Il titolo di ciascuno stock virale è stato espresso come TCID₅₀/ml, corrispondente alla dose infettante il 50% della coltura cellulare. Le formule matematiche utilizzate per il calcolo della TCID₅₀ sono le seguenti:

$$\frac{(\% \text{ pozzetti infetti oltre il } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ pozzetti infetti oltre il } 50\%) - (\% \text{ pozzetti sotto il } 50\%)}$$

Il risultato ottenuto da questa formula viene definito distanza proporzionale e viene utilizzato per il calcolo della dose infettante ID50:

$ID_{50} = (\log \text{ della diluizione con CPE oltre il 50\%}) + (\text{distanza proporzionale} * \log \text{ del fattore di diluizione})$

Il reciproco della ID_{50} costituisce la $TCID_{50}$.

Allo scopo di studiare possibili eventi di ricombinazione genomica, conseguenti alla co-infezione in substrati permissivi, sono state caratterizzate le cinetiche replicative dell'OV e del PCPV su colture in monostrato di PLK. A questo proposito le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e, a semiconfluenza (70-80%) sono state staccate e contate in duplicato per ottenere il numero medio di cellule. I restanti pozzetti, sono stati infettati, dopo aver eliminato il terreno di coltura, con entrambe i ceppi virali ad una MOI di 0.1. Dopo 1 ora di incubazione, l'inoculo è stato rimosso e ciascun pozzetto è stato lavato con PBS al fine di asportare le particelle virali non ancora penetrate all'interno delle cellule. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 3 ml di DMEM+HAM'S F12 al 2% di SFB. A distanza di 6, 12, 18, 24, 48, 72 ore dall'infezione, il surnatante e il monostrato cellulare infetto sono stati raccolti separatamente al fine di valutare la presenza di virus infettante e DNA virale a livello extracellulare ed intracellulare. Il surnatante è stato raccolto e centrifugato a 1500 rpm ed infine congelato a -80°C . Il monostrato cellulare è stato sottoposto a tre lavaggi con PBS allo scopo di eliminare tracce di surnatante, e in seguito congelato a -80°C dopo aver aggiunto 3 ml di PBS a ciascun pozzetto. In questo modo, allo scongelamento delle piastre è avvenuta la rottura delle membrane cellulari con conseguente liberazione nel PBS dei virioni associati alle cellule stesse. Il PBS è stato quindi raccolto e centrifugato a 1500 rpm e il surnatante ottenuto stoccato a -80°C . La titolazione del surnatante e delle cellule infette di ciascun tempo post infezione, è stata condotta come descritto in precedenza. I titoli dei campioni sono stati espressi in $TCID_{50}/\text{ml}$ e utilizzati per la definizione delle curve di crescita dell'OV e del PCPV. Al fine di valutare la carica virale a ciascun tempo post infezione, il DNA virale estratto dal surnatante e dalle cellule infette è stato quantificato mediante SYBR

Green Real Time PCR. In seguito i valori ottenuti per ciascun tempo post infezione sono stati confrontati con i titoli virali corrispondenti.

La SYBR Green Real Time PCR è stata messa a punto con lo scopo di quantificare contemporaneamente l'OV e il PCPV in uno stesso campione. A tal proposito, per l'amplificazione virale è stato identificato un frammento del gene B2L che consente la discriminazione delle due specie virali e, sulla base della sequenza nucleotidica di ciascun virus, è stata disegnata la coppia di primers specie-specifica. In questo modo, i primers PCPVB2LF 5'-CACGCCGAAGTCGTTGAG-3' e PCPVB2LR 5'-ATCATCACCCGAGTGGA-3' non sono in grado di amplificare il virus orf e viceversa la coppia OVB2LF 5'-GACGCCAAAGTCGTCGAG-3' e OVB2LR 5'-GTGATCATCACCCGAGTGGA-3' non consente l'amplificazione del PCPV.

Per la quantificazione assoluta, sono stati costruiti due diversi standard plasmidici, clonando all'interno del plasmide pCR4-TOPO (Invitrogen) una porzione di 400bp del gene B2L amplificata tramite PPP1-PPP4 (Inoshima *et al.*, 2000) del 1303/05 per il PCPV e di IT987/04 per l'OV. I plasmidi sono stati linearizzati mediante reazione enzimatica con l'endonucleasi di restrizione PmeI, quantificati su gel di agarosio all'1% utilizzando un marker di riferimento a pesi molecolari noti ed infine diluiti in base dieci. Per la costruzione della curva standard, da cui ricavare la quantificazione, sono state utilizzate cinque diluizioni in base dieci del plasmide ripetute in doppio.

La reazione è stata eseguita utilizzando lo strumento RotorGene 3000 (Corbett Research, Australia) ed analizzata mediante apposito software in dotazione alla macchina. La miscela di reazione è stata preparata in un volume finale di 20 µl contenenti 12.5 µl di Sybr Premix ex Taq™ (Takara), 0.3 µM di primer forward e reverse, 6 µl di acqua e 3 µl di DNA, e sottoposta ad un'iniziale denaturazione a 95°C per 30 secondi per l'attivazione della Taq polimerasi, seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 10 secondi, annealing a 53°C per 10 secondi ed estensione a 72°C per 20 secondi. Al termine dell'amplificazione è stata impostata una curva di melting aumentando la temperatura da 55°C fino a 95°C con un incremento termico di 1°C ogni 2 minuti. Durante questa fase è stata rilevata la variazione di fluorescenza

emessa dai campioni ed è così stata calcolata la temperatura di melting per ciascuno di essi.

3. Studio della cinetica replicativa nelle co-infezioni

Per studiare le dinamiche di replicazione delle due specie virali, in seguito a co-infezione in substrato cellulare permissivo di PLK, sono state preparate due diverse mix di co-infezione, partendo da titoli virali uguali per entrambi i virus, nella prima è stato mantenuto costante il titolo dell'OV mentre il PCPV è stato diluito per ottenere un rapporto da 1:10 fino 1:1000 con il virus orf. La seconda mix è stata preparata esattamente come la prima, ma mantenendo costante il titolo virale di PCPV e diluendo l'OV. Le prove di co-infezione sono state condotte in piastre da 24 pozzetti, inserendo i controlli cellule e i controlli virus di ciascuna diluizione utilizzata. Dopo 3 giorni di incubazione, l'effetto citopatico è stato bloccato congelando le piastre a -80°C. Dopo tre cicli di congelamento/scongelo, per ogni pozzetto è stato raccolto tutto il materiale e sottoposto a centrifugazione. Il surnatante ottenuto è stato utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico e in seguito amplificato tramite Real Time PCR per la quantificazione della carica virale come descritto in precedenza. Allo stesso tempo, i controlli virus sono stati sottoposti a titolazione virale.

4. Caratterizzazione della regione destra del genoma di PCPV

Mentre sono state già pubblicate le intere sequenze del genoma di diversi ceppi di orf virus (Mercer *et al.*,2006), sono ancora molto scarse le informazioni relative al genoma dei PCPV. Per questo motivo si è proceduto alla caratterizzazione della regione genomica (26.000 bp) identificata come la sede preferenziale degli eventi di ricombinazione. A partire dal DNA estratto del campione 1303/05 si è effettuata una mappatura degli ORF mediante "primer walking". A questo proposito sono stati creati diversi allineamenti, uno per ciascuna ORF di interesse, utilizzando le sequenze nucleotidiche di tre ceppi di OV depositate su GenBank: IA82 (AY386263) isolato da un ovino in Iowa (Delhon *et al.*,2004), NZ2 (DQ184476) isolato da un ovino in

Nuova Zelanda (Robinson *et al.*,1982) e SA00 (AY386264) isolato da una capra negli Stati Uniti (Guo *et al.*,2003) e di un ceppo di PCPV, VR634 isolato da un bovino in Germania (dati non pubblicati). Sulla base di questi allineamenti sono stati disegnati i primers per l'amplificazione mediante l'ausilio del programma Primer Analysis software version 6.69 (OLIGO from Molecular Biology Insights, Plymouth, MN).

La miscela di reazione utilizzata per la PCR è riportata in tabella 1.

REAGENTI	VOLUME
Buffer 10X	5 μ l
Soluzione Q	10 μ l
dNTPs 10mM	4 μ l
Primer forward 20 pmoli/ μ l	1 μ l
Primer reverse 20 pmoli/ μ l	1 μ l
Taq DNA Polimerasi (5U/ μ l)	0.25 μ l
H2O DNasi,RNasi free	23.75 μ l
DNA	5 μ l

Tabella 1. Miscela della reazione di amplificazione secondo le indicazioni del kit Taq DNA Polymerase (Qiagen)

Al termine di ogni reazione di amplificazione, i prodotti PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Il DNA amplificato è stato colorato con bromuro di etidio e visualizzato tramite transilluminatore (luce ultravioletta); le immagini sono state acquisite mediante il software Quantity One in dotazione all'analizzatore d'immagine FluorS (Biorad®, Germany). In seguito gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche®, Germany) e quantificati su gel di agarosio all'1% mediante un marker quantitativo di pesi molecolari (100bp DNA Ladder BioLabs, New England) e il software Quantity One.

Il sequenziamento è stato eseguito mediante sequenziatore automatico ABI 3730XL (Applied Biosystem) presso i laboratori BMR-genomics, Padova. Ogni ORF è stata sequenziata nella direzione senso e antisenso.

5. Analisi genomica

Le ORF della regione destra del 1303/05, ottenute dal sequenziamento, sono state confrontate con le corrispondenti dei ceppi di riferimento NZ2, SA00, IA82 e VR634. A tale scopo, per ciascuna ORF sono stati eseguiti l'allineamento nucleotidico ed aminoacidico utilizzando il metodo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementato nel programma MegAlign (DNASTAR software, Lasergene Inc., USA) e sono state ricavate le relative percentuali di identità. Inoltre per ogni ORF è stata calcolata la percentuale di A+T ed è stata confrontata con quella dei ceppi NZ2 e VR634. Per le ORF 109 e 110 è stato condotto lo studio della struttura secondaria e la predizione del dominio transmembrana con PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000). Per le ORF 112 e 117, dopo esecuzione degli allineamenti, sono stati ricercati ed evidenziati i motivi strutturali, con particolare riferimento ai residui cisteinici. Un ulteriore approfondimento è stato condotto sull'ORF 132, codificante il fattore di crescita endoteliale VEGF. Come per le altre ORF, la sequenza è stata allineata con diverse varianti di VEGF-E ed è stata calcolata la percentuale di identità nucleotidica ed aminoacidica. Inoltre è stata eseguita l'analisi filogenetica utilizzando il software MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo NEIGHBOR-JOINING, mentre la distanza genetica tra le sequenze aminoacidiche è stata calcolata con il metodo Jones-Taylor-Thornton matrix. L'attendibilità degli alberi ottenuti è stata valutata mediante analisi BOOTSTRAP (Felsenstein, 1985) sulla base di 1000 replicazioni.

Per la caratterizzazione della proteina e per la realizzazione del modello tridimensionale della nuova variante VEGF-E (sequenza "target"), è stata condotta una ricerca tramite l'algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) sul Protein Data Bank (PDB) individuando la sequenza "template" nel cristallo di VEGF-E del ceppo NZ2,

codice PDB: 2GNN con risoluzione pari a 2.30 Å (Pierin *et al.*,2006). Le sequenze aminoacidiche delle porzioni monomeriche del 1303/05 e dell'NZ2 sono state allineate tramite ClustalW 2.0.10. L'allineamento mostra un'identità di sequenza pari al 51%. Inoltre e' stata effettuata la predizione della struttura secondaria del target con PSIPRED e verificare la conservazione dei motivi strutturali allineando le strutture secondarie target/template . Prima di procedere alla modellizzazione vera e propria, è stato eseguito lo studio delle interazioni tra le due catene monomeriche, in particolare per i ponti di solfuro e i legami a idrogeno, rimappando le informazioni a nostra disposizione sull'allineamento. Per la costruzione del modello tridimensionale della variante VEGF-E del 1303/05, è stato utilizzato il metodo dell' Homology Modelling visto che la percentuale d'identità tra le due sequenze, a livello di struttura primaria, era superiore al 30%. Infine, in base allo studio di Cebe e collaboratori (2008), è stato condotto uno studio sulla regione C-terminale per confrontare i residui aminoacidici coinvolti nelle interazioni con il recettore NP-1 e con il VEGFR-1.

Le singole sequenze ottenute dal sequenziamento sono state assemblate avvalendosi del programma Seqman (DNASTAR) per ottenere porzione genomiche di dimensioni maggiori. Queste porzioni sono state sottoposte ad analisi di ricombinazione con il programma RDP (Martin e Rybicki, 2000) e quelle che hanno mostrato i risultati più interessanti sono state approfondite con il programma Splitree (Huson, 1998).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1.1 Substrati cellulari

Per lo studio degli eventi di ricombinazione *in vitro* sono state allestite colture cellulari di cheratinociti e cellule staminali adulte cutanee, a partire da prepuzio di ovini. Mentre è già nota la capacità di questi virus di replicare nei cheratinociti, non si conosce ancora il ruolo delle cellule staminali presenti a livello di lamina basale cutanea. Recentemente è stato dimostrato che altri virus epiteliotropi come papillomavirus utilizzano cheratinociti indifferenziati come target iniziali per l'infezione produttiva (Kadaja *et al.*,2009). Per questo motivo sono state realizzate colture in monostrato di cheratinociti ovini e cellule staminali cutanee. I cheratinociti hanno dimostrato di permettere la replicazione virale sia dell'OV che del PCPV con la conseguente formazione di un caratteristico effetto citopatico (CPE) con comparsa di placche nel monostrato cellulare e di cellule rotondeggianti in fase di degenerazione palloniforme (Figura 1). Questo substrato ha dimostrato quindi di essere immediatamente disponibile per svolgere studi *in vitro* per approfondire la cinetica replicativa di PCPV e OV in infezioni singole ed in seguito a co-infezione.

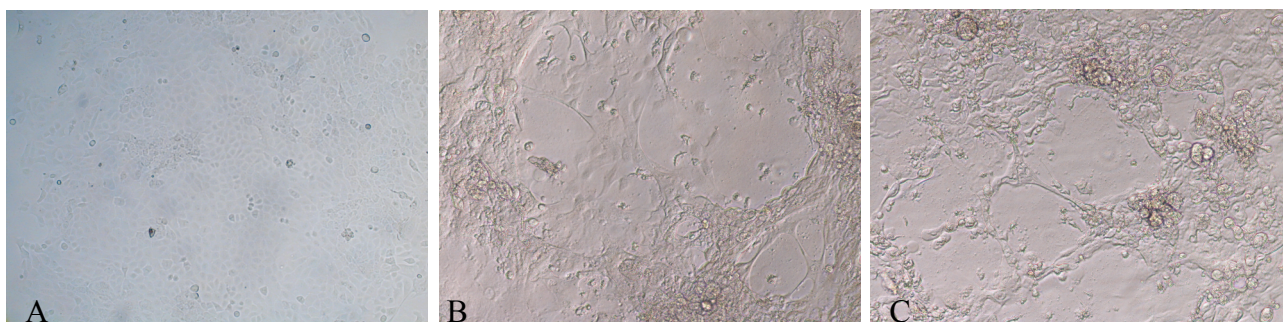


Figura 1. Le immagini mostrano i monostrati di cheratinociti ovini non infetti (A), infettati con OV 987/04 (B) e con PCPV 1303/05 (C).

Le cellule staminali adulte di cute ovina sono state ottenute dal prepuzio di animali adulti e coltivate in fiasche come cellule in sospensione in presenza di mitogeni (EGF e bFGF). Durante l'intero periodo di coltura, è stata studiata la loro capacità di proliferare come aggregati cellulari. Nei primi giorni, si è osservato che nella coltura cellulare una parte di cellule aderiva alla fiasca e differenziava, mentre

contemporaneamente si formavano piccole sfere fluttuanti (Figura 3). Queste sfere sono state trasferite in nuove fiasche, e dopo la formazione di aggregati di dimensioni maggiori, sono state disgregate (passaggio cellulare) e seminate nuovamente. La proliferazione delle cellule staminali adulte è stata valutata contando il numero di aggregati cellulari o sfere e misurando il loro diametro medio, a tutti i passaggi eseguiti. La figura 2 mostra l'andamento della coltura cellulare nel tempo. La grandezza delle sfere è aumentata durante i giorni di coltura all'interno di un passaggio cellulare e anche nei diversi passaggi (Figura 3). Una stima più precisa della proliferazione cellulare è stata ottenuta considerando entrambi i parametri, il numero di sfere e il diametro medio, utilizzando l'espressione: n° di sfere x diametro medio (Figura 3). E' stato osservato un aumento progressivo del rate proliferativo nei primi cinque giorni in vitro (DIV). In corrispondenza del 5° giorno le cellule sono state disgregate e, durante il primo passaggio, hanno dimostrato di proliferare attivamente con incremento del loro diametro medio. Al 9° giorno dal P1 sono state nuovamente disgregate e, al terzo giorno dopo il secondo passaggio, sono degenerate. Questo andamento ricalca quanto già osservato per cellule staminali cutanee di altre specie animali come il ratto (Chen *et al.*, 2007).

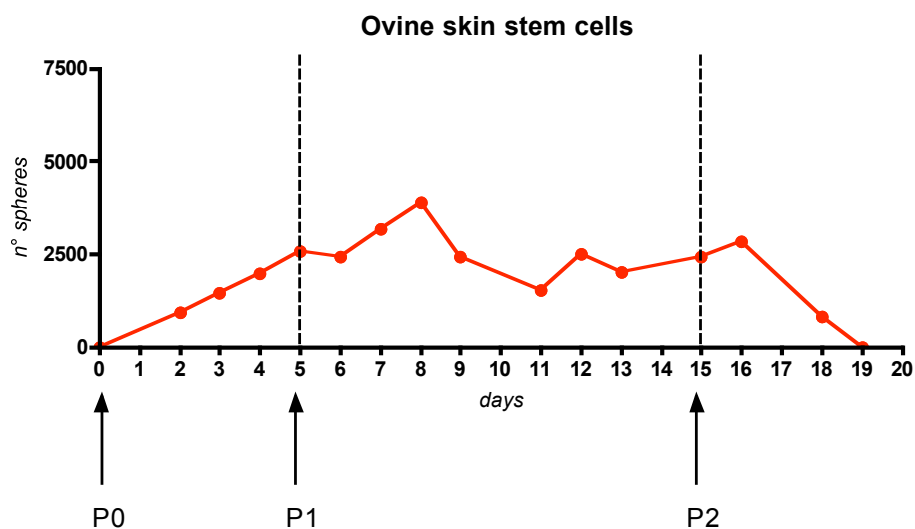


Figura 2. Andamento di crescita della coltura di cellule staminali nel tempo. P0, P1 e P2 corrispondono al tempo zero in cui è stata preparata la coltura e ai passaggi 1 e 2.

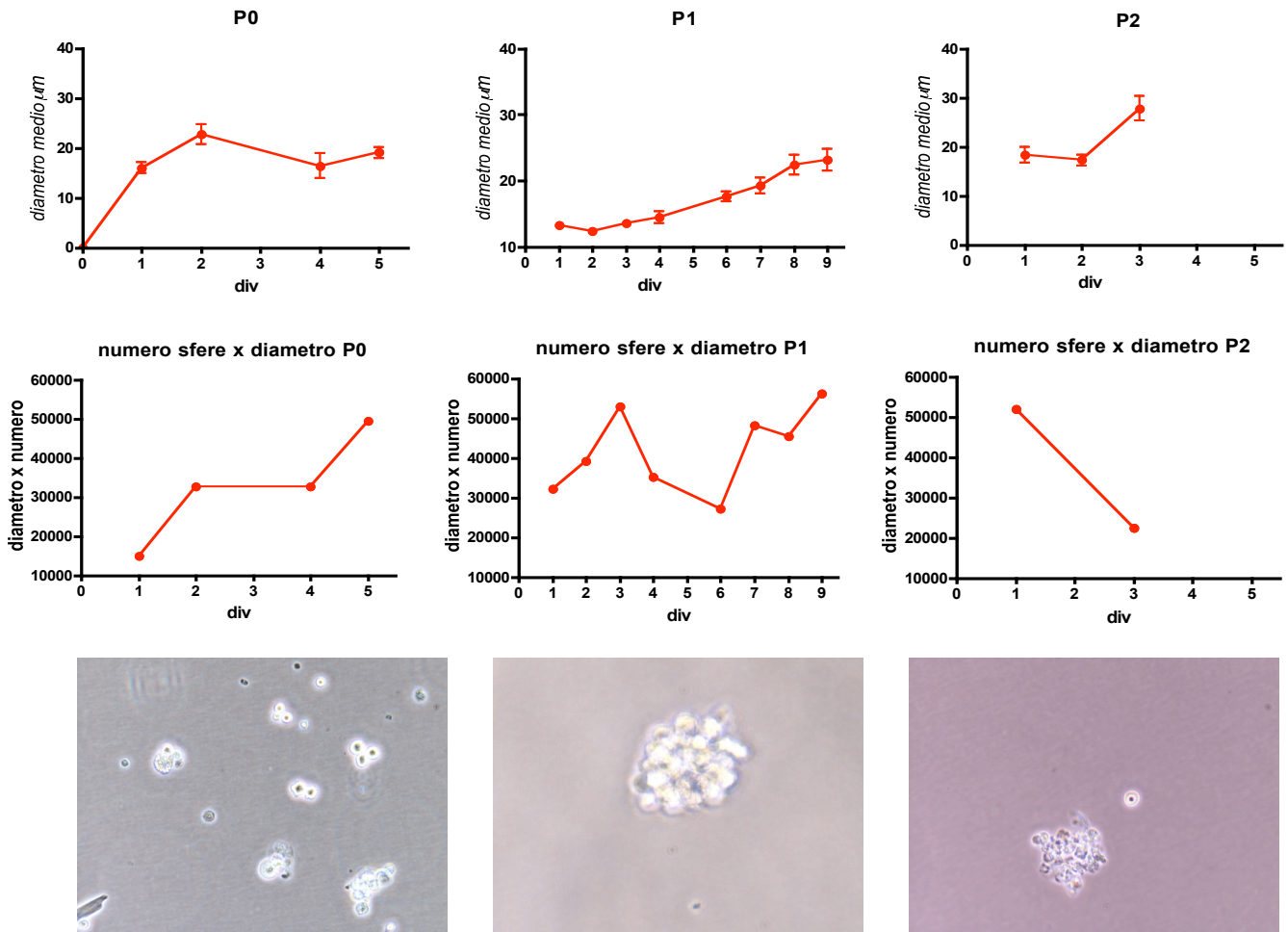


Figura 3. I grafici mostrano l'andamento della coltura ad ogni passaggio cellulare. In particolare, i primi tre grafici in alto rappresentano l'andamento del diametro medio delle cellule staminali durante i giorni in vitro (DIV) all'interno di ciascun passaggio cellulare. I tre grafici in basso mostrano il rate proliferativo della coltura cellulare in corrispondenza di ciascun passaggio. In corrispondenza di ogni passaggio è mostrato l'aspetto della coltura cellulare.

La mancanza di reagenti specifici per la caratterizzazione della staminalità cellulare ha reso necessario mettere a punto una metodica in Real-time in grado di rilevare l'espressione di marcatori specifici quali la p63 e la vimentina (Chen *et al.*, 2007). Nell'ambito di questo studio sono state sequenziate e depositate in banca dati le sequenze parziali dell'RNA messaggero di p63 (EF491630) e vimentina (EF495195) della specie ovina. Questi risultati già a disposizione del mondo scientifico contribuiscono alla ricerca sulle cellule staminali adulte in specie animali diverse dai

roditori e renderanno possibili studi più approfonditi sul ruolo delle cellule staminali cutanee nelle infezioni da PPV.

Infine, l'allestimento delle colture organotipiche di cute ovina con la tecnica "air liquid interface", ha portato allo sviluppo di un epitelio pluristratificato cheratinizzato del tutto simile al tessuto cutaneo ovino dal punto di vista istologico (Figura 4). La differenziazione dei cheratinociti in un epitelio pluristratificato è stata osservata dopo 11-12 giorni di incubazione. La caratterizzazione con metodiche immunoistochimiche ha evidenziato un buon grado di differenziazione cellulare, testimoniato dall'espressione di markers specifici per la lamina basale e la cheratina (dati non mostrati). Inoltre, a seguito d'infezione, si è dimostrato il tipico effetto citopatico che ricalca quanto evidenziato nelle biopsie di animali infettati naturalmente. Per questo motivo, anche questo substrato permissivo per la crescita di PCPV e OV potrà essere utilizzato per gli studi *ex vivo* dei fenomeni di ricombinazione dei PPV.

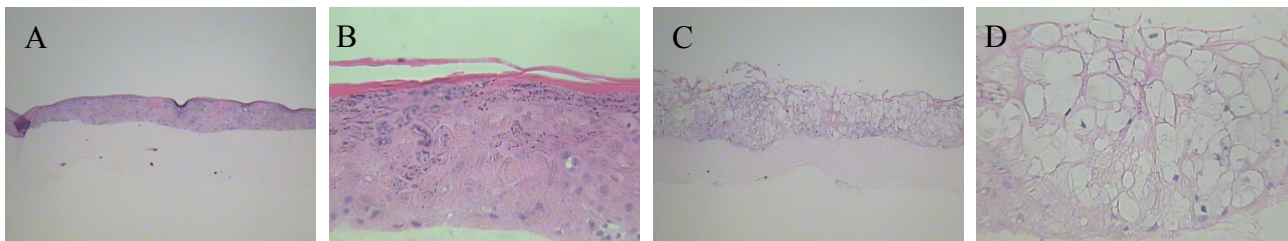


Figura 4. Le immagini mostrano le colture organotipiche a differenti ingrandimenti, 10X (A, C) e 40X (B, D). In particolare, le immagini A e B rappresentano gli epiteli non infetti mentre nella C e nella D si può riscontrare il tipico effetto citopatico conseguente all'infezione virale.

1.2 Studio del ciclo replicativo virale

Le cinetiche replicative dei due virus sulle PLK sono state studiate ricorrendo alla titolazione e alla quantificazione del DNA virale presente nel surnatante e nelle cellule infette a diversi tempi post-infezione. I risultati sono stati rappresentati graficamente esprimendo i titoli virali come Log_{10} del valore di $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ mentre la concentrazione di DNA virale è stata riportata come Log_{10} del numero di copie/ μl .

Nelle prime 12 ore post-infezione il valore di TCID₅₀/ml dei due virus è risultato molto simile sia a livello intracellulare (Figura 5) che extracellulare (Figura 6). A partire da questo momento in poi, la crescita dell'OV si è dimostrata significativamente maggiore rispetto a quella del PCPV. A livello intracellulare, la replicazione del PCPV si è dimostrata molto inferiore a quella dell'OV, dopo 12 ore post-infezione, l'OV aumenta progressivamente con un incremento di circa 2 Log₁₀ tra le 12 e le 18 ore mentre il PCPV ha un aumento del titolo virale di circa 1 Log₁₀ per poi mantenersi su valori compresi tra 10⁴-10⁵ TCID₅₀. Al contrario, all'interno delle cellule, è stato osservato un incremento maggiore del PCPV probabilmente dovuto alla difficoltà del virus di rilasciare virioni maturi nello spazio extracellulare. In particolare, la quantità di DNA di PCPV aumenta già dalle 6 ore post-infezione per poi raggiungere una fase di plateau tra le 48 e le 72 ore. Anche la cinetica di accumulo del DNA virale dell'OV a livello intracellulare, dimostra un aumento già dopo le 6 ore post-infezione ma, in questo caso OV replica progressivamente senza mai raggiungere una fase di plateau.

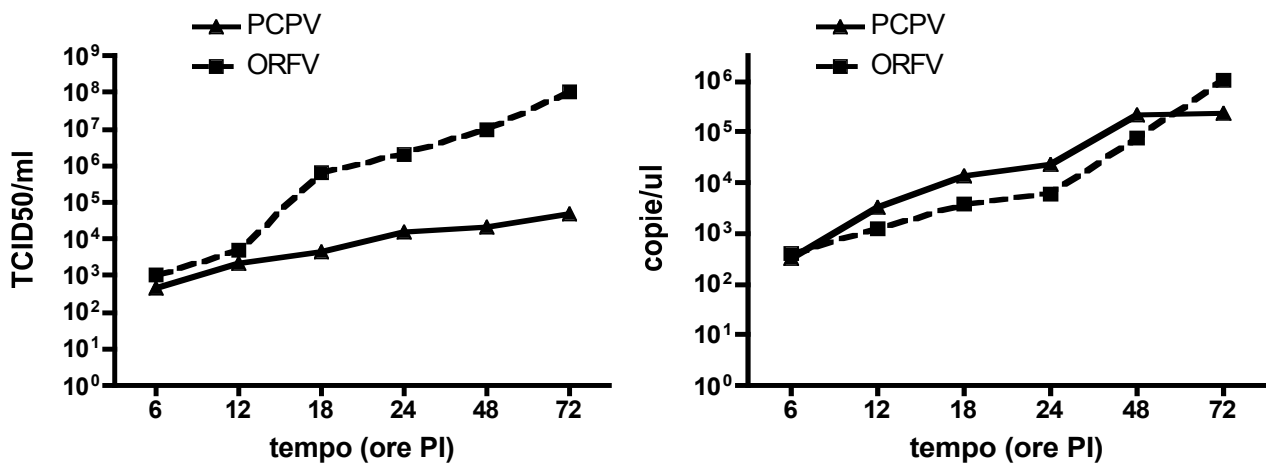


Figura 5. I grafici mostrano i valori della TCID₅₀/ml e la concentrazione di DNA virale in corrispondenza di ciascun tempo post-infezione a livello intracellulare.

Nel surnatante dopo le 12 ore, l'OV aumenta progressivamente con un incremento di circa 1 Log₁₀ ad ogni tempo post-infezione, mentre il PCPV ha un incremento significativo di circa 2 Log₁₀ tra le 24 e le 48 ore post-infezione per poi raggiungere

una fase di plateau. In corrispondenza delle 72 ore post-infezione, la carica virale del PCPV è risultata inferiore di circa 3 Log₁₀ a quella dell'OV in maniera simile a quanto osservato nell'intracellulare.

La quantificazione dell'acido nucleico virale sia del PCPV che dell'OV, a livello extracellulare, ha portato alla creazione di una curva di crescita che ricalca quanto già visto per i titoli virali. Nelle prime 12 ore post-infezione la quantità di acido nucleico dei due virus è risultata molto simile, ma dopo questo tempo post-infezione l'OV produce un numero maggiore di progenie virale rispetto al PCPV.

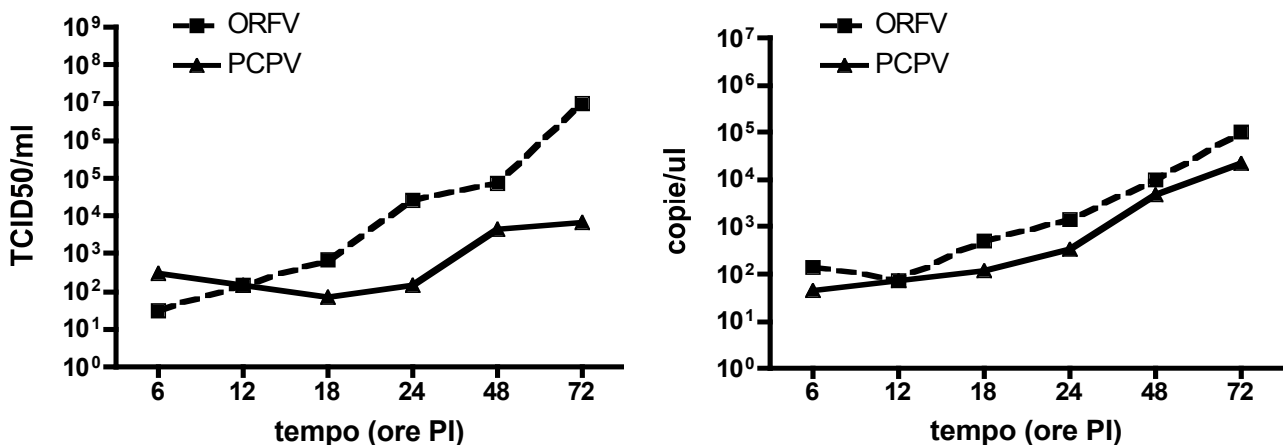


Figura 6. I grafici mostrano i valori della TCID₅₀/ml e della concentrazione del DNA virale rilevati nel surnatante in corrispondenza di ciascun tempo post-infezione.

La cinetica replicativa che si realizza nelle cellule di ovino sottolinea la stretta specie-specificità dei PPV. Infatti, è evidente come le cellule di origine ovina si siano dimostrate substrati più permissivi per la replicazione di OV rispetto a quella di PCPV, evidenziando l'importanza dei meccanismi cellulari nella realizzazione del ciclo virale. La minore efficienza di replicazione in substrati ovini era già stata dimostrata *in vivo* infettando pecore e capre con il ceppo 1303/05 (Gallina *et al.*,2008). Questo studio ha dimostrato che il PCPV è in grado di penetrare nelle cellule di ovino senza esitare in un'infezione produttiva per l'incapacità di dare origine a virioni maturi completi. D'altra parte, i dati sulla concentrazione del DNA virale di PCPV possono supportare l'ipotesi di possibili eventi di ricombinazione in

caso di co-infezione anche in substrati non completamente permissivi. Studi sulla cinetica replicativa di OV e PCPV in substrati bovini potranno confermare l'importanza di sistemi cellulari permissivi per la realizzazione di infezioni produttive.

1.3 Co-infezioni

Lo studio delle prove di co-infezione con le due specie virali è stato condotto sottoponendo i lisati cellulari ottenuti a quantificazione del DNA virale ed esprimendo i risultati come Log_{10} del numero di copie/ μl (Figure 7 e 8). Inoltre, sono stati titolati i controlli virus delle diverse diluizioni utilizzate ed i valori ricavati sono stati espressi come il Log_{10} della $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Dalla quantificazione delle miscele virali si è osservato che, quando le due specie virali sono presenti alla stessa concentrazione, le quantità del DNA sia del PCPV che dell'OV diminuiscono del 6% rispetto al controllo virus alla medesima concentrazione (KV), ma mentre per l'OV questa riduzione è statisticamente significativa, per il PCPV non lo è. Per entrambi i virus è stato rilevato che, quando vengono diluiti all'interno della mix di infezione, essi replicano in quantità inferiore rispetto all'altro virus presente in concentrazione maggiore (tal quale). In particolare, per il PCPV è stata calcolata una riduzione nella quantità di DNA del 17%, alla diluizione 1:10, del 21% e del 20% alle diluizioni 1:100 ed 1:1000, rispettivamente (Tabella 1). Questi valori percentuali sono risultati tutti statisticamente significativi con un livello di confidenza del 99%. Per l'OV, le diminuzioni nella quantità di DNA sono state pari al 11%, 13% e 17% alle rispettive diluizioni 1:10, 1:100 ed 1:1000 (Tabella). Anche in questo caso, i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica e sono risultati tutti significativi con un livello di confidenza del 99%.

PCPV 1303/05				OV 987/04			
TQ	MEDIA	SEM	MIX/KVx100	TQ	MEDIA	SEM	MIX/KVx100
Kv1303	5,01	0,26	6%	Kv987/04	6,34	0,14	6%
Mix	4,74	0,27		Mix	5,95	0,01	
1:10				1:10			
Kv1303	4,76	0,12	17%	Kv987/04	5,83	0,04	11%
Mix	3,97	0,18		Mix	5,19	0,16	
1:100				1:100			
Kv1303	3,95	0,14	21%	Kv987/04	5,15	0,04	13%
Mix	3,13	0,05		Mix	4,50	0,19	
1:1000				1:1000			
Kv1303	3,32	0,11	20%	Kv987/04	4,45	0,13	17%
mix	2,65	0,05		mix	3,68	0,02	

Tabella 1. Risultati della prova di co-infezione del 1303/05 e del 987/04. TQ indica la concentrazione tal quale in cui sono riportati i dati del controllo virus (Kv) del PCPV e dell'OV e della mix di co-infezione, in cui il 1303/05 e il 987/04 sono presenti alla concentrazione tal quale. Per le diluizioni 1:10, 1:100, 1:1000 sono indicati i valori dei rispettivi Kv del PCPV e dell'OV ed il valore del 1303/05 e del 987/04 nelle diverse diluizioni quando l'altra specie virale è presente a concentrazione TQ. Sono state calcolate le medie del Log_{10} delle quantità di DNA ottenute da 3 prove indipendenti, la deviazione standard della media (SEM) e la percentuale (%) di riduzione del 1303/05 e del 987/04 nelle quattro diverse mix di infezione.

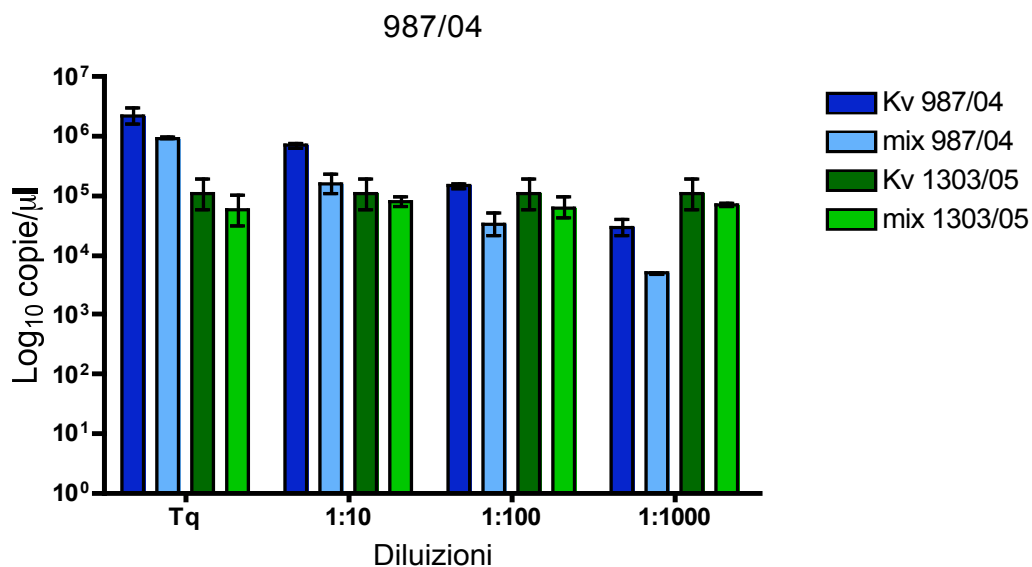


Figura 7. Rappresentazione grafica della prova di co-infezione in cui il 1303/05 viene diluito mentre il 987/04 mantenuto alla concentrazione tal quale. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata dopo tre ripetizioni indipendenti della prova di co-infezione.

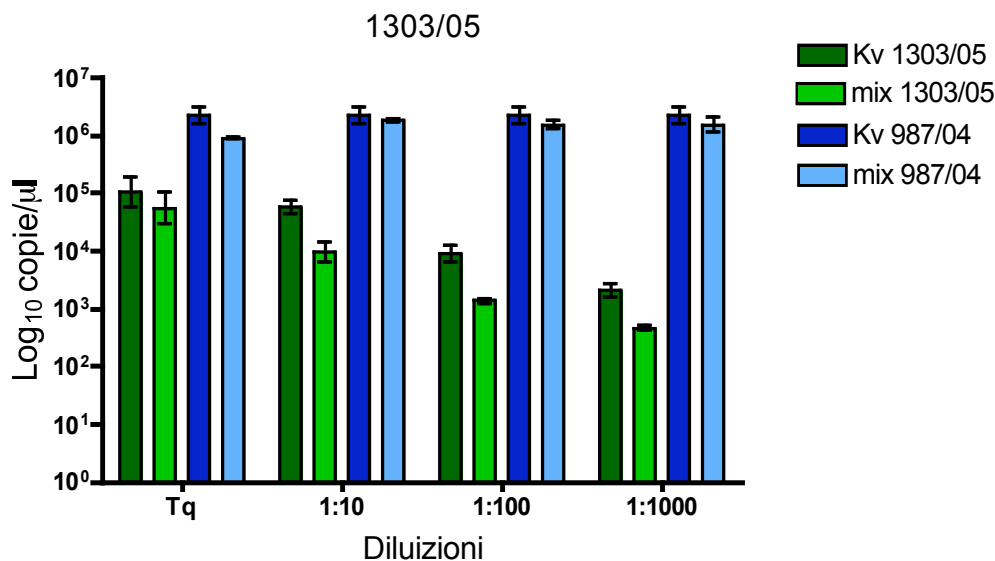


Figura 8. Rappresentazione grafica della prova di co-infezione in cui il 987/04 viene diluito mentre il 1303/05 viene mantenuto alla concentrazione tal quale. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media calcolata dopo tre ripetizioni indipendenti della prova di co-infezione.

Non sono noti dati sull'interferenza virale nei Poxvirus, i risultati da noi mostrati aggiungono importanti informazioni su questo fenomeno che deve essere tenuto in considerazione sia negli studi di co-infezione *in vitro* e *in vivo*.

Inoltre, è importante sottolineare che nonostante fosse stato utilizzato un titolo virale analogo negli inoculi non diluiti di PCPV ed OV, dopo 3 giorni post-infezione, si è evidenziata una concentrazione di DNA virale del PCPV è di circa 1,3 Log₁₀ inferiore rispetto all'OV confermando quanto già rilevato negli studi di cinetica replicativa. Questo risultato sottolinea ulteriormente l'importanza del substrato utilizzato e dell'inoculo di partenza per la replicazione virale nelle co-infezioni in quanto questi possono ridurre l'efficienza replicativa e di conseguenza la possibilità di riprodurre un evento di ricombinazione *in vitro*.

1.4 Caratterizzazione della regione destra del genoma di PCPV

Dall'amplificazione e dal sequenziamento della regione destra del ceppo di PCPV 1303/05 è stato possibile assemblare diverse porzioni genomiche per un totale di 17.000 nucleotidi (Appendice I e II) ottenendo le sequenze complete di 20 ORF

(Tabella 2). Queste sequenze sono state allineate con quelle dei ceppi di riferimento ed è stata ricavata la percentuale di identità nucleotidica ed aminoacidica riportate nella tabella 3. E' stata anche valutata la percentuale di A+T di ciascuna ORF e i risultati sono stati confrontati con il ceppo di OV NZ2 e di PCPV VR634 (Figura 9).

ORF	1303/05		VR634		NZ2		VACV	Funzione
	aa	nt	aa	nt	aa	nt	ORF	
106	317	951	317	951	314	942	A29L	RNA-polymerase subunit RPO35
107	60	180	60	180	60	180	A30L	Virion morphogenesis
107.5	50	150	58	174	49	147	-	Unknown
108	273	819	258	774	266	798	A32L	ATPase, DNA packaging
109	162	486	160	480	161	483	A33R	EEV glicoprotein
110	166	498	166	498	165	495	A34R	EEV glicoprotein
111	180	540	180	540	179	537	A35R	Unknown
112	286	858	284	852	286	858	C23L	Chemokine-binding protein
113	214	642	215	645	209	627	-	Unknown
114	345	1035	345	1035	346	1038	-	Unknown
115	146	438	147	441	145	435	-	Unknown
116	253	759	241	723	231	693	-	Unknown
117	266	798	266	798	265	795	-	GM-CSF/IL-2 inhibition factor
118	120	360	-	-	119	357	-	Unknown
119	204	612	-	-	204	612	-	Unknown
120	206	621	-	-	200	600	-	Unknown
121	315	945	159	477	306	918	-	Unknown
122	324	972	323	969	323	969	A51R	Unknown
123	547	1641	540	1620	525	1575	6 ORFs	Ankirin/F-box protein
127	-	-	-	-	186	558	-	Interleukin 10
132	145	435	153	459	133	399	-	VEGF

Tabella 2. ORF, open readin frame; nt, nucleotidi; aa, amminoacidi

ORF	1303 vs NZ2		1303 vs SA00		1303 vs IA82		1303 vs VR634	
	% Id nt	% Id aa	% Id nt	% Id aa	% Id nt	% Id aa	% Id nt	% Id aa
106	95.9	94.9	96.2	95.2	96.2	94.6	98.1	97.8
107	94.4	91.7	93.3	90.0	94.4	91.7	99.4	100.0
107.5	90.0	78.0	90.0	82.0	90.0	80.0	94.7	90.0
108	95.2	95.5	98.0	98.5	95.1	95.1	96.2	98.8
109	58.6	49	71.5	66.0	58.7	52.3	59.6	48.4
110	58.2	46.5	90.9	92.7	59.4	49.0	59.4	49.7
111	84.4	87.8	83.8	88.3	84.7	88.8	92.6	94.4
112	66.1	62.2	65.2	60.8	65.4	60.6	68.1	60.0
113	76.1	72.7	77.9	74.9	75.7	71.0	86.4	83.6
114	91.9	89.9	91.7	91.9	91.9	91.3	95.4	93.9
115	79.7	73.4	80.1	75.7	81.6	72.5	90.6	83.6
116	51.0	45.6	51.8	46.6	52.2	45.5	57.3	42.6
117	91.5	87.2	91.2	88.7	91.6	87.2	96.4	93.6
118	92.5	84.2	93.5	86.3	92.2	84.9	-	-
119	92.9	93.4	91.1	91.0	92.6	92.4	-	-
120	85.1	76.6	86.0	77.4	84.7	76.5	-	-
121	85.0	81.4	85.1	82.8	85.6	82.0	80.7	79.2
122	88.5	88.0	88.5	88.5	88.9	88.9	94.7	94.1
123	85.6	80.0	85.5	80.5	85.5	80.3	96.4	95.4
132	63.3	58.0	51.7	38.4	63.2	57.1	51.4	41.6

Tabella 3. Le percentuali di identità (id) nucleotidica (nt) ed aminoacidica (aa).

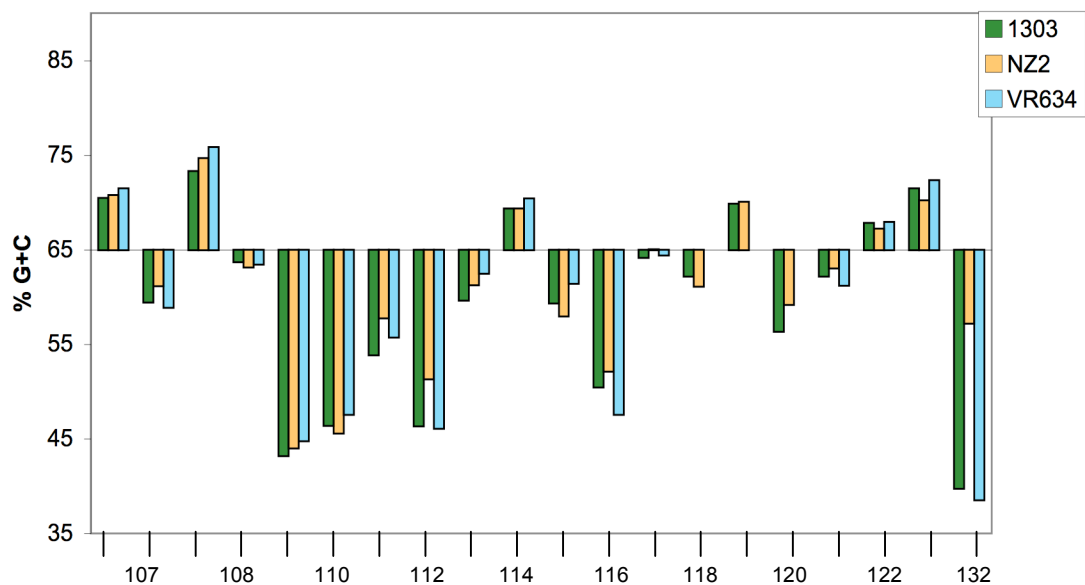


Figura 9. Il grafico rappresenta la percentuale di A+T e G+C nelle ORF 106-132 del PCPV 1303/05, OV NZ2 e PCPV VR634.

Le regioni terminali rappresentano circa il 20% dell'intero genoma e contengono geni importanti per la patogenesi e l'interazione ospite-virus. In particolare sono state prese in esame le sequenze ipervariabili delle ORF 109 e 110 ortologhe alle ORF A33 e A34 del VACV che codificano glicoproteine espresse nei virioni intracellulari con envelope (IMV) e nei virioni extracellulari con envelope (EEV). Per il VACV è stato dimostrato che mutazioni a livello di questi geni possono portare ad un'alterata formazione di EEV e all'incapacità di diffusione cellula-cellula con conseguente riduzione dell'infettività e della virulenza. L'analisi delle sequenze ORF 109 del PCPV 1303/05 ha confermato l'elevata variabilità nucleotidica ed aminoacidica di questi tratti genomici, con percentuali di similarità variabili da un 58,6% ad un massimo del 71,5%, a livello nucleotidico, e da un 49% ad un massimo del 66% a livello aminoacidico rispettivamente con OVNZ-2 e OVSA00 (Tabella 3). Mentre il livello di similarità riscontrata per l'ORF 110 varia da un minimo del 58,3% ad un massimo del 90,7 a livello nucleotidico, e da un minimo del 46,5% ad un massimo del 92,7% rispettivamente con OVNZ-2 e OVSA00. Per entrambe questi ORF è interessante sottolineare che la percentuale di similarità risulta superiore tra il PCPV 1303/05 e OVSA00 rispetto al PCPV VR634 (Tabella 3). In seguito ad allineamento della porzione genomica 106-109 di PCPV 1303/05, SA00, IA82, NZ2 e VR634, gli allineamenti sono stati analizzati sia con il programma RDP che con Splitree al fine di individuare possibili breakpoints di ricombinazione. Lo studio con RDP ha permesso di individuare due breakpoints all'interno di questa regione che potrebbero rappresentare possibili siti di ricombinazione tra prototipi virali rappresentati dal ceppo SA00 e PCPV 1303/05 (Figura 10). In particolare, la prima è rappresentata dalla sequenza GTGCCGT all'interno della regione terminale dell'ORF 108, mentre la seconda è stata individuata nella sequenza GATTTCT in prossimità della fine dell'ORF 109. L'analisi con Splitree ha portato alla costruzione di un network formato da 3 principali reticolati supportati da elevati valori di bootstrap (Figura 11). In base a questa analisi i ceppi appartenenti ai networks dovrebbero essere legati da

una storia evolutiva comune in cui possono essere avvenuti eventi di ricombinazione, confermando quanto già ottenuto con RDP.

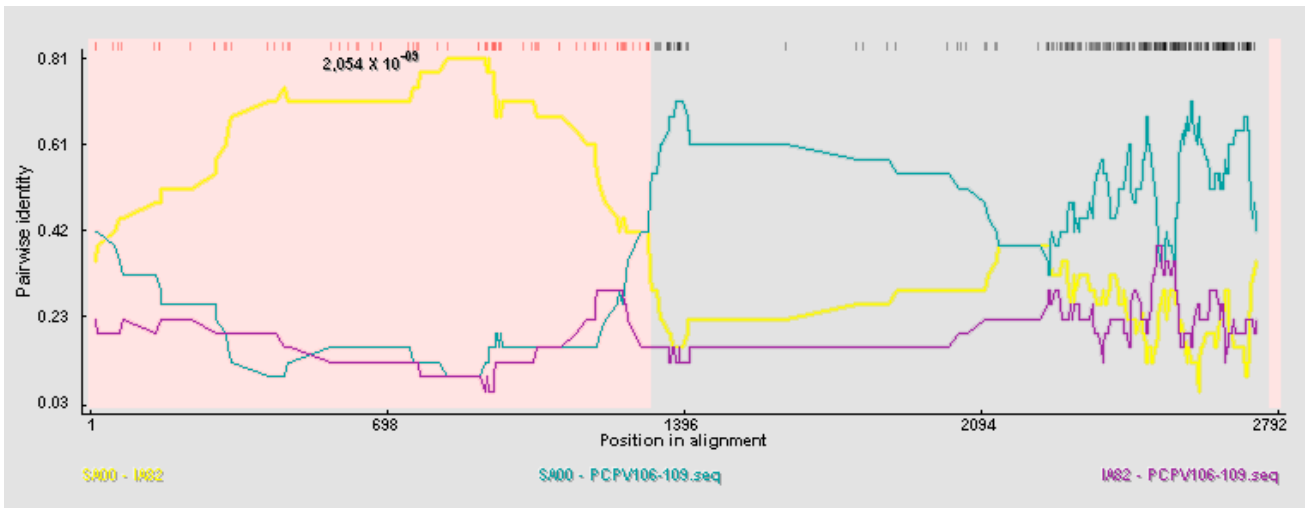


Figura 10. Il grafico generato da RDP in cui sono evidenziati i possibili punti caldi della ricombinazione in corrispondenza delle ORF 108 e 109 .

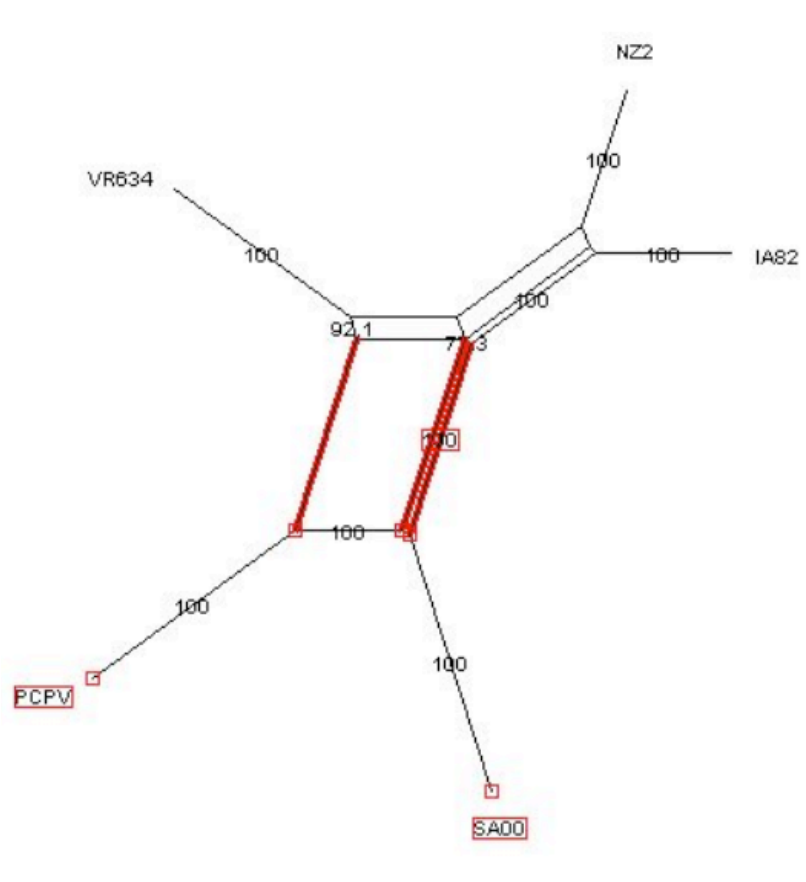


Figura 11. Lo split graph generato da Splitree

L'analisi delle sequenze aminoacidiche ha evidenziato che, nonostante la variabilità di sequenza, i motivi strutturali fondamentali sono conservati per entrambe le proteine come già evidenziato in altri PPV. Le proteine codificate da ORF 109 e 110 presentano infatti un dominio strutturale transmembrana amino-terminale e residui di cisteina conservati con una topologia strutturale simile a quella del VACV (Figure 12 e 13).



Figura 12. Allineamento aminoacidico dell'ORF 109 in cui è mostrato il dominio transmembrana (box rossa) e i residui di cisteina conservati (in giallo).

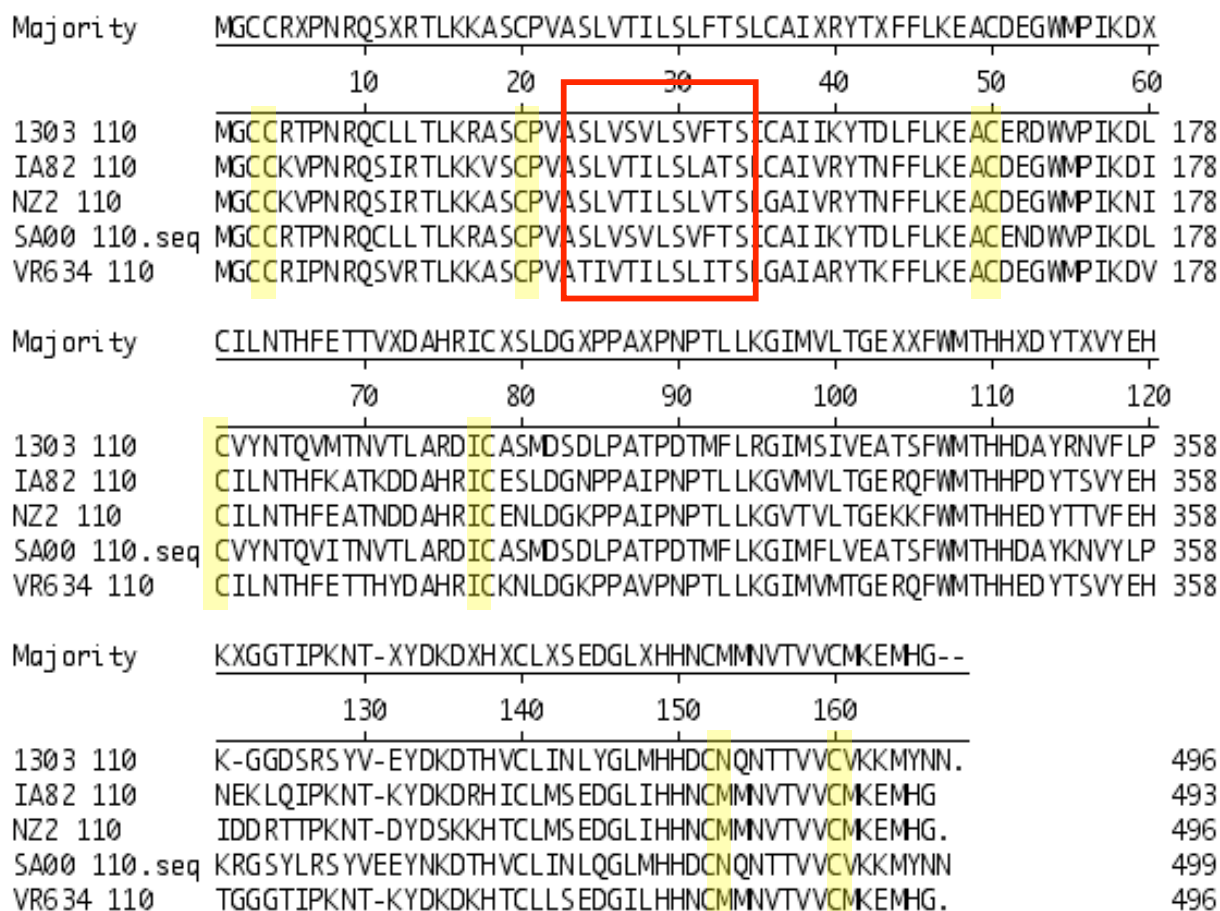


Figura 13. Allineamento aminoacidico dell'ORF 110 in cui è evidenziato il dominio transmembrana (box rossa) e i residui di cisteine conservati (in giallo).

Recentemente, è stato ipotizzato che le caratteristiche strutturali di queste proteine possano essere correlate alla specie-specificità dei diversi ceppi virali ed in particolare, l'analisi filogenetica effettuata da Delhon e collaboratori (2004) su queste sequenze, ha dimostrato che il ceppo SA00 isolato da capre forma un cluster separato dagli isolati di ovini OV, facendo ipotizzare che le proteine codificate dalle ORF 109 e 110 possano essere importanti per definire il tropismo di specie dei diversi ceppi OV. I risultati della nostra analisi, che ha incluso oltre alle sequenze di OV isolati da capre e ovini anche le sequenze dei PCPV (VR634, 1303/05), rafforzano invece l'ipotesi che questa netta divisione in clusters separati non sia legata alla specie-specificità, ma piuttosto alla presenza/assenza di motivi strutturali per gli MHC sottolineando il ruolo immunogenico di queste proteine (dati non mostrati).

L'analisi delle ORF 112 e 117 ha dimostrato che anche nel PCPV questi geni codificano per proteine coinvolte nella patogenesi con domini funzionali già noti in altri OPXV (35 KD major secreted protein), che hanno dimostrato un effetto modulatore della risposta cellula-mediata (Graham et al 1997). Le ORF 112 e 117 codificano per una chemokine binding protein (CkPP) e per il fattore di inibizione (GIF) del GM-CSF ed entrambe presentano un peptide segnale amino-terminale e vengono espresse nelle fasi precoci d'infezione. La percentuale di identità aminoacidica rilevata dopo il confronto con le varianti degli OV varia da un minimo di 60% ad un massimo del 62,2% per CkPP, rispettivamente nei confronti del PCPV VR634 e dell' OV NZ2, mentre la percentuale d'identità aminoacidica del GIF varia da un minimo del 87,2% nei confronti di OV NZ2 e IA82 ad un massimo del 93,6% in confronto al PCPV VR 634. Come negli OV, anche in questo caso i motivi strutturali sono conservati così come i 6 residui cisteinici considerati funzionalmente più importanti (Deane *et al.*,2000) (Figura 14). Le due proteine immunomodulatrici, che presentano tra loro una percentuale di identità aminoacidica del 21,4%, rappresenterebbero membri divergenti nella famiglia di questi fattori di virulenza in grado di legare le chemochine e le citochine.

Majority	MACLRVXLXVL-XXX--X-XL	CGSVHSXX	XXIGXRDFCS	XHAQXVXARX	XXWMRID-RXXX	
	10	20	30	40	50	60
1303 112	MKA-CVLLLVLLG	AFTNAAPASRNYL	HLDSDAKEL	FCLTHE-EVYAKF	RLQMRV	GIRHSP 172
IA82 112	MKAAAVLL	LALLGFTNAAP-VSN-Q	RLGSEEK	EKFCSTHHDE	VYARFRLQMRV	GVVRHSP 172
NZ2 112	MK--AVLL	LALLGFTNAAPLLES-Q	RSNSEEKAN	FCS	THNDEVYARFRLQMRV	GVVRHSP 169
SA00 112.seq	MK--VLL	LVLLGFTNAAPLVGN-Q	RLDSEEKAN	FCS	THQNEVYARFRLQMRV	GVVRHSP 169
VR634 112	MRA-FVLL	LALVGAFAHAVPMREHYGNP	DSAEKQK	FCL	THNTEMYAKFRLYMR	IQVRHSP 175
1303 117	MACLRVFLAVL	-----ALCGSVHSTPW	LGERDFCMAHAQD	VFARLQVWIR	ID-RNVT 151	
IA82 117	MACLRVFLAVL	-----ALCGSVHSAQW	IGERDFCTAHAQD	VFARLQVWMR	ID-RNVT 151	
NZ2117	MACLRVFLAVL	-----ALCGSVHSAQW	IGERDFCTAHAQD	VFARLQVWMR	ID-RNVT 151	
SA00 117.seq	MACLRVFLAVF	-----ALCGSVHSAQW	IGERDFCMAHAQD	VFARLQVWMR	ID-RNVT 151	
VR634 117	MACLRVFLAVL	-----ALCGSVHSTPW	IGERDFCAAHAQD	VFSRLQVWIR	ID-RNVT 151	

Majority LXDXSXXCXLXIE TPPSNFDADV---YVX-X---AAGINVS VX XINXGX-XPMXXVXTXX

70 80 90 100 110 120

1303 112 LYEPSNMCMMLDLEST-----NLESEYMSVASAEAGINISVALDLENVQIPFSYVGIGF 334
 IA82 112 LYVPSNMCMMDIEDSTDDIEESTEKEYTSTATGEAGVNVSVVALVGEVKIPFSYIGLGF 352
 NZ2 112 LYTPSNMCMMLDIEDSVEDIEESTEKEYASTATGEAGVNVSVVALVGEVSIPIFSYIGLGF 349
 SA00 112.seq LYTPSNMCMMDIEDSIMDIENSTEKEYTSAATGDANGVNVSVVALIGEGVSIPLSYIGLGF 349
 VR634 112 MYEPSNMCMMLDLETS-----RLDDDL SMAKFEANGINGSIALIGEDVSIPIFSYIGVGF 337
 1303 117 TAENNSACALAIETPPSNFDADV---YVA-----AAGINVSVA AINCGF-FNMRQVETTY 304
 IA82 117 AADNNSACALAIETPPSNFDADV---YVA-----AAGINVSVA AINCGF-FNMRQVETTY 304
 NZ2117 AADNNSACALAIETPPSNFDADV---YVA-----AAGINVSVA AINCGF-FNMRQVETTY 304
 SA00 117.seq AADNNSACALAIETPPSNFDADV---YVA-----AAGINVSVA AINCGF-FSMRQVETTY 304
 VR634 117 TADNNSACALAIETPPSNFDADV---YVA-----AAGINVSVA AINCGF-FNMRQVEATY 304

Majority NXARRQMYVYMXXS WDPWVXDTPQXSF SQEXXX-XXXLXLXVLEKXRLYIXVGCX-XXX

130 140 150 160 170 180

1303 112 NPF-SK-YLYMNVSSWSPWDQLTEDLSKNNSWG-----IKQLMESQKLFIQVGCDHQKF 490
 IA82 112 NPS-TDGYLYVNVSSRAPWVQQT PDL SANSWG-----IKQVLEKEL LAIQIGCDNQKF 511
 NZ2 112 NPSLEDGYLYVNVSSRAPWVKQTS DL SANGGWG-----IKQVLEKEL LAIQIGCDNQKF 511
 SA00 112.seq NPSLADGYLYVNVSSRAPWVQQTLDL SANGGWG-----INQILEKEL LAIQIGCDNQKF 511
 VR634 112 NPLLSR-YVYVNVSSWSPWDQLT AELTSYDFWG-----LRQILAKERLIIQLGCDHQKF 496
 1303 117 DTARRQMYVYMD--TWDPWVLDNPQIF SQAYENDTLPYLLEVL E FARLYIRVGCT---- 466
 IA82 117 NTARRQMYVYMD--SWDPWMLDDPQPLF SQEYENETLPYLLEVL E LARLYIRVGCT---- 466
 NZ2117 NTARRQMYVYMD--SWDPWVLDNPQIF SQEYENETLPYLLEVL E LARLYIRVGCT---- 466
 SA00 117.seq DTARRQMYVYMD--TWDPWVLDNPQIF SQEYENETLPYLLEVL E LARLYIRVGCT---- 466
 VR634 117 DTARRQMYVYTD--TWDPWVLDNPQIF SQEYENDTLPYLLEVL EFSRMYIRVGCT---- 466

Majority XXXXX---XVPGXXPFEVITGIDYPHEXMEFLQHV--X---XRXNRX XNPAKLXFXLEV

190 200 210 220 230 240

1303 112 PEEPTLRPTSPRTTTSQINTTPDLDEE EEEY-EDIIPTPADVNVNRKRNPALDFSLIT 667
 IA82 112 PEEPTTT--PSLVTTTTLPTTTLNPNNTD---TTP-TPTGASVDGKRNPDDIDFSLIV 673
 NZ2 112 PEEPTTT-PPSPVTTTTLSSTT-PDLNEENTE--NTP-TTGASVDRKRNPADIDFSLLV 673
 SA00 112.seq PEEPTTTQPPSPVTTTTLSSTT-LDLTDENTD---TTPLTTTSAVNRKRNPDDIDFSLLV 679
 VR634 112 PEEPTPRTTPAPQTTPEE-----ELEEEDY EYDELKPTPPNIYVDRKRNPGLDFSLLA 661
 1303 117 -----VSGEQPFEVIPGIDYPHHSIELLQHV-----QRPNRRFSPAKLHIDL EV 598
 IA82 117 -----VPGEQPFEVIPGIDYPHTGMEFLQHV-----LRPNRRFAPAKLHMDL EV 598
 NZ2117 -----VPGEQPFEVIPGIDYPHTGMEFLQHV-----LRPNRRFAPAKLHMDL EV 598
 SA00 117.seq -----VPGEQPFEVITGIDYPHTSMEFLQHV-----LRPNRRFAPAKLHMDL EV 598
 VR634 117 -----VPGEQPFEVIPGIDYPHHSMEFLQHV-----QRPNRRFSPAKLHIDL EV 598

Majority	DPRCVSXXKAXLQDAC SAKKARXPLYXAG-HGDNHP XRRXX XPVPRPQNV- X--XXXC	
	250 260 270 280 290 300	
1303 112	DPRCVESVDLHVELKDAC IAYKHK SPLMLRGQYGDGDEV RKEIKGLSNSYNT-----C	826
IA82 112	DPRCVTSVNLHFE LKDAC MDYKKE SPLS LKGKYGDSELVKQEI KDVGKNHNM-----C	832
NZ2 112	DPRCVTSVDLHVELRDAC IDYKQESPLS LKGKYGDGELVKKEIKDVGKNHNM-----C	832
SA00 112.seq	DPRCVTSVDLHVELRDAC IDYKEASQLS LKGKYGDGELVKKEIKDVGKDHNM-----C	838
VR634 112	DSRCIESVDLYVELKDAC INYRHTSPLRLKGEHNNGEAVRKEIKLTD SHTI-----C	820
1303 117	DYRCVSAVHVKAF LQDAC SARKARTPLY FAG-HASNHPDHRPKNPVPRPQQVWSPSSRKC	775
IA82 117	DHRCVSAVHVKAF LQDAC SARKARTPLY FAG-HGCNHPDRRPKNPVP RPQHVS SPISRKC	775
NZ2117	DHRCVSAVHVKAF LQDAC SARKARTPLY FAG-HGCNHPDRRPKNPVP RPQHVS SPISRKC	775
SA00 117.seq	DYRCVSAVYVAF LQDAC SARKARTPLY FAG-HGSNHPDRRPKNPVP RPQHVS SPMSRKC	775
VR634 117	DYRCVSAVHVKAF LQDAC SARKARTPLY FAG-HGSNHPDNRPKNPVPRPQQVWSSSRKC	775
Majority	SMXTXX--R-	
	310	
1303 112	SLNLPDSN.	856
IA82 112	SLNLSG-H	856
NZ2 112	SLNLP-GN.	859
SA00 112.seq	SLNLSG-H	862
VR634 112	SMNMPYDK.	850
1303 117	RMQTV---H.	796
IA82 117	SMQTA---R.	796
NZ2117	SMQTA---R.	796
SA00 117.seq	LMQTA---R.	796
VR634 117	RMQTV---R.	796

Figura 14. Allineamento delle ORF 112 e 117 in cui sono evidenziati in giallo i motivi conservati

La nostra analisi della regione terminale destra ha inoltre permesso di identificare nel genoma del ceppo PCPV 1303/05 le ORF 118, 119 e 120 presenti in altri PPV, ma assenti nel PCPV VR634, questi geni codificano proteine con funzione sconosciuta che potrebbero rappresentare ulteriori fattori di virulenza. E' noto infatti che questi geni vengono facilmente perduti a seguito dei fenomeni di riarrangiamento e delezione tipici dei ceppi adattati da più tempo alla crescita *in vitro* come il PCPV VR634. Nel genoma di PCPV 1303/05 sono state inoltre identificate diverse ORF (123, 126, 128, 129) codificanti per delle ankirin binding proteins, tali proteine fanno parte della famiglia delle *ankirin repet containing protein* (ARP) capaci di legare altre proteine per formare complessi regolatori coinvolti nei processi di controllo del ciclo cellulare e della differenziazione. Altre specie di poxvirus codificano per

proteine simili che hanno diverse funzioni correlate all'interazione con l'ospite, l'inibizione dell'apoptosi e della virulenza.

Come nel PCPV VR634 anche nel PCPV 1303/05 non è stata rilevata la presenza dell'ORF 127 che in altre specie di PPV codifica per un fattore omologo all'IL-10. L'assenza di tale ORF e della proteina da questa codificata, potrebbe fornire importanti indicazioni sulla risposta immunitaria che fa seguito all'infezione da PCPV nel bovino.

L'analisi delle sequenze dell'ORF132, codificante il fattore di crescita endoteliale VEGF, ha confermato l'elevato grado di variabilità nucleotidica ed aminoacidica già segnalata da altri Autori (Mercer *et al.*,2002, Inder *et al.*,2008) (Figura 15); anche in questo caso la percentuale di identità della variante 1303/05 risulta maggiore quando confrontata con ceppi di OV (58%) piuttosto che con il PCPV VR634 (41,6%).

Majority	MKLL-X--QVSVALLXCLXQXPWCXASST-----XXXXSXVDWSXVLDKSXCKPRDT	
	10 20 30 40 50 60	
1303vegf	MKLLSF--KLSVIITVCLHQYCMLSASPTT-----QIP-STTPRRWTDVLGSGSCKPRET	52
BPSV V660	MKCLIVCMQWSLALLLCLQCVKWMQAAPAT-----SNNDNSRVTPWTEVYGNSHCRPMPT	55
BPSVAAR98363	MKCLIVCMQWSLALLLCLQCVKWMQAAPTS-----SNG-NHEVEKWSVDYDNSRCQPMKT	54
IA82VEGF	MKLL-----VGILVAVCLHQYLLNADSST-----KRWSEVLKGS ECRPRPI	41
NZ2vegf	MKLL-----VGILVAVCLHQYLLNADSNT-----KGWSEVLKGS ECKPRPI	41
nz7Vegf	MKLTAT-LQVWVALLICMYNLPECVSQSN-----D SPPSTNDWMRTLDKSGCKPRDT	51
PVNZ VEGF	MRL L---IQCSVVLILCLIQIHWIYASSGG-----SSN SGGNLADWMQTSDKSKCMPRDT	52
sa00vegf	MKLTAT-IQVWVALLICMYNLPKCVSQDN-----D SPPSTNDWVRTLDKSGCRPRDT	51
VR634	MKLITT-LQFAVALLICMYNLPECFSGSTGGSS SGGSS SASSLSSWLDTSEKS SCKPRDT	59
Majority	WVYSDEYPELTSQRYNPPCVTMRCGGCCNDESLECVPTETANVTMXVMVTXVS-----	
	70 80 90 100 110 120	
1303vegf	WVRISDEYPSLTSQRFSPPCVSVMRCGGCCNDESLECVPTEEANITMEVMSVSV-----	106
BPSV V660	TVRVSDEYPNDTSERYNPQCVTLMRCGGCCNDESLECVPTETSNTVMQLMVTSAHNGG SN	115
BPSVAAR98363	PVKVSDEYPDNTNDRHSPPCVTL MRCGGCCNDESLECVPTETSNTVMQIMTT SAYN----	110
IA82VEGF	WVVSETHPELTSQRFNPPCVTL MRCGGCCNDESLECVPTEEANVTMEFMGVGV-----	95
NZ2vegf	WVVSETHPELTSQRFNPPCVTL MRCGGCCNDESLECVPTEEVNTMELLGA-----	93
nz7Vegf	WYVLGEEYPESTNLQYNP RCVTVKRC SGCNNGDGQICTAVETRNTT VTSVTGVS-----	106
PVNZ VEGF	WYIGNEYPGSVGERYNPQCVTVKRC SGCNNGDNKVCTSTETANTT VTMVTGVS-----	107
sa00vegf	WYVLGDEYPENTNLQYNP RCVTVKRC SGCNNGEGQICTAVETRNTT VVSVTSVS-----	106
VR634	WVQLISEYPGDVEQRYNP RCVTVRRCGGCCNDESQICTAIETANVTVT VMLTGVS-----	114

Majority	---SSSGSNS---XMQRISFVEHTKCD CRPXTTXXP-TTTREPRR-----	
	130 140 150 160 170	
1303veg	---SSTDSNP---GMQNMQFVEHLHCDCRPKTKPTP-EPQDQPRR.	145
BPSV V660	DNGSGGGIGS---GMREMSFLQHNKCECKPKSTPPP-ETTEESHRR	157
BPSVAAR98363	DGGTSGGISS---GMREMSFLQHNKCECRPKSTPPP-ETTEESHRR	152
IA82VEGF	---SSTGSSV---STQHLEFVEHTKCDQPRGGQQ--TTPTPRRRRRRAY	137
NZ2veg	---SGSGSN----GMQRLSFVEHKKCD RPRFTTTPPTTRPPRRRR.	134
nz7Vegf	---SSSGTNSGVS TNLQRISVTEHTKCD IGRTTTTT- TTTREPRR.	149
PVNZ VEGF	---SSSGNGAS--SNFRDISISEDKKCECREKFTTTPPTTTPPRR	148
sa00veg	---SSSGANSVSNLQRISL TEHTKCD IGRTTTTT TTTREPRR	149
VR634	---GSTGATS---NFQTISVEEHTKCKCEFTSPPTTTTKEPR.	153

Figura 15. Allineamento aminoacidico dell'ORF 132 codificante il VEGF-E con i motivi Cystein Knot motifs conservati (in giallo).

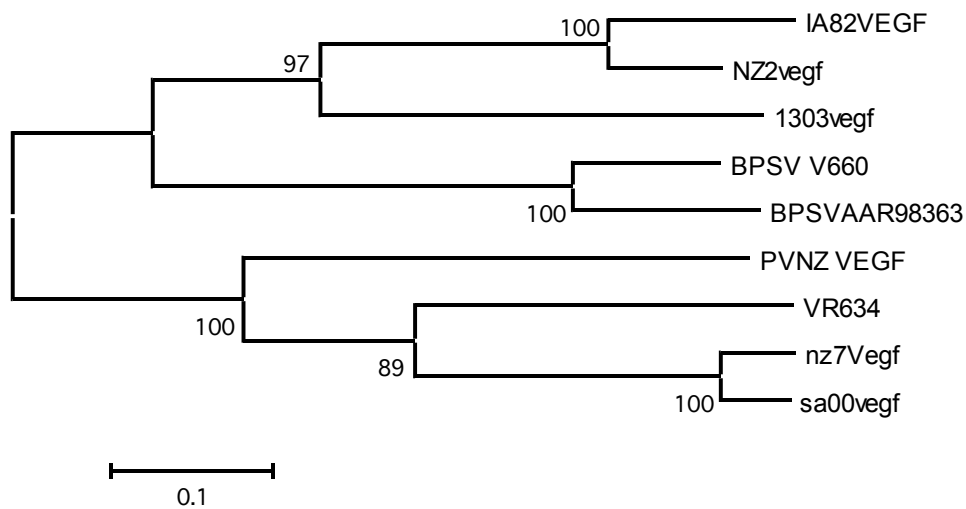


Figura 16. Albero filogenetico costruito sulla base delle sequenze aminoacidiche del VEGF-E.

Precedenti studi di filogenesi realizzati su varianti di VEGF provenienti da ceppi virali isolati in diverse aree geografiche, hanno dimostrato che non esiste alcuna correlazione con l'origine geografica, per quanto concerne la formazione dei raggruppamenti evidenziati negli alberi filogenetici, piuttosto è stata evidenziata la presenza di due gruppi divergenti NZ2-like che comprende le varianti più divergenti e NZ7-like che comprende le varianti più conservate. Anche l'analisi filogenetica da noi effettuata conferma la formazione di due raggruppamenti NZ2 e NZ7 like, all'interno di questi si evidenzia come i due ceppi di PCPV si collochino in un caso,

PCPV 1303/05 nel raggruppamento NZ2-like e nell'altro, VR634 nel raggruppamento NZ7-like (Figura 16). Nei due raggruppamenti si evidenzia inoltre la presenza di varianti codificate dal BPSV nel gruppo NZ2-like e dal PVNZ nel raggruppamento NZ7-like rafforzando la presenza di due tipologie di VEGF-E codificate dai virus appartenenti al genere PPV.

L'elevato grado di conservazione della variante VEGF NZ7-like e l'elevata correlazione tra questa e quella di PCPV VR634, ha fatto ipotizzare che la variante NZ7-like possa essere il risultato di un recente evento di ricombinazione tra PPV di specie diversa (Ueda *et al.*,2003). L'ORF 132 si presenta infatti particolarmente adatta alla realizzazione di eventi di ricombinazione visto l'elevato contenuto in A+T. Le regioni ricche in A+T sono infatti considerate quelle acquisite più recentemente a partire dal genoma di cellule ospiti o di altri virus co-infettanti (Da Silva *et al.*,2005). Nella variante 1303/05 la percentuale di A+T si presenta particolarmente elevata attestandosi attorno al 60% rispetto al 40% di NZ2, ma l'analisi filogenetica ha dimostrato una maggiore percentuale di similarità con le varianti NZ2-like, questo smentirebbe l'ipotesi di un'origine della sola variante NZ7 da un evento di ricombinazione tra OV e PCPV; la stessa possibilità infatti dovrebbe poter essere attribuita anche alle varianti NZ2-like. L'analisi del VEGF-E condotta con Splitree ha infatti evidenziato l'esistenza di reticoli supportati da elevati valori di bootstrap tra i ceppi NZ2, IA82 e PCPV 1303/05 un network altrettanto evidente è statao evidenziato tra NZ7, SA00 e VR634, sottolineando la possibilità di eventi evolutivi in comune (Figura 17).

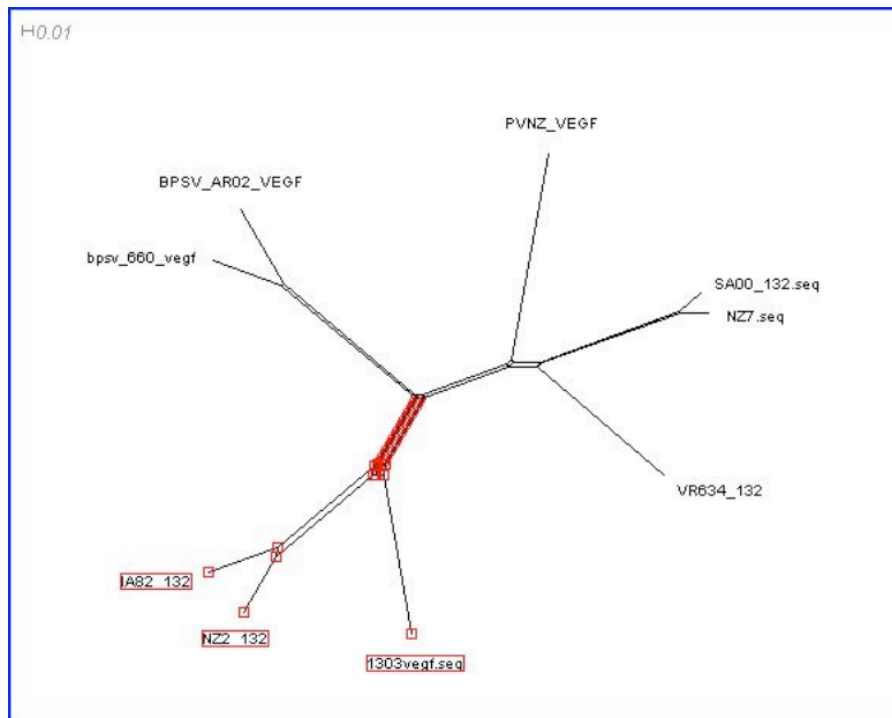


Figura 17. Split graph risultante dall'analisi del VEGF-E.

L'analisi della sequenza aminoacidica e della struttura secondaria ha dimostrato che il VEGF 1303/05 presenta motivi strutturali molto simili alle altre varianti con la conservazione dei residui di cisteina (Cystein Knot Motifs) (Fig. 15), dei motivi funzionali e della signature (Fig 18). Lo studio del modello tridimensionale, realizzato sulla base del cristallo del VEGF NZ-2, ha dimostrato la conservazione del dimero caratterizzato da monomeri costituiti da un'alfa elica e diversi foglietti beta che si uniscono tra loro mediante ponti disolfuro intracatena (Figure 19 e 20).

```

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

1303vegf      MKLLSFKLSV IITVCLHQYCMLSASPTTQIPSTTPRRWTDVLGSGSCKPRETVVRISDEY 60
VEGFH_ORFN2  ---MKLLVGLVAVCLHQYLLN-----ADSNKGWSEVLKGSECKPRPIVVPVSETH 49
              :: : :: :: : ***** :          : : : : : * : : * : * : : :

1303vegf      PSLTSQRFSPPCVSV MRCGGCCND E SLECVPT E E A NITMEVMSVSVSSTDSNPGMQNMQF 120
VEGFH_ORFN2  PELTSQRFNPPCVTL MRCGGCCND E SLECVPT E E VNVSMELLGASGSGSN---GMQRLSF 106
              *.*****. *****: ***** *****. *: : : : : * * : :   * : : *

1303vegf      VEHLHCDCRPKTKPTPEPQDQPRR--- 144
VEGFH_ORFN2  VEHKKCDCRPRFTTTPPTTRPPRRR 133
              *** : *****: .*** . : * *
  
```

Figura 18. Allineamento della sequenza del VEGF-E dell'NZ2 e del 1303/05. Le linee blu rappresentano l'inizio e la fine del cristallo e il rettangolo rosso evidenzia la signature.

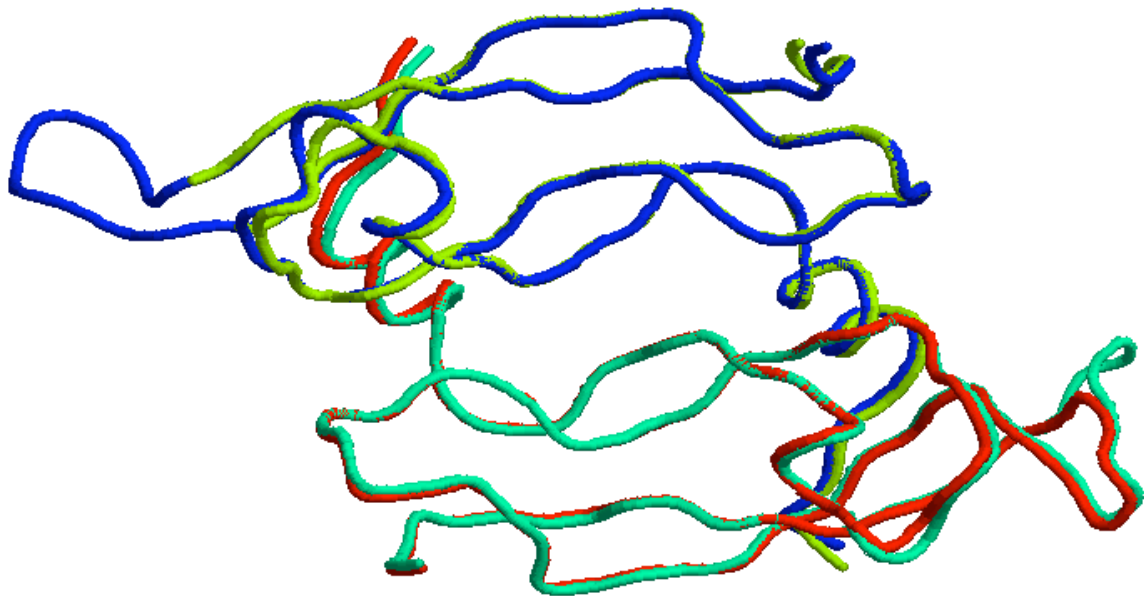


Figura 19. Sovrapposizione del modello tridimensionale della variante VEGF-E del 1303/05 con il VEGF-E dell'NZ2.

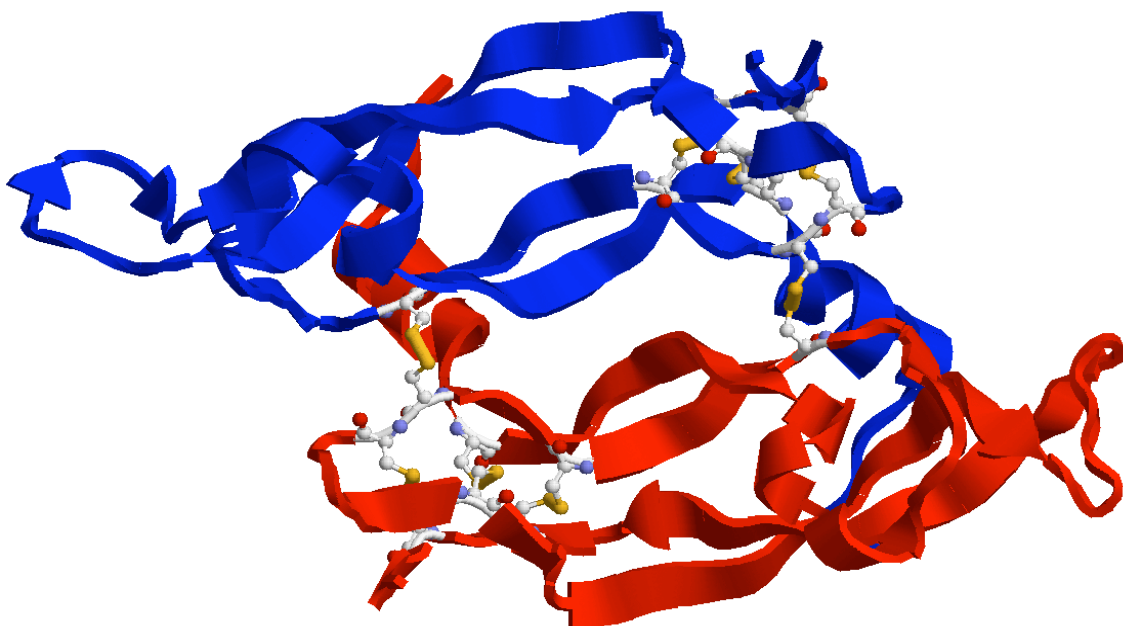


Figura 20. Struttura tridimensionale della variante VEGF-E del 1303/05 è possibile evidenziare la struttura dei monomeri costituiti da un'alfa elica e foglietti beta e la presenza dei ponti disolfuro.

La porzione C-terminale è rappresentata da un loop di difficile risoluzione, fondamentale per l'interazione della citochina con i recettori cellulari R1, R2, NP-1. A questo proposito sono stati analizzati i residui aminoacidici considerati critici per l'interazione con il recettore neuropilina 1 (NP-1) come dimostrato sperimentalmente da Cebe Suarez et al. (2008). Questi Autori hanno dimostrato che i peptidi RPPR, tipici di alcune varianti NZ-2, sono in grado di promuovere l'interazione con NP-1 mentre peptidi DKPRR ed EPPR presentano rispettivamente bassa e nessuna affinità per tale recettore come nella variante NZ7. La variante VEGF 1303/05 presenta un peptide C-terminale QPRR che mostra un' elevata similarità con EPRR, infatti l'acido glutammico (E) è polare, ma affine alla carica negativa, come la glutammina (Q) ed entrambi presentano un ingombro sterico simile. Da questa analisi si può ipotizzare che, come per la variante NZ7, anche la 1303/05 non presenti affinità per il recettore NP-1. Inoltre, tutte le varianti VEGF dei PPV presentano siti di glicosilazione ricchi in treonine e proline nella porzione C-terminale, l'analisi dei residui aminoacidici presenti a questo livello dimostra un numero molto ridotto di siti di glicosilazione nella variante 1303/05 (Figura 21).

Un recente studio effettuato da Inder e collaboratori (2008) ha dimostrato che la rimozione della regione C-terminale glicosilata del VEGF virale aumenta l'affinità di questo fattore per il recettore R1 che non viene normalmente attivato da nessuna delle varianti VEGF-E finora analizzate. L'assenza di interazione con il recettore R1 sarebbe correlata ad un'ulteriore meccanismo di immunomodulazione da parte del virus che si esplica in un minore richiamo di linfociti nel sito d'infezione.

La scarsità di siti di glicosilazione nella variante 1303/05 potrebbe suggerire un differente pattern di attivazione recettoriale da parte di questo ceppo di PCPV.

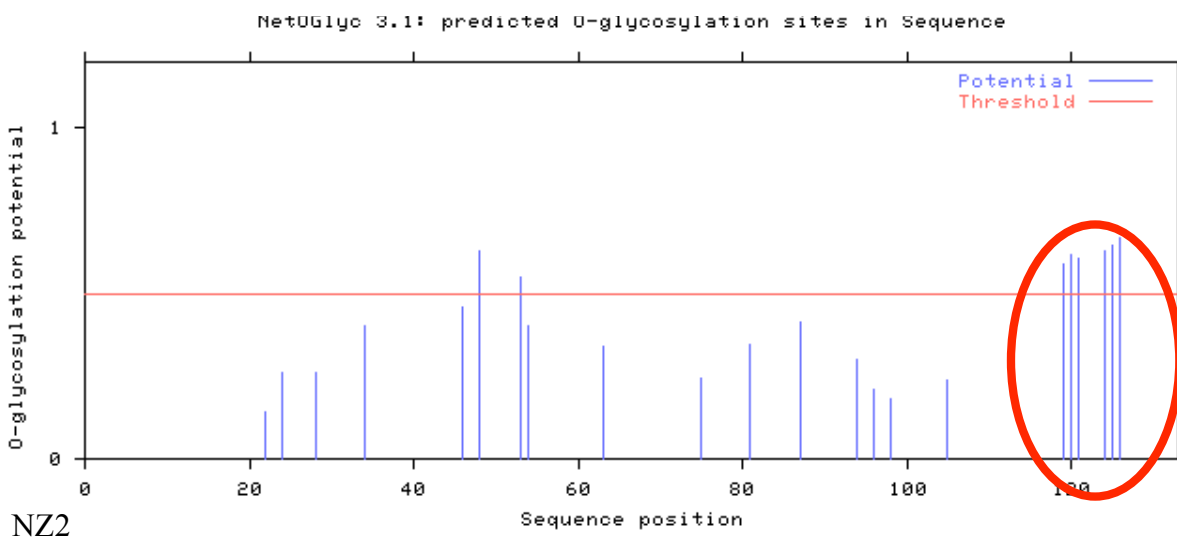
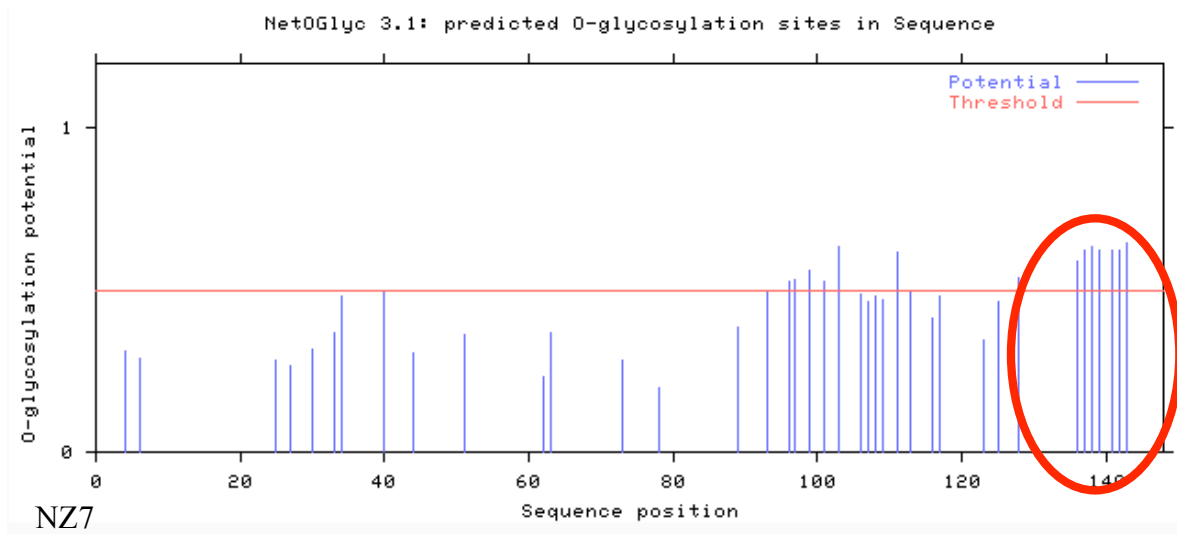
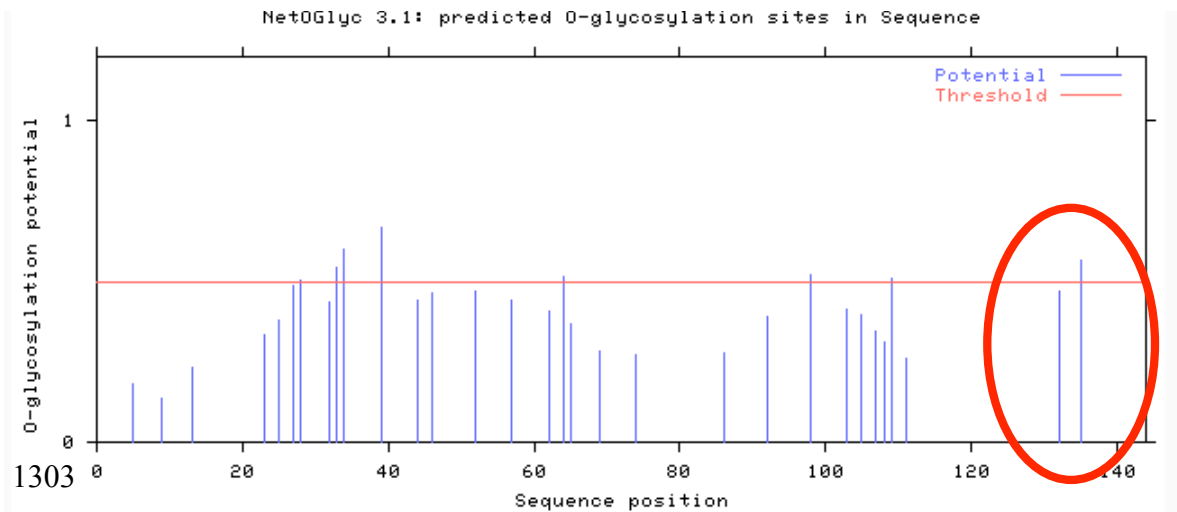


Figura 21. Predizione dei siti di glicosilazione eseguita con PSIPRED del VEGF-E delle varianti 1303/05, NZ7 e NZ2.

In conclusione, questo studio ha prodotto dati importanti per comprendere meglio le dinamiche di replicazione dei PPV in substrati cellulari permissivi ed ha fornito nuove conoscenze relative ai fenomeni di interferenza virale a seguito di co-infezione. Questi risultati sono considerati un importante punto di partenza per effettuare studi sulle ricombinazioni *in vitro* ed *ex vivo*. Inoltre le analisi svolte sulla regione terminale destra del genoma del PCPV 1303/05 contribuiscono ad una maggiore conoscenza dei geni coinvolti nell'interazione con l'ospite e nella patogenesi, fornendo importanti spunti per il confronto tra virus selvaggi e virus altamente adattati in coltura cellulare. I risultati ottenuti contribuiscono a colmare fondamentali gaps nella conoscenza dei fenomeni di ricombinazione specifica dei PPV, considerati come la base dell'evoluzione di questi virus a DNA. L'approfondimento sui fenomeni di ricombinazione virale contribuirà inoltre a migliorare i livelli di biosicurezza di nuovi farmaci antivirali e dei vettori PPV utilizzati a scopo vaccinale e per la terapia genica.

APPENDICI

APPENDICE I

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AGTGGTGGTGTTC	TCGAGCACCACGCCCT	TGCGTGAGCGCGGCCACT	TGCAGTGGAAAGCGCAACT	CGTGCTTGATGAGCGAGGCC	ACGGCCGGGTCCAGG				900
TCCACGGCCAACACGGCC	TCGCCGACCACGGGGAC	GTCGCCGTCCGCCAT	CACGGAGACAAC	TGGGTCATCTCTTT	TCGCCTTTTTATTC	AGGATCAT			1000
TATTC	TTTCGTTGACGAGG	TCCATGAGCATC	TTGATGGCGGGGGC	GGCGGGCGCCGCT	CGCCGCCAGATC	TGCCGATGCGCGT	GAGCATGTCAGC		1100
AGCGCGCCCTCGTT	CAGTCTCTCCATTT	AGAGGGCGTGAGGGC	CGCGCTGTCGCGAC	GGGAGCCGCTCCCG	AGCAGCGAGCGC	GACGGCGA			1200
AGGGGAGCAGCGC	TGCGGCGCACCGCGT	GATAACACAC	TCCGCGAGCGCGG	CARGAGCTCGGAG	TGCACGAGCACC	ATTTAGATGCGCGCGGGTTTA			1300
ATTTGTCGTGTGCGGT	GCGCTGCCGTCCCT	TGCGCTGCCGCGAC	CGGCCGCTGCCCT	TGTCGCCCTTGGGC	TCGGCGTCCGATGTCG				1400
SCGAGCCGCTTTC	ATGTGCGAGAAT	TGCGGAGCAGGAT	TGCCGGGTCGAGAC	AGCGCTTGACGACGCT	TCGTCGGCGAAGT	CGTAGCAGATGCGCT			1500
CTGTTCTGGC	AGAACCAGGTC	TTCGATGATCAAC	ACCCCTCTGGT	CCCCGGCCGACCGC	ATGATGGCCATGGCC	CGGATGAGCCTTCT	TTCGATCC		1600
SCGAATGGACAT	TGGACCGGAGCAG	TTCACCGTCGGAGT	CGGAGCGTTG	CAGCAGCAGAGG	TGCTGATGCTGGC	GCGCCGTGAC	CGGGGATGTC		1700
TTGATGGTCTGGC	AGAGCACCAGCGAC	CGTGTGATGTCGCC	CCCGTAGTTA	TGAGGGCCAAAG	AGTGTGGCGACCGCT	TGCGTGTGCC	CATAT		1800
CGTCGAGAATGAT	GAGAACCTTCTCT	CTCGTTCGCTG	TGCCGTGGCGCT	CGATCTTGGC	GACCGAGAGTTG	ACTCGAGCTCC	TCGTGGTGT		1900
SACCTTGTGGAT	TGGTCCGGCCAC	ACGAAGCCGCT	GAGCGGCTGT	AGACGGCGTGA	AGCAGGATGTC	TTGAAGCGCGC	ACGAGCGTCCG		2000
AAGAGCGAGAGC	AGTAGCGGTCTT	GGCTGAGCCG	GACCGCCGAC	AGCGCCATCC	TGAAGGGCGCT	TCGATGAGGCT	TCGCCGTTGA	AGCGCACTT	2100
CTTGCACGACAT	CCATCGTATATTT	ACTGTCACTAA	ATACCGGCTCC	GAGAAATAGAA	ATTTAGAGCCTCC	TAGAGCACACCG	AGGCTCATCGGC	CACG	2200
ATGGCACATAAC	CGTTGAGCGCGATA	ACGAGTCGGCT	TAATAAC	AAC	TACGTAGCGACGG	TAAGCGCC	AGAAGGCC	ATTCGAC	2300
TCCTCCGCTAG	TTGCGCGCTGCT	TATAATAACT	TGCTGTACT	TGGTGTATAT	ATTAGC	ACTGGA	ACTAGATC	TGCAG	2400
ATACCATCAACA	CAGAATGTGA	AAGATTTG	ACCAGGTGATA	AATGGTGTCT	AACTAAGC	ATTATCCGGCTAC	TTGGGAC	GCTGCC	2500
CATAGCCCTTGGT	CAAACTTACCC	ACTAAAGACAT	TGGTTAAC	ACATATCC	TTGGCTAG	AAAAATATCTT	ACGGAAAC	ATGGG	2600
TATTTAAGTCTT	TGGGAGAACTAC	CAGAATTTG	GAAAGGTC	TGTTACTG	ACCAACA	AAAAAGATTTCT	TTTGGCTG	TCAATA	2700
AAATGGTTCG	TGACGGACCG	GAATAGAC	AGTGTGCT	TAACG	TAAGCGGGC	TCGTGCCCGT	ACGCTCTC	TGTC	2800
TAGCATGCGCC	ATTATCAAGT	ATAGACCTTT	TTCTAAA	AGAAGAGG	GTGAGCGTGAC	TGGGTACCT	ATATAAA	AGACCTAA	2900
STTATGACAA	ATGTTACG	TTGGCAGAG	ATATATG	TGCCCTAT	TGGACAGCG	ACCTTCTGCTAC	ACCAGAC	ATATGTT	3000
TCGTGGAAGCT	TACCAGTTTT	TGGATGAC	TCATCAG	CAGCATAT	AGAAACGTAT	TTTGGCCAAA	AGGAGATAG	TCCGTC	3100
AGATACGC	ACGTGTGCTT	ATAAACCTG	TACGGTCT	TAATGC	ACCACGACTGC	AATCAAA	ACAACCGT	CTGCTCG	3200
AAATATAC	TATTTGAAT	GCAAGAC	CAATGTC	GCACCTTCA	AATCTGACCT	ATTTGGAC	AAATCTAC	GCACCG	3300
CGCGGTGAT	TTGGGAAT	TGTACCA	ATAAAAC	CGCGCAT	TTCCGGG	CTTA	AAAGCTT	CAAGC	3400
TCATGCCCG	GACTGCTACT	TTCGCTG	TCAACGGC	AACCTG	TGCCGTGC	ACGGAGG	CTTCA	AGGCTAC	3500
CACCAGC	ACGGCAAAAC	AATCTGT	TGTGGC	AAGGACTT	CAACATAG	TGCGACCTT	CAGGAT	TCCAG	3600
TCGGCGCT	CGTGGAGATA	CTCGAGTT	CTACAGT	GAAACTGG	GGGACTATC	AGTTATCC	TAAACCC	AAGTGCC	3700
AGAAGCTC	TGCTGTTCCG	TAGCGGGT	GTGCATAG	TGGATG	TGCGAGACT	TAGACAT	GACCAT	ATAA	3800
ATCTTTTAT	CAGTTTGT	TATGGTAG	TTAAAAC	ATAAATAG	TAAAGCT	AAAACGG	CCCGTGG	GATCG	3900
TGTTGGT	GCTGTAGG	CGGTTCA	CAACCGT	TGCGCT	TGCTAGT	CGTAACT	ACCTAC	CTCG	4000
AGAGGTG	TACCGAAAG	TTTAGACT	TTCAGAT	TGCGGT	AGGTATA	AAGACAG	TCCAT	TACG	4100
AATTTGG	GAATCGAA	TACATG	TCTGTC	ATCGG	CAGGGCGT	GGGATA	AAACAT	ATCG	4200
TACGTTGG	TATGGATT	CAATCC	TTCC	AAGTACC	TGATAT	GAACGTG	CTTCC	TGGT	4300
ATAGTTGG	GGTATTA	AAACAGCT	CA	TGGAAAG	CCAGAACT	GTTCAT	CCAAAG	CTTCC	4400
ACCCTCAC	CTCGTAC	AACGCTT	CA	AAATAA	ATACG	ACTCCG	AT	TTG	4500
AaTGT	aACAGGA	AGCGCA	ATCC	AGCGC	AGCTAG	ATTTCT	CGTT	GATC	4600
GCTTGC	CATCGAT	CAAAAC	CAAGT	CGCGT	TGATGT	TGCGAGG	ACAGT	ACGAA	4700
ACAAC	CGTGTAG	CTAACC	TGA	ACCCAG	ATAGCA	ATTTG	TA	AAACGT	4800
CAAAAA	ATATCC	CGCAAC	CCGCA	ACCAT	TGATTT	CGTTGG	TAAT	CTG	4900
TAGA	ACTTGG	CTTGG	CCG	CAGAG	CGCGTA	CAAAAA	AATCT	CGT	5000
TGGA	ATAGGG	CGTAC	ACGGT	CCCCG	AACATG	GATTCGG	GGCT	AGG	5100
TCC	ACCCTCA	ACGGCG	GAGGG	ACGCT	CAACCCG	CTTGGG	TCA	AAAGG	5200
ATCG	CCACTT	CCCGC	ATCG	ACG	CCCGG	TACC	ACACT	AGG	5300
ATCG	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	5400
ATCG	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	AGGTC	5500
AAAC	CGCAG	ACATG	CCCGT	TTCCG	CGCCCT	TAGTCA	AAAG	ATGTC	5600
CGCG	ATGCTTCC	TCCCG	TGCC	ACAG	AGTCTG	TGACAC	AGG	CCGCT	5700
CAT	GGGAC	CCGCA	GTCTACT	ACTTTC	GAGAG	CGGGC	ATGAT	GAG	5800
CGCT	ACAAC	CGCGG	CAGCT	CTG	CGGTC	ACGCG	CGC	CGC	5900
CT	TGCG	CTT	CGAC	ATC	ACG	CGG	CT	CGC	6000
CAC	GGG	GAG	GGG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	6100
CGG	AG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	6200
TCG	TGG	CCAA	ACG	AACT	TCG	GAC	GT	CGG	6300
GC	ACC	CGG	CTG	CTG	CGG	CTG	CGG	CTG	6400
TC	TCG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	CGG	6500
CG	ACC	ACG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	6600
ACT	CAAG	CTTT	TG	CA	TACC	CGATA	ATTTGA	ATTTG	6700
CCCT	GTCA	ACCG	GGTCA	ACC	ATCT	CGG	CGG	AGG	6800
CAC	CCCG	CA	AC	AC	CCCG	CAG	CGC	ACC	6900
AG	ACT	CCAG	CA	TCA	AC	AG	CA	TCA	7000
CC	AGC	CA	AG	CA	TCA	AG	CA	TCA	7100
CT	CG	TCC	TG	AG	CA	TCA	AG	CA	7200
AG	AG	CG	AG	CG	AG	CG	AG	CG	7300
AG	AG	CG	AG	CG	AG	CG	AG	CG	7400

GACAAGGAACAGACGATAATAAAAAAGGAGAACGATACAGAGAAATCCAACTCAGAAGGTGATAAAAAGAAGGAAGAACCCGAGACACCCAAAGACAAAG	7500
AGGACGACAAAAGCCAGAGGAACCTCCTAAGGAAAAGCGATAACGCTCCCGCTCAGTAGAAAAGCCTGAAACACCCAAAGACAAAGAGGACGACAAAAA	7600
GCCAGATGAACCTCCTAAGGAAAAGCGATAACACTCCCGCTCCAGTAGAAAAGCCTGGAAACATCCACACCAACGTGTCGAGGAAAAACACCCACTGAACCA	7700
ACTCCCGAAAACCAACCTGCACCCACCCCTGCACCCACCCAGATCCACCCAGATCCACCCAGATCCACCCAGATCCACCCAGATCCACCCAGATCCACCC	7800
CAGTAACAGCCACTACCCTCCGGATTCCGGAACCAAGCCAGAGCCAACACCAGCACCCCTCAGCCAGCCAGTAACAGCAATCTCACCCCTAGCGC	7900
ACAGCCAGTGTCCGATAACGGTACTCCACTCAGTAAGCAACGGTCGATGAGTTCGTAGCATTTCAGAAAACGTAGCAAGCGTTAGTCCGCCGCGAGCGGT	8000
TCCTCGCAAGTTTTTTCGGGTA AAAAGCGTACACCGTCGCTTGTGCGCGCGGTGTACGCTTTTTTCACGCCTTTTTGCAAAATTTAAATTTGACCCCGCGC	8100
TGGCTCAGGAGAAAAGGGTGCCTCAGGGTGTCTGCGCGGTGCTTGGCGTGTGCGGGAGCGTGCACTCGACGCCATGGCTGGGCGAGCGCGACTTTTG	8200
CATGGCCACGCGCAGGACGCTTTCGCGCGACTGCAGGTGTGGATCCGCATCGACCGGAACGTGACCACCGCGGAGAACAACTCGGCGTGCAGCGTGGCG	8300
ATAGAGACGCCACCGAGCAACTTCGACGCGGACGCTACGTCGCGCGCGCGGCATAAACGTCAGCGTGTCCGCGATCAACTGCGGCTTCTTCAACATGC	8400
GCCAGGTAGAGACCCTACGACACGGCAGCCGCGCAGATGTACGTGTACATGGACACCTGGGACCCCTGGGTGCTCGACAACCCCGAGCCGATCTTCAG	8500
CCAGGCGTACGAAAACGATACGCTGCGGTACCTGCTGGAGGTGCTCGAGTTCGCCAGGCTGTACATTCGCGTGGGCTGCACGGTGTGCGGAGAGCAGCCC	8600
TTTGAGGTGATTCGGGGATCGACTACCCCAACACAGATAGAATGCTCCAGCACGTCAGAGACCAACCGCCGATTCCTCCCGCCAAAGCTGCACA	8700
TTGACCTCGAGGTGGACTACCGGTGCTGAGCGCCGTCACGTGAAGGGCTTCCGTCAGGACGCTGACGCGCCCGCAAGGCGCGGACGCCACTTACTT	8800
CGCGGGGATGCTTCAACATCCAGATCACCGCCAAAAACCCAGTACCGCGCCCTCAGCAAGTATGGTCGCGGAGCTCCAGGAAGTGGCGCATGCAG	8900
ACGGTGCACGAGGGCGCTACCGCGCTGACGCGGACCGTGTGTGTCGCGATCGCCATCGCGCTTGAGCGCGGGCGGAGGCGGACGCCGTGGACCTTAT	9000
CCTTATAAAATTTTCAATGATATACAGTTTTTATGCGACCCCTCCCTGGGAAATTCGGAATTCAAAATGAAAATAAACGGCGTTTAGCACGCATATTGT	9100
TAATACTACCCACCATGGCAGCGTCCGAGCTGCCAGCGGAGAGGGACCCCTACGCGGGCTCCATGTCATTTCAACGGAGCAACCGGAGCATCCAGCC	9200
GGCGATGTCGAGGGGTTGCAGAATGATTTAGCTACAACCCGCGACCCGCTCCCGCGAGCGCAGAAGAGATTGACTTCTTCTGCGTGGACATGCGCAGG	9300
GTAAGTATGGAATTTGATGACAGGCCAACAGCTCAAGTACCCGATTTTATCCACCCGGTTAACGACAGCCCGCGTGCACGCCGTTGCGCAAGCGCA	9400
ACTGCCCTGGCCGCAAGGCGCCGAAAAAACCCCGTGCCTGCAGCAGGCCAAGCGTGCAGGGCTACCTCCGCTAATGCAGTCCACACACTTCAACAAACAC	9500
ATCAGCAATCAAGCTCATGATCATCACAAATGAAGCTAGCACACATCAGTGCCAGTACGCACATAAAATCCACCCACGAACACCTTACTCTTACTC	9600
TCTCTGATCATTTCCCAATCACCCACTCTTCTATCTGATCGTTCCGATCTCCAATCACACATACACCCCTCCGTAATTTTGTACTTTTGTACTTTA	9700
ATTTTGTACACTTTTACACTACTTTTGTACTGACTTTGTACTTTAATTTTGTACTGATTGGATGATAATTTTGTATTACATCCAAATTTTGTCAAAT	9800
CCACGCGCCGGTCCGAAAAATGAAATCGTACCGTTTTAGGCTTCGATCCCTTCCCGCGGAAGACTCACAGCATGGACTCTCGCCGCTCGCCCTGG	9900
CCGTCCGCTTCGGAGGCGTCTCGCCAGCATGACGACGCGCCGCGCTGGCGACGGTGGTCCGCGCAGCATTTGGTCAACGGCTGATGGGCGGTGACGGCAT	10000
GCGTCCGCTCGCCGTTCCGGTATCGACAGCTCATGGCCGACCCCGGACATCAACGACGAGGCCCTTCCAGCGCGAGATCCGCGTGGGCGTGGGCGAA	10100
CTATTTGAAGCGCTCCACCGCGTGGTCGAGCAGGCGCACCGAGAGAAGTACTTCGAGGTCTGCGCGCGCGCAACGGTGCGGCCGCGGAGACGCGCCCG	10200
TGCTCGAGATGGACACCGCGCCGACCACTTCTGAGCCCCAGCCCGCGCCCTCGTGATCACGCCGAGAACCGGTTATGTTCTGTCGCCACCGGCAAG	10300
CTACGTGCACGTGGACGAGAGCGTGGACCCGTTCTTCGGCATGAGCCCCCTCCATCTTCGGCGCGACATCCCAAGCAGCCTCCCGAGGAGCTGCTGAGC	10400
GACTACGACCCGCTCATGAGCCAGGCGCGCGAGCGCCGAGTCCCGGTCGCCCTGCGAGGCCGACTCTGGTGTCTCGAGACGCTC	10487

Sequenza nucleotidica della porzione genomica compresa tra le ORF 106 e 119 del PCPV 1303/05.

APPENDICE II

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
GAGCTCGCGGCACACCCTACCTCACTCACACCAACACCTCACCGGACAATGAAGGAGTCCCCACATTTATTGAAGGACGCGGATGAAGCCGCACATCTC										100
CCACATGAAGGATCAGCAACGGTCAGACATTTACC CGGCAATGAAGGACGTGTGCATCGCGATTGGCCTGAGACC GACGCACACATGAAGTATACAAAT										200
TGGTTTGTAAATCCGGACAATGAAGGACAAAATTTGTTTTGTAAATCAGGACAATTGGAACACACAATCAGATTAAATTTTTGTGCGATACTAAAATCGA										300
TATTTGATGCACATATATTAGTAGTTATAATAGACTAATCTCCGGGGAGGCAAGCAGTTGGATACGGCGGGCGGGGCACGACGTGCACGGAGAATTTCG										400
GGCGGGTCCCCTTCCCCCACCCTCACTACCATGAGGCGCTAATCTTAGCGCTCGTGGCCTGCTTGTGGCGGCGCGATGCCGTTATCGGGTCGTAC										500
GACAAGCACCTAAACACACAGTCCCCCTCGAACTTGGCTCGACGAGTTCGGCACTGAGCTCGGAAGACGCTCGCGCTTCGAGCACAACCTGCAAGCACA										600
CTAAGCACAAGCACTTTGACCACGAATGTGCCACCTCACCTACTACCTCGGACGCCACGACGTCCACAACAGCACTTCTGCAGAAAGTGTGAGCACTA										700
CCTCCACACTGCGACTGAGGCATCGACGGCACTAACGACAACACAACGACGCCGTGACACCCACTACGGTGAAGGTCACACAAAGACCCAGA										800
TGATGTGAAGGCGTCTTCTACTTCGTGATATTAGTTATGTTTATGGTTCATGACACGCTCGTGATGGTGTGCTGCTGCTGGTGTGCTCATGTACAAAACAG										900
GGAACTGCAACTGCTGCTGTGAGATGTTCCCTGCTGCAAAAAGCTCAAGGAATACCTCGATGAAGAAGAGAACGCCGCCCTGTACGACGCCGTGACCT										1000
GGAGCTACCCGACCCCGGCTCAACCTCGTATGCGCGTGGACCCAGATGAAGGATCGGATCAGATCGCAACTGTGTTTTATCCCGCCCGTTCGCGA										1100
ACATTATGCCTCTAAATGCCGAGAATTAACGAAATTAACAACACGCTTTGGGATCAACTCCGTGGCCAGATCGCAACCATGGCCGGCTTCTAGACGCG										1200
TTAGAGGCGTGTCTCCGAGATATGGCACTCGCTCCGCGACACGGCACCACCTCGTCTAATGCCCGCGAGGCGCTCAACAGCATGGACGAGC										1300
GCGATCGGCGCAGTACCCTCACCGCCGAGATCCCCAACACGTCGGCGTCTGCTGAACCGCGACAGCATGTCCGGCACAGCAGCAGCGTGCGCCGACA										1400
CTACGACTGCTGCTCCTCGGACAAGAGCAGACACTCTCCGACAGGCACCCTCGGCGGACCGGCACCAATCGGAGACAGGGACAGACACCGTTCGCGGT										1500
CGCAAGGACTACGACTCGACCCCTCGCGCAAGAACTACGACTCGACCCCTCGCGCAAAAACCGGACTACGTGCGGGTGAACCTACCAGGgACACCCCA										1600
CCCAAACCCACCCAGAAGCACCCGCGCAGACCTCGACGCTCAAGGTGACCTCCTTAAGCAGCAGCTGCAGCACCTGTCCCAGCATCACTACGAGACCCC										1700
CGACCACATACGACGTCGGGACGACTGTCCGCGGCGAGCGCTCCCCCTCGCGGAACTCGCGCTCCCCCGCTCACCGTCCCGGATCAAGCCC										1800
CTGCGAGTATGCGCCGACGTCATGACGGACTGCCGATGAAGCACCGCAGGCCAGCAAACCACTCCAAGACGACATATGCACACTATGACTG										1900
ATATAGAAAACACAGCTCGAGGCGTTAGAAAAGTCTCTCGAGTCGGAGCTGCACTTACAAGCGGTACATCAACGACACTAAGATGTTACTCGCCGCGAC										2000
AGCAGCCAATATCGGAAGCAAGGCTCTGATCTACACTGAAGACTACAACACTAGCGGCAACGTCGGAGAAGATGACACAGAGCACTGCTCGGAGGAGTGC										2100
TGCAAAAGTGGAGGAAGTCTGTGAGAAAGTGCCTTTCTGTAATGTGAAAATATATAGGCCCTATGCGTGCACAGACATGGCGAACAGGCTCGTGTTCC										2200
TCGACCCCGAGACCTAGCCGAGGCGCAGCGCATCCCCGGCCAGGGGGTGTTCGAGCCCGGCAAGAAGAGATGCGTCTTACGAAAGATTTCGACCCAGTTC										2300
CGCGCTCTCGTCCCGTACGCCGTCGGACGGCGGCTCRTGACGAATTCGTATGGCAGCTACGGAACCCGGCGGGCGTCCCGGCTCGTCCGGCAC										2400
CTGACTATAAGCGCGGAGGGCCCATGACCCGCCCCCGCAACTGCGCGCGCACATGGTGTCTCATCTGCCTCAGAGGCGTGGCAGCCGTGGCCAGCG										2500
AGGGCATGGGCTTCGGCCGCTGCATCATGGAGCGCGCACCATGTTTATGGTCAAGTCTCGCACAGCGCCGTCTGTGGCAACCCCGCTGTGAGCT										2600
GCTGGCGCTCTTCTACGACTACTTTACGCCCATCCCGCGCCGCTCTCCGGCGAGGAGGTGCTTTCACCGCGCACCTCGCGCACGTGGACTACTGTCCG										2700
CAGTCGGCGGTGCTCTTCAAAATGGAGTACGACCTCGCGACCGACATCGCCACGCTCTTCTGTGTGGCTACATCTTCCGCGTACGCGGCTGGAGATGG										2800
AGACGCGGAGCAGGTGGTGACGAGTGCAGCTGCTGCCGTACAGCTCGCCGCTGCTGTATGGACCGCAGAAGCTCATGCACTCGGTGGCATGAT										2900
CCCCAGCTCGTCCCGGGCAGCGCGAGATCTGTTGCGCGAGCGCGGCTGGTGCCTGATGCGGACGGACGCGCGCGGGCACTGGAGCCCGGATCTTG										3000
CGGCTGGCGCTCGCCGGCTGCGGCTGTTCCGGGGTGTCTGCGCTCCGTGCTGGGGCGTACGAGCTCTCGCTGTCTGCTACGGCATCGTCCCCAAAT										3100
TCGGTGGCGAGTTTGGAGACGCGCCGGCCCATGGAGATCGACTGTTAGTTTTGTCCCCTGTACATACGCCGCAAACTGAAACTTTAGGGCATCGCT										3200
AATAGTGCACGAACGCCACATGGACCCCGAAATATGGAGCGCGAGAACAAATAACAATAAACAATAAACAGACGCGATGACGCGGACCGTGGCGCGCG										3300
CTCCGGGGCGCAACCGGCTTACCACCCGCAGCTGCGGGAGTTCAAGGAAGCGTGCCTGTACGGCTTCTGACGACGGCCGTGGACGTGACCGTGCAG										3400
GACGTAGACGTACCTGGATTTCCGGCGGGAGCTGAACCTACCGGCTGCACTTACGACACCGGCTGCACATCTACCTGCAGTCCGGCTCGGAGAGA										3500
GCCTCGAGGTGCTGGACGCGCTGCTGGAGGCGGGCGCGACCTCAACCGCAAGGAGATCTGCGGGCTCACGCCCATGCACATGTACGCGAGCTACCGGGA										3600
GGTGGACGTGGACTTCATGCGCGGGCTCGTGCAGCGCGGCGCGCGCTGGCGGGCGAGAGGCGGTCACGGGCTGTCTGTTCTCGTACCTGTACACGCAC										3700
AGCGTCGACGGCGGGCGCGCCGCGAGGTGGTCGAGTGTCTGTCAGGCGGGCGCGGACGTGAACGTGTGCGGCGAGGCGCACAAAGACGCCGTTGCACG										3800
TGCACTGTGCGGGATTTCGAGGTTCGAGGCGGGCATCGTGGAGGTGCTGCTGCGCGGGCGCGGACCCCGAGGCGCTCGACGACTACGGGCTCACGCCCGC										3900
GGACGTGCTGTTGAAGTCCGTGGGCGCCAGCGTGGAGGTGCTGCGGCTATTCTCAACGCGGGCGTGAGCCTGGCCACC GCGCGCACGTGCGCGGACGC										4000
ACGCCGCTGCACCACACGCGGACTCCTTCCGCGGAGCGCGGGCATCGTGCAGGACTGCTCGCCGCGGCTGCAGCGCGGCCCGCTGCACAACAACG										4100
GAACACCGTGTTCACAGCTCGCCACCTTCTGCTGTCGCGACGCTCGGTGGTGGACAGTTCATCGCCGGCGGCGGACATCAACGCGCGCAACCA										4200
GTTTCGGCCACTCATGCTACTACGGGCCATCTACAACCCCTCGGTCTGTGCGGGCTCATCGCCGCGGGCGCGGACCCGCTCGCGCTCACGCCGGAC										4300
GGACGCTCGCCGCTCGCGGCATGGTCTTCCGCAAGCACACAGGCGCCGTGCTCGCGGGCTGGAACCGGGCGTCCGCGGACGCCGTGCGCGCGCGC										4400
TGGACGTGGCATGCGAGCAGGCCACCGACGCCACGCGCGCTGCTGCGTACGTGTTGCTCTCGCGGCGACTCTGTCCGCCGAGCGCGGGCGCG										4500
GCACGCGGACCTGGTGCAGGATGCGAGCTAGAGGCGGCCGTGCTCCGCGGACCGTGGTGGGGTGC CCGGCACTCGCTGCTGGAGATCGTGCAGCGC										4600
CGGACGCCCGCCGGTGTCTCGCCGCGCTGCACCAGTGTGCGGCACTCACCGTGTACTCGCGCTGGTGCAGGGCGCTGCGCGAGATGC										4700
GGCACAACCAACCTCGTGGACGCGGTGTCGGCTCGTGTCCGTGCGGCTGCCCGCGGAGTGGTGCAGCGGCATCTCATGCAGTGC CCGTGGGA										4800
GTGTCTGCGGCGCACGCTGCGCTCGGCGCGCGGACGCCACCCGAACCTTCCCTTCGACCCCTTtCGCATAAATGAAATATTATTTTTTGTGGTA										4900
GACCGTATACTTCCCATGGACCCCGCGACAACGCtGYGGGCCYCGGGCGTGGCGCTGAACCCCGGACCGCGGCCGCRCTCGAGGGCGCGCTG										5000
CTGCGCCCGCGCGCGGCTGGCGCGCACCGCTGCGTTAACGCGACCGTGGACAGCCCGCACATGGCGTTCGCGAGGGCCGCGAGGTGCCCGCGGACA										5100
TTGAGGGGCTCATGACCGAGATCCACTGCGTTACGGCATGACGCGGTGCTCCGCAACGTGCACTTCTGCGAGTTCTGGCACGGCGAGCACGTGCGTTCG										5200
CGCCGCCCGCGGCAGCTGTTACGGTCTGGTCTGCTCAGCGCGAGGTGCGCATCTACCGGAGTGTGCCAGGCGGGGCAGGCTTCTGCTCTGC										5300
CGCCAGATGCGCGCCGGTACATGTTCTGACCGAGCCACGAGCTCGGTACGATCTCGGTGCCCGCACCCATGCGCAACTCGCGCTCGCCGGTGGT										5400
TGGCGGCGGCTTTCGCCACGCGGCACCTTCGAGCGGCTGCCCGGCCCATGTACGCCGTGCCCGGGCACGTGGTGTGCGCGCACGCGCTCCATGCTCTG										5500
CGACTGCTGGCGTGGACCCCGAGCGCCGAACGTGGTCTTACCTGCGGCTCTCGGCTCGATGGTGCAGTGCAGCTGCCGGGCGCGGAGCTCGAG										5600
ATCGAGTGCACCTCGGGCTTCGCGCGGACCACTTCTCCATTCGACGACGAGTGCCTGCTGCCAGGCGCGCCCGCACGTGCGGCACACCCGGTGTGGC										5700
CGCTGACGGAAATCTGCCCGGGCGCCACGGTGGTGTCTGCGCGCCGCTGCGCGCC										5756

Sequenza nucleotidica della regione genomica compresa tra le ORF 119 e 123 del PCPV 1303/05

BIBLIOGRAFIA

- ABU ELZEIN E.M., HOSAWI F.M. (1997). Severe long lasting contagious Ectyima infection in goat 's kid. *Zentralbl Veterinarmed B*; **44 (9)**: 561-4.
- AFONSO C.L., DELHON G., TULMAN E.R., LU ZSAK A., BECERRA W.M., ZSAK L., KUTISH G.F., ROCK D.L. (2005). Genome of deerpox virus. *J. Virology*; **79**: 966-977.
- AGGER W.A.,WEBSTER S.B. (1983). Human orf infection complicated by erythema multiforme. *Cutis*; **31 (3)**: 334-338.
- AMICHAÏ B., MARCELO H., ABRAHAM A., HALEVY S. (1993). Tense Bullous Lesions on Fingers. *Arch. of Dermatology*; **129 (8)**: 1043-1046
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; **215**: 403-410
- ARA. M., ZABALLOS P., SÁNCHEZ M., QUEROL I., ZUBIRI M.L., SIMAL E., HÖRNDLER C. (2008). Giant and recurrent orf virus infection in a renal transplant recipient treated with imiquimod. *Journal of American Academy of Dermatology*; **58 (2 Suppl)**: 39-40.
- ARAVIND L., MAKAROVA K.S., KOONIN E.V. (2000). Survey and summary: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.*; **28(18)**: 3417–3432.
- AWADALLA P. (2003). The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nat. Rev. Genet.*; **4 (1)**: 50-60.
- BALASSU T.C., ROBINSON A.J. (1987). Orf virus replication in bovine testis cells: kinetics of viral DNA, polypeptide, and infectious virus production and analysis of virion polypeptides. *Archives of Virology*; **97**: 267-281.
- BALL L.A. (1987). High-frequency homologous recombination in vaccinia virus DNA. *J. Virol.*; **61 (6)**: 1788-95.
- BALL L.A. (1987). High-frequency homologous recombination in vaccinia virus DNA. *J Virol*; **61(6)**: 1788-95.
- BALL LA. (1995). Fidelity of homologous recombination in vaccinia virus DNA. *Virology*; **209(2)**: 688-91.
- BAMFORD D.H. (2003). Do viruses form lineages across different domains of life? *Res Microbiol*; **154**: 231–236.
- BARRY M., MCFADDEN G. (1997). Virus encoded cytokines and cytokine receptors. *Parasitology*; **115 (S)**: 89-100.
- BAYLIS S.A., DIXON L.K., VYDELINGUM S., SMITH GL. (1992). African swine fever virus encodes a gene with extensive homology to type II DNA topoisomerases. *J Mol Biol*; **228(3)**: 1003-10.

- BEDSON H.S., DUMBELL K.R. (1964). Hybrids derived from the viruses of variola major and cowpox. *J Hyg (Lond)*; **62**: 147-58.
- BENARROCH D., CLAVERIE J.M., RAOULT D., SHUMAN S. (2006). Characterization of mimivirus DNA topoisomerase IB suggests horizontal gene transfer between eukaryal viruses and bacteria. *J. Virol.*; **80** (1): 314-21.
- BERNARD H.U. (1994). Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends Microbiol.*; **2**: 140–143.
- BLOCK W., UPTON C., MCFADDEN G. (1985). Tumorigenic poxviruses: genomic organization of malignant rabbit virus, a recombinant between Shope fibroma virus and myxoma virus. *Virology*; **140**(1): 113-24.
- BODNAR M.J., MILLER F., TYLER W.B. (1999). Facial Orf. *Journal of the American Academy of Dermatology*; **40**: 815-817.
- BOTSTEIN D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354**: 484–490.
- BRATKE K.A., MCLYSAGHT A. (2008). Identification of multiple independent horizontal gene transfers into poxviruses using a comparative genomics approach. *BMC Evol. Biol.*; **8**: 67.
- BREIER G. (2000). Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost*; **26**(5): 553-9.
- BROWN S.M., RITCHIE D.A. (1957). Genetic studies with herpes simplex virus type 1: quantitative analysis of the products from two-factor crosses. *Virology*; **64**(1): 281-3.
- BUCHAN J. (1996). Characteristic of orf in a farming community in mid-Wales. *British Medical Journal*; **313**: 203-204.
- BUDDLE B.M., PULFORD H.D. (1984). Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ectyma virus. *Vet. Microbiology*; **9**: 515-522.
- BUGERT J.J., DARAI G. (2000). Poxvirus homologues of cellular genes. *Virus Genes*; **21** (1-2): 111-33.
- BUTTNER M., RZIHA H.J. (2002). Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *J. Vet. Med.*; **49**: 7-16.
- CAMPBELL A., BOTSTEIN D. (1983). Evolution of the lambdoid phages In: R.W. Hendrix et al., Editors, Lambda II, Cold Spring Harbor Laboratory.
- CÉBE-SUAREZ S., GRÜNEWALD F.S., JAUSSI R., LI X., CLAESSON-WELSH L., SPILLMANN D., MERCER A.A., PROTA A.E., BALLMER-HOFER K. (2008). Orf virus VEGF-E NZ2 promotes paracellular NRP-1/VEGFR-2 coreceptor assembly via the peptide RPPR. *FASEB J*; **22**(8): 3078-86.
- CHALLBERG M.D., KELLY T.J. (1989). Animal virus DNA replication. *Annu Rev Biochem*; **58**: 671-717.

- CHAN A., BAIRD M., MERCER A.A., FLEMING S.B. (2006). Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10. *J Gen Virol.*; **87**: 3177–81.
- CHASTON T.B., LIDBURY B.A. (2001). Genetic 'budget' of viruses and the cost to the infected host: a theory on the relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease. *Immunol Cell Biol.*; **79(1)**: 62-6.
- CHEN B., PIRONDI S., FERNANDEZ M., GIULIANI A., VACCARI F., SCAGLIARINI A., GIARDINO L., CALZA L. (2007). Skin-derived stem cells from different mammalian species: a tool for developmental pharmacological and cancer studies. In *Stem Cells and Cancer*, Nova Science Publishers Inc., pp 83-106.
- CHERNOS V.I., ANTONOVA T.P., SENKEVICH .TG. (1985). Recombinants between vaccinia and ectromelia viruses bearing the specific pathogenicity markers of both parents. *J Gen Virol*; **66 (Pt 3)**: 621-6.
- CLAUSS M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*; **26(5)**: 561-9.
- COLINAS R.J., GOEBEL S.J., DAVIS S.W., JOHNSON G.P., NORTON E.K., PAOLETTI E. (1990). A DNA ligase gene in the Copenhagen strain of vaccinia virus is nonessential for viral replication and recombination. *Virology*; **179(1)**: 267-75.
- COTTONE R., BÜTTNER M., BAUER B., HENKEL M., HETTICH E., RZIHA H.J. (1998). Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res*; **56(1)**: 53-67.
- CRUMBIE A. (1998). The Orf virus: a disease of the farming community. *Community nurse*; **6**: 44-45.
- DA SILVA M, UPTON C. (2005). Host-derived pathogenicity islands in poxviruses. *Virol. J.*; **2**:30.
- DAL POZZO F., ANDREI G., HOLY A., VAN DEN OORD J., SCAGLIARINI A., DE CLERCQ E., SNOECK R. (2005). Activities of acyclic nucleoside phosphonates against Orf virus in human and ovine cell monolayers and organotypic ovine raft cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **49(12)**: 4843-52.
- DANGLER C.A., DEEVER R.E., KOLODZIEJ C.M. (1994). Genetic recombination between two strains of Aujeszky's disease virus at reduced multiplicity of infection. *J Gen Virol*; **75 (Pt 2)**: 295-9.
- DAVISON A.J., BENKO M., HARRACH B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*; **84**: 2895–2908.
- DEANE D., MCINNES C.J., PERCIVAL A., WOOD A., THOMSON J., LEAR A., GILRAY J., MERCER A.A., HAIG D.M. (2000). Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-2. *J. Virol.*; **74**: 1313-1320.
- DEGRAEVE C., DE CONINCK A., SENNESEAEEL J., ROSEEUW D. (1999). Recurrent contagious ecthyma (Orf) in an immunocompromised host successfully treated with cryotherapy. *Dermatology*; **298**: 162-163.

- DELANGE A.M., MCFADDEN G.(1986). Sequence-nonspecific replication of transfected plasmid DNA in poxvirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **83(3)**: 614–618.
- DELHON G., TULMAN E.R., AFONSO C.L., LU Z., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., LEHMKUHL H.D., PICCONE M.E., KUTISH G.F., ROCK D.L. (2004). Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J. Virol.*; **78 (1)**: 168-77.
- DOMINGO E., MARTÍNEZ-SALAS E., SOBRINO F., DE LA TORRE JC., PORTELA A., ORTÍN J., LÓPEZ-GALINDEZ C., PÉREZ-BREÑA P., VILLANUEVA N., NÁJERA R. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance. *Gene*; **40(1)**: 1-8.
- DRAKE J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; **88**: 7160–7164.
- DRAKE J.W. (1991). Spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.*; **25**: 125–146.
- DUFFY S., HOLMES E.C. (2008). Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *J. Virol.*; **82**: 957–965.
- DUPRÈ A., CHRISTOL B., LASSERE J. (1981). Atopic dermatitis and poxvirus superinfections. *Annual of dermatology and Venereology*. **108 (11)**: 829-834.
- EIGEN M.,Steps Towards Life (Oxford University Press, Oxford, 1996).
- EVANS D.H., STUART D., MCFADDEN G. (1988). High levels of genetic recombination among cotransfected plasmid DNAs in poxvirus-infected mammalian cells. *J Virol.*; **62(2)**: 367–375.
- FEIL E.J., SPRATT B.G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*; **55**: 561-90.
- FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenesis: an approach using the bootstrap. *Evolution*; **39**: 783- 791.
- FELSENSTEIN J. (1989). PHYLIP- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*; **5**: 164-166.
- FENNER F. (1959). Genetic studies with mammalian poxviruses. II. Recombination between two strains of vaccinia virus in single HeLa cells. *Virology*; **8**: 499–507.
- FENNER F., COMBEN B.M. (1958). Genetic studies with mammalian poxviruses. I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. *Virology*; **5(3)**: 530–548.
- FENNER F., COMBEN B.M. (1958).Genetic studies with mammalian poxviruses. I. Demonstration of recombination between two strains of vaccinia virus. *Virology*; **5(3)**: 530-48.
- FERRARA N, DAVIS-SMYTH T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.*; **18(1)**: 4-25.

- FISHER C., PARKS R.J., LAUZON M.L., EVANS D.H. (1991). Heteroduplex DNA formation is associated with replication and recombination in poxvirus-infected cells. *Genetics*; **129** (1): 7-18.
- FLEMING S. B., FRASER K.M., BLOCK J., MERCER A.A., ROBINSON A. J. (1993) Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and Orf virus. *Virology*; **195**: 175-184.
- FLEMING S.B., HAIG D.M., NETTLETON P., REID H.W., MCCAUGHAN C.A., WISE L.M., MERCER A. (2000). Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes*; **21** (1-2): 85-95.
- FLEMING S.B., MCCAUGHAN C.A., ANDREWS A.E., NASH A.D., MERCER A.A. (1997). A Homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.*; **71**: 4857-4861.
- FRICKE W.M., BRILL S.J. (2003). Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3. *Genes Dev.*; **17** (14): 1768–1778.
- GALLINA L., DAL POZZO F., MC INNES C.J., CARDETI G., GUERCIO A., BATTILANI M., CIULLI S., SCAGLIARINI A. (2006). A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J. Virol. Methods.*; **134**: 140-5.
- GALLINA L., SCAGLIARINI L., MCINNES C.J., GUERCIO A., PURPARI G., PROSPERI S., SCAGLIARINI A. (2007). Parapoxvirus in goats: experimental infection and genomic analysis. *Veterinary Research Communications in press*
- GARCIA A.D., ARAVIND L., KOONIN E.V., MOSS B. (2000). Bacterial-type DNA holliday junction resolvases in eukaryotic viruses. *Proc Natl. Acad Sci. U S A.*; **97**(16): 8926-31.
- GARCIA A.D., OTERO J., LEBOWITZ J., SCHUCK P., MOSS B. (2006). Quaternary structure and cleavage specificity of a poxvirus holliday junction resolvase. *J. Biol. Chem.*; **281**(17): 11618-26.
- GARCÍA-BEATO R., FREIJE J.M., LÓPEZ-OTÍN C., BLASCO R., VIÑUELA E., SALAS M.L. (1992). A gene homologous to topoisomerase II in African swine fever virus. *Virology*; **188**(2): 938-47.
- GARCIA-DIAZ M., BEBENEK K. (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *Crit. Rev. Plant Sci.*; **26**: 105–122.
- GASSMANN U., WYLER R., WITTEK R. (1985). Analysis of Parapoxvirus genomes. *Arch. Virology*; **83**: 17-31.
- GEERINCK K., LUKITO G., SNORCK R., DE VOS R., DE CLERCQ E., VARENTERGHEM Y., DEGREEF H., MAES B. (2001). A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofavir cream. *J. Med. Virol.*; **64**: 543-549.
- GERSHON P.D., KITCHING R.P., HAMMOND J.M., BLACK D.N. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J. Gen. Virol.*; **70**: 485-9.
- GHISLAIN P.D., DINET Y., DELESCLUSE J. (2001). Orf in Urban surroundings and religious practices: a study over a 3-year period. *Annual of Dermatology and Venereology*; **128**: 889-892.

- GILL M.J. (1990). Human Orf. A diagnostic consideration. *Archives of Dermatology*; **126 (3)**: 356-358.
- GILRAY J.A., NETTLETON P.F., OOW I., LEWIS C.J., STEPHENS S.A., MADELEY J.D., REID H.V. (1998). Restriction endonuclease profiles of Orf virus isolates from British Isles. *Veterinary Record*; **143**: 237-240.
- GLAZENBURG K.L., MOORMANN R.J., KIMMAN T.G., GIELKENS A.L., PEETERS BP. (1994). In vivo recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res*; **34(2)**: 115-26.
- GOURREAU J.M., MORNET M., GRESSIN R., FRAISSE J.C., GOURVIL J., LESOUPLE C. (1986). Orf: Recontamination huit mois après l'infection originelle, revue de la littérature à propos d'une observation. *Annual Dermatology and Venereology* ; **113**: 1065-1076.
- GRAHM-BONNALIE F.E. (1951). Treatment of Orf. *Br. Med. J.* ; **2**: 1256.
- GRAHAM K.A., LALANI A.S., MACEN J.L., NESS T.L., BARRY M., LIU L.Y., LUCAS A., CLARK-LEWIS I., MOYER R.W., MCFADDEN G. (1997). The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology*; **229(1)**: 12-24.
- GREIG A., LINKLATER K.A., CLARK W.A. (1984). Persistent orf in a ram. *Veterinary Record*; **115**: 149.
- GREIG A.S. (1957). Contagious Ectyma of sheep. In vitro cultivation of the virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*; **21**: 304-308.
- GRIESEMER R.A., COLE C.R. (1960). Bovine papular stomatitis. Recognition in the United States. *J. Am. Vet. Med Assoc.*; **137**: 404-410.
- GROVES R.W., WILSON-JONES E., MACDONALD D.M. (1991). Human orf and milkers' nodule: a clinicopathologic study. *J. Am. Ac. Dermatol.*; **25**: 706-711.
- GUARDA F. (1959). Contributo allo studio anatomo-istopatologico dell'ectima contagioso dei camosci e stambecchi. In: *Torino: Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*. 1959: 18.
- GUBSER C., HUÉ S., KELLAM P., SMITH G.L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen Virol.*; **85**: 105-17.
- GUIBAL F., COSNES A., WECHSLER J., MISERI E., REVUZ J., CHOSIDOW O. (1996). Religious ritual practices as a contamination mode for human Orf. *European Dermatology*; **6**: 41-42.
- GUMBRELL R.C., MCGREGOR D.A., (1997). Outbreak of severe fatal Orf in lambs. *Veterinary Record*; **141**: 150-151.
- GUNDUZ K., INANIR I., SACAR T., (2005). Orf and religious practices. *J. Dermatology*; **32**: 306-308.
- GUO F., GOPAUL D.N., VAN DUYNE G.D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*; **389(6646)**: 40-6.

- GUO J., ZHANG Z., EDWARDS J.F., ERMEL R.W., TAYLOR C., DE LA CONCHA-BERMEJILLO JR. A. (2003). Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistente, proliferative dermatitis. *Virus Research*. **93(2)**: 169-79.
- GUREL M.S., OZARDALI I., BITIREN M., SAN I., ZEREN H. (2002). Giant orf on the nose. *Eur. J. Dermat.*; **12 (2)**: 183-5.
- HABER J.E., HEYER W.D. (2001). The fuss about Mus81. *Cell*; **107(5)**: 551-554.
- HABER J.E., HEYER W.D. (2001). The fuss about Mus81. *Cell*; **107(5)**: 551-4.
- HAIG D.M., MCINNES C.J., THOMSON J., WOOD A., BUNYAN K., MERCER A.A. (1998). The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent kinase. *Immunology*; **93**: 335-340.
- HATWELL J.N., SHARP P.M. (2000). Evolution of human polyomavirus JC. *J. Gen. Virol.*; **81**: 1191-1200.
- HOLLIDAY R. (1964). The induction of mitotic recombination by mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*; **50**: 323-35.
- HOLMES E.C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.*; **11(12)**: 543-6.
- HOLMES E.C., WOROBEY M., RAMBAUT A. (1999). Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.*; **16 (3)**: 405-9.
- HOLZERLANDT R., ORENGO C., KELLAM P., ALBÀ MM. (2002). Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome. *Genome Res*; **12(11)**: 1739-48.
- HORNER G.W., ROBINSON A.J., HUNTER R., COX B.T., SMITH R. (1987). Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer. *NZ Veterinary Journal*. **35**: 41-45.
- HOUSAWI F.M., ELZEIN E.M., AMIN M.M., AL AFALEQ A.I. (1991). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Vet Rec*; **128(23)**: 550-1.
- HOUSAWI F.M.T., ABU ELZEIN E.M.E., AL AFALEQ A.I., AMIN M.M. (1992). Sero-surveillance for Orf Antibodies in Sheep and Goats in Saudi Arabia Employing the ELISA Technique. *J. Comp. Path.*; **106 (2)**: 153-158.
- HU F.Q., SMITH C.A., PICKUP D.J. (1994). Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*; **204(1)**: 343-356.
- HUGHES A.L. (2002). Origin and evolution of viral interleukin-10 and other DNA virus genes with vertebrate homologues. *J Mol Evol.*; **54**: 90-101.
- HUGHES A.L., FRIEDMAN R. (2005). Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol. Phylogenet. Evol.*; **35(1)**: 186-95.
- HUSKAAR S. (1986). Giant orf in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *British J. Dermat.*; **114**: 631-634.

- HUSON D.H. (1998). SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*; **14** (1): 68-73.
- HWANG Y.T., LIU B.Y., COEN D.M., HWANG C.B. (1997). Effects of mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene on enzyme activities, viral replication, and replication fidelity. *J Virol*; **71**(10): 7791-8.
- INDER M.K., UEDA N., MERCER A.A., FLEMING S.B., WISE L.M. (2007). Bovine papular stomatitis virus encodes a functionally distinct VEGF that binds both VEGFR-1 and VEGFR-2. *J. Gen. Virol.*; **88**: 781-91.
- INOSHIMA Y., MOROOKA A., SENTSU H. (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.*; **84** (2): 201-208.
- INOSHIMA Y., MURAKAMI K., YOKOYAMA T., SENTSU H. (2001). Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Gen Virol*; **82**(Pt 5): 1215-20.
- IYER L.M., ARAVIND L., KOONIN E.V. (2001). Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J. Virol.*; **75**(23): 11720–11734.
- IYER LM, BALAJI S, KOONIN EV, ARAVIND L. (2006). Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res. Apr.*; **117** (1): 156-84.
- JAKOBSEN I.B., WILSON S.R., EASTEAL S. (1997). The partition matrix: exploring variable phylogenetic signals along nucleotide sequence alignments. *Mol. Biol. Evol.*; **14** (5): 474-84.
- KADAJA M., SILLA T., USTAV E., USTAV M. (2009). Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology*; **384**(2): 360-8.
- KAHN D., HUTCHINSON E.A. (1980). Generalized bullous Orf. *Int. J. Dermatol.*; **19**: 340-341.
- KIM J.S., ENQUIST L.W., CARD .JP. (1999). Circuit-specific coinfection of neurons in the rat central nervous system with two pseudorabies virus recombinants. *J Virol*; **73**(11): 9521-31.
- KOONIN E.V., FEDOROVA N.D., JACKSON J.D., JACOBS A.R., KRYLOV D.M., MAKAROVA K.S., MAZUMDER R., MEKHEDOV S.L., NIKOLSKAYA A.N., RAO B.S., ROGOZIN I.B., SMIRNOV S., SOROKIN A.V., SVERDLOV A.V., VASUDEVAN S., WOLF Y.I., YIN J.J., NATALE D.A. (2004). A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome Biol*; **5**(2):R7.
- KOONIN E.V., MAKAROVA K.S, ARAVIND L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.*; **55**: 709–742.
- KOTENKO S.V., SACCANI S., IZOTOVA L.S., MIROCHNITCHENKO O.V., PESTKA S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**: 1695–700.
- KOTTARIDI C., NOMIKOU K., LELLI R., MARKOULATOS P., MANGANA O. (2006). Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *J Virol Methods*; **134**(1-2): 119-24.

- KOVALL R., MATTHEWS B.W. (1997). Toroidal structure of lambda-exonuclease. *Science*; **277(5333)**: 1824–1827.
- KRIAJEVSKA M.V., ZAKHAROVA L.G., ALTSTEIN A.D. (1994). Genetic instability of vaccinia virus containing artificially duplicated genome regions. *Virus Res*; **31(1)**: 123-37.
- KUMMENEJE K., KOSGRUD J. (1979). Contagious Ectyema (Orf) in reinder (*Rangifer tarandus*). *Veterinary Record*; **105**: 60-61.
- KUNKEL T.A. (2004). DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.*; **279**: 16895–16898.
- KURILLA M.G., SWAMINATHAN S., WELSH R.M., KIEFF E., BRUTKIEWICZ R.R. (1993). Effects of virally expressed interleukin-10 on vaccinia virus infection in mice. *J Virol.*; **67**: 7623–8.
- KWON H.J., TIRUMALAI R., LANDY A., ELLENBERGER T. (1997). Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core. *Science*; **276(5309)**: 126-31.
- LAWRENCE J.G., OCHMAN H. (2002). Reconciling the many faces of lateral gene transfer. *Trends Microbiol.*; **10**: 1–4.
- LEAVELL U.W., MCNAMARA M.J., MUELLING R., TALBERT W.M., RUCKER R.C., DALTON A.J. (1968). Orf: report of 19 human cases with clinical and pathological observations. *J. Am. Med. Ass.*; **204 (8)**: 657-64.
- LEDERMAN E.R., AUSTIN C., TREVINO I., REYNOLDS M.G., SWANSON H., CHERRY B., RAGSDALE J., DUNN J., MEIDL S., ZHAO H., LI Y., PUE H. AND DAMON I.K. (2007). Orf virus infection in children: Clinical characteristic, transmission, diagnostic methods and future therapeutics. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **26 (8)**: 740-744.
- LEDERMAN E.R., GREEN G.M., DEGROOT H.E., DAHL P., GOLDMAN E., GREER P.W., LI Y., ZHAO H., PADDOCK C.D., DAMON I.K. (2007). Progressive ORF virus infection in a patient with lymphoma: successful treatment using imiquimod. *Clin. Infect. Dis.*; **44 (11)**: 100-103.
- LEIPE D.D., ARAVIND L., KOONIN E.V. (1999). Did DNA replication evolve twice independently?. *Nucleic Acids Res.*; **27(17)**: 3389–33401.
- LEVINTHAL C. (1954). Recombination in Phage T2: Its Relationship to Heterozygosity and Growth. *Genetics*; **39(2)**: 169-84.
- LEWIS C. (1996). Update on Orf. *In Practice*; **9**: 376-381.
- Li, W.-H. *Molecular Evolution* (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 1997).
- LIVINGSTONE C.W., HARDY W.T. (1960). Longevity of contagious ectyema virus. *J. Am. Vet. Ass.*; **137**: 651.
- LOLE K.S., BOLLINGER R.C., PARANJAPE R.S., GADKARI D., KULKARNI S.S., NOVAK N.G., INGERSOLL R., SHEPPARD H.W., RAY S.C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.*; **73 (1)**: 152-60.

- LYTTLE D.J., FRASER K.M., FLEMING S.B., MERCER A.A., ROBINSON A.J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.*; **68** (1): 84-92.
- MACKETT M., SMITH G.L., MOSS B. (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **79**(23): 7415–7419.
- MARTIN D., RYBICKI E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*; **16** (6): 562-3.
- MARTIN D.P., WILLIAMSON C., POSADA D. (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*; **21** (2): 260-2.
- MAYNARD SMITH J., SMITH N.H. (1998). Detecting recombination from gene trees. *Mol. Biol. Evol.*; **15** (5): 590-9.
- MAZUR C., MACHADO R.D. (1989). Detection of contagious pustular dermatitis of goats in a severe outbreak. *Veterinary Record*; **125**: 419-420.
- MCFADDEN G. (2005). Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*; **3**: 201-213.
- MCFADDEN G., LALANI A., EVERETT H., NASH P., XU X. (1998). Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines. *Semin Cell Dev Biol*; **9**(3): 359-68.
- MCGUFFIN L.J., BRYSON K., JONES D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*; **16**: 404-405.
- MCKEEVER D.J., REID H.W. (1986). Survival of orf virus under British winter conditions. *Veterinary Record*; **118**: 613-614.
- MCKEEVER D.J., REID H.W., MCEWAN JENKINSON D., HUTCHINSON G. (1988). Studies of pathogenesis of Orf virus infection in sheep. *J. Comp. Pathol.*; **99**: 317-328.
- MCLYSAGHT A., BALDI P.F., GAUT B.S. (2003). Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*; **100** (26): 15655-60.
- MERCER A.A., FRASER K., BARNS G., ROBINSON A.J. (1987). The structure and cloning of orf virus DNS. *Virology*; **157**: 1-12.
- MERCER A.A., WISE L.M., SCAGLIARINI A, MCINNES C.J., BÜTTNER M., RZIHA H.J., MCCAUGHAN C.A., FLEMING S.B., UEDA N., NETTLETON P.F. (2002). Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure. *J. Gen. Virol.*; **83**: 2845-55.
- MERCER A.A., UEDA N., FRIEDERICHS S.M., HOFMANN K., FRASER K.M., BATEMAN T., FLEMING S.B. (2005). Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Research*; **116** (1-2): 146-58.
- MERCER A.A., YIRREL D.L., WHELAN E.M., NETTLETON P.F., GILRAY J.A., NETTLETON P.F., ROBINSON A.J. (1997). A novel strategy for determining protective antigens of the parapoxvirus, orf virus. *Virology*; **229** (1): 193-200.

- MERCHLINSKY M. (1989). Intramolecular homologous recombination in cells infected with temperature-sensitive mutants of vaccinia virus. *J. Virol.*; **63** (5): 2030-5.
- MEURENS F., KEIL G.M., MUYLKENS B., GOGEV S., SCHYNTS F., NEGRO S., WIGGERS L., THIRY E. (2004). Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesviruses, bovine herpesviruses 1 and 5. *J Virol*; **78**(18): 9828-36.
- MEYER M., CLAUSS M., LEPPLE-WIENHUES A., WALTENBERGER J., AUGUSTIN H.G., ZICHE M., LANZ C., BÜTTNER M., RZIHA H.J., DEHIO C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO*; **18**(2): 363-74.
- MOSS B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. In *Field's Virology* (Vol 4), Knipe D. and Howley P. (Eds), Lippincott Williams and Wilkins.
- MOSS B., SHISLER J.L., XIANG Y., SENKEVICH T.G.(2000). Immune-defense molecules of molluscum contagiosum virus, a human poxvirus. *Trends Microbiol.*; **8**(10): 473–477.
- MOURTADA I., LE TOURNEUR M., CHEVRANT-BRETON J., LE GALLE F. (2000). Human orf and erythema multiforme. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. **127**: 397-399.
- MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., GHABRIAL S.A., JARVIS A.W. (1995). Virus taxonomy: classification and nomenclature of the viruses. Ed. Springer-Verlag, New York.
- NAGINTON J., HORNE R.W. (1962). Morphological studies of Orf and vaccinia viruses. *Virology*; **16**: 248-260.
- NAGINTON J., NEWTON A.A., HORNE R.W. (1964). The structure of Orf virus. *Virology*; **16**: 248-260.
- NAGY P.D., SIMON A.E. (1997). New insights into the mechanisms of RNA recombination. *J Gen Virol; Virology*; **235**(1): 1-9
- NAKANO E., PANICALI D., PAOLETTI E. (1982).Molecular genetics of vaccinia virus: demonstration of marker rescue. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **79**(5): 1593–1596.
- NASH H.A., MIZUUCHI K., ENQUIST L.W., WEISBERG R.A. (1981). Strand exchange in lambda integrative recombination: genetics, biochemistry, and models. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; **45** (Pt 1): 417-28.
- NETTLETON P.F., BRABNER J., POW I., GILRAY J.A., BELL G.D., REID H.W. (1996). Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Veterinary Records*; **138**: 184-185.
- NETTLETON P.F., GILRAY J.A., REID H.W., MERCER A.A. (2000). Parapoxviruses are strongly inhibited in vitro by cidofovir. *Antiviral Res*; **48**(3): 205-8.
- OCHMAN H., LAWRENCE J.G., GROISMAN E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*; **405**: 299–304.

- OLSEN G.J., MATSUDA H. HAGSTROM R., OVERBEEK R. (1994). fastDNAML: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequence using maximum likelihood. *Comput Appl Biosci*; **10**: 41-48.
- PANICALI D., PAOLETTI E. (1982). Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **79(16)**: 4927-31.
- PARKS R.J., EVANS D.H. (1991). Enhanced recombination associated with the presence of insertion and deletion mutations in poxvirus-infected cells. *Virology*; **184 (1)**: 299-309.
- PICKUP DJ. (1994). Poxviral modifiers of cytokine responses to infection. *Infect Agents Dis*; **3(2-3)**: 116-27.
- PIEREN M., PROTA A.E., RUCH C., KOSTREWA D., WAGNER A., BIEDERMANN K., WINKLER FK., BALLMER-HOFER K. (2006). Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of vascular endothelial growth factor-E. Implications for receptor specificity. *J Biol Chem*; **281(28)**: 19578-87.
- PLOWRIGHT W., WHITCOMB M.A., FERRIS R.D. (1959). Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture. *Archiv. Fuer. Die Gesamte Virusforsch*; **9**: 214-231.
- PONTI W. (1996). In: Poli G., Cocilovo T., *Microbiologia e immunologia veterinaria*. UTET Torino (Ed.).
- POSADA D. (2002). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol Biol Evol*; **19(5)**: 708-17.
- POSADA D., CRANDALL K.A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc. Natl. Acad Sci. U S A*; **98 (24)**: 13757-62.
- POSADA D., CRANDALL K.A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.*; **16 (1)**: 37-45.
- POSADA D., CRANDALL K.A., HOLMES E.C. (2002). Recombination in evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.*; **36**: 75-97.
- REID H.W. (1994). The changing face of Orf. *Proceedings of the sheep veterinary society*; **18**: 173-174.
- RISAU W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*; **386(6626)**: 671-4.
- RITCHIE P.A., ANDERSON I.L., LAMBERT D.M. (2003). Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology*; **306(1)**: 109-15.
- ROBINSON A.J., BALASSAU T.T. (1981). Contagious pustular dermatitis (Orf). *Veterinary Bulletin*; **51**: 771-781.
- ROBINSON A.J., ELLIS G., BALASSU T. (1982) The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch Virol*; **71(1)**: 43-55.

- ROBINSON A.J., LYTTLE D.J. (1992). Parapoxviruses: their biology and potential as recombinant vaccines. In: Binns M., Smith G.L. (Ed.) Recombinant poxviruses. CRC Press, Boca Raton, 285-327.
- ROBINSON A.J., MERCER A.A. (1995). Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology*; **208**: 812-815.
- ROSEMBRUCH R.F., REED D.E. (1983). Reaction of convalescent bovine antisera with strain specific antigens of Parapoxvirus. *Am. J. Vet. Res.*; **44 (5)**: 875-878.
- SAKAOKA H., KURITA K., IIDA Y., TAKADA S., UMENE K., KIM Y.T., REN C.S., NAHMIAS A.J. (1994). Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol*; **75 (Pt 3)**: 513-27.
- SALEMI M., DE OLIVEIRA T., COURGNAUD V., MOULTON V., HOLLAND B., CASSOL S., SWITZER W.M., VANDAMME A.M. (2003). Mosaic genomes of the six major primate lentivirus lineages revealed by phylogenetic analyses. *J. Virol.*; **77 (13)**: 7202-13.
- SALMINEN M. (2003). Detecting recombination in viral sequence. In *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*. Salemi M., Vandamme A.M. (Eds), Cambridge University Press, pp 348-377.
- SALMINEN M.O., CARR J.K., BURKE D.S., MCCUTCHAN F.E. (1995). Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses*; **11(11)**: 1423-5.
- SANDERSON J. (1976). Treating orf. *Veterinary Record*; **99**: 56.
- SAVAGE J., BLACK M.M. (1972) "Giant Orf" of finger in a patient with lymphoma. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*; **65**: 766-768.
- SAVORY L.J., MERCER A.A., STACKER S.A., FLEMING S.B., NIVEN B.E. (2000). Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in Orf virus infection. *J. Virol.*; **74 (22)**: 10699-10706.
- SCAGLIARINI A., CIULLI S., BATTILANI M., JACOBONI I., MONTESI F., CASADIO R., PROSPERI S. (2002). Characterisation of immunodominant protein encoded by F1L gene of the orf virus strains isolated in Italy. *Archives of Virology*; **147**: 1989-1995.
- SCAGLIARINI A., DAL POZZO F., GALLINA L., GUERCIO A., DE CLERCQ E., SNOECK R., ANDREI G. (2005). Ovine Skin Organotypic Cultures Applied to the Ex vivo Study of Orf Virus Infection. *Vet. Res. Comm.*; **29 (2)**: 245-247.
- SCAGLIARINI A., DAL POZZO F., GALLINA L., GUERCIO A., VACCARI F., BATTILANI M., CIULLI S., PROSPERI S. (2006). In vitro activity of VEGF-E produced by orf virus strains isolated from classical and severe persistent contagious ecthyma. *Veterinary Microbiology*; **114 (1-2)**: 142-7.
- SCAGLIARINI A., GALLINA L., DAL POZZO F., BATTILANI M., CIULLI S., PROSPERI P. (2004). Heparin binding activity of orf virus F1L protein. *Virus Research*. **105**: 107-112.

SCAGLIARINI A., GALLINA L., DAL POZZO F., BATTILANI M., CIULLI S., PROSPERI S., PAMPIGLIONE S.(2004). Diagnosis of orf virus infection in humans by the polymerase chain reaction. *New Microbiologica*; **27 (4)**: 403-5.

SCAGLIARINI A., MCINNES C.J., GALLINA L., DAL POZZO F., SCAGLIARINI L., SNOECK R., PROSPERI S., SALES J., GILRAY J.A., NETTLETON P.F. (2007). Antiviral activity of HPMPC (cidofovir) against orf virus infected lambs. *Antiviral Research*; **73 (3)**: 169-74.

SCAGLIARINI A., PELI A., FRANCHI A. (2001). Infezione da Orf virus nell'uomo: revisione della letteratura. *Esperienze dermatologiche*; **3**: 431-436.

SCHYNTS F., MEURENS F., DETRY B., VANDERPLASSCHEN A., THIRY E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J. Virol.*; **77 (23)**: 12535-42.

SEET B.T., MCCAUGHAN C.A., HANDEL T.M., MERCER A., BRUNETTI C., MCFADDEN G., FLEMING S.B. (2003). Analysis of an orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **100 (25)**: 15137-42. Erratum in: 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **101 (14)**: 5180.

SEKIGUCHI J, SHUMAN S. (1997). Ligation of RNA-containing duplexes by vaccinia DNA ligase. *Biochemistry*; **36 (29)**: 9073-9.

SEKIGUCHI J., SEEMAN N.C., SHUMAN S. (1996). Resolution of Holliday junctions by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **93(2)**: 785-9.

SENGER D.R., GALLI S.J., DVORAK A.M., PERRUZZI C.A., HARVEY V.S., DVORAK HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*; **219(4587)**: 983-5.

SENKEVICH T.G., KOONIN E.V., BUGERT J.J., DARAI G., MOSS B. (1997). The genome of molluscum contagiosum virus: analysis and comparison with other poxviruses. *Virology*; **233(1)**: 19-42.

SENTSUI H., MURAKAMI K, INOSHIMA Y., SHIBAHARA T., YOKOMIZO Y. (1999). Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon γ . *Veterinary Microbiology*; **70**: 143-152.

SHACKELTON L.A., HOLMES E.C. (2004) The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. *Trends Microbiol.*; **12(10)**: 458-65.

SHACKELTON L.A., HOLMES E.C. (2006). Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J. Virol.*; **80**: 3666-3669.

SHACKELTON L.A., PARRISH C.R., TRUYEN U., HOLMES E.C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*; **102 (2)**: 379-84.

SHACKELTON L.A., PARRISH C.R., TRUYEN U., HOLMES E.C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102(2)**: 379-84.

- SHACKELTON L.A., RAMBAUT A., PYBUS O.G., HOLMES E.C. (2006). JC virus evolution and its association with human populations. *J. Virol.*; **80**: 9928–9933.
- SHACKELTON LA, HOELZER K, PARRISH CR, HOLMES EC. (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol*; **88(Pt 12)**: 3294-301.
- SHCHELKUNOV S.N., TOTMENIN A.V. (1995). Two types of deletions in orthopoxvirus genomes. *Virus Genes*; **9(3)**: 231-45.
- SHUMAN S. (1998). Vaccinia virus DNA topoisomerase: a model eukaryotic type IB enzyme. *Biochim Biophys Acta*; **1400(1-3)**: 321-37.
- SHUMAN S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*; **66**: 1–40.
- SMITH G.L., SYMONS J.A., KHANNA A., VANDERPLASSCHEN A., ALCAMÍ A. (1997). Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Rev*; **159**:137-54.
- SPENCER J.V., LOCKRIDGE K.M., BARRY P.A., LIN G., TSANG M., PENFOLD M.E., SCHALL T.J. (2002). Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol*; **76(7)**: 3585.
- SPYROPOULOS D.D., ROBERTS B.E., PANICALI D.L., COHEN L.K. (1988). Delineation of the viral products of recombination in vaccinia virus-infected cells. *J Virol.*; **62(3)**: 1046–1054.
- SRINIVASAN V., SCHNITZLEIN W.M., TRIPATHY D.N. (2001). Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *J Virol.*; **75**: 1681–8.
- STRAYER D.S., CABIRAC G., SELL S., LEIBOWITZ JL. (1983). Malignant rabbit fibroma virus: observations on the culture and histopathologic characteristics of a new virus-induced rabbit tumor. *J Natl Cancer Inst*; **71(1)**: 91-104.
- STRAYER D.S., SELL S. (1983). Immunohistology of malignant rabbit fibroma virus--a comparative study with rabbit myxoma virus. *J Natl Cancer Inst*; **71(1)**: 105-16.
- STRAYER D.S., SKALETSKY E., LEIBOWITZ J.L., DOMBROWSKI J. (1987). Growth of malignant rabbit fibroma virus in lymphoid cells. *Virology*; **158(1)**: 147-57.
- SZOSTAK J.W., ORR-WEAVER T.L., ROTHSTEIN R.J., STAHL FW. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*; **33(1)**: 25-35.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*; **24**: 1596-1599.
- TAN S.T., BLAKE G.B., CHAMBERS S. (1991). Recurrent orf in immunocompromised host. *Britain Journal of Plastic Surgery*; **44**: 465-467.
- THIRY E., MEURENS F., MUYLKENS B., MCVOY M., GOGEV S., THIRY J., VANDERPLASSCHEN A., EPSTEIN A., KEIL G., SCHYNTS F. (2005). Recombination in alphaherpesviruses. *Rev. Med. Virol.*; **15 (2)**: 89-103.

- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; **22(22)**: 4673-80.
- UEDA N., WISE L.M., STACKER S.A., FLEMING S.B., MERCER A.A. (2003). Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. *Virology*; **305 (2)**: 298-309.
- UMEMURA T., TANAKA Y., KIYOSAWA K., ALTER H.J., SHIH J.W.-K. (2002). Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Lett.*; **510**: 171–174.
- UPTON C., MACEN J.L., MARANCHUK R.A., DELANGE A.M., MCFADDEN G. (1988). Tumorigenic poxviruses: fine analysis of the recombination junctions in malignant rabbit fibroma virus, a recombinant between Shope fibroma virus and myxoma virus. *Virology*; **166 (1)**: 229-39.
- UPTON C., MACEN J.L., SCHREIBER M., MCFADDEN G. (1991). Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*; **184(1)**: 370-82.
- UPTON C., MCFADDEN G. (1986). DNA sequence homology between the terminal inverted repeats of Shope fibroma virus and an endogenous cellular plasmid species. *Mol Cell Biol.*; **6**: 265–76.
- UPTON C., MCFADDEN G. (1986). Identification and nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of Shope fibroma virus. *J Virol.*; **60**: 920–7.
- UPTON C., SLACK S., HUNTER A.L., EHLERS A., ROPER R.L. (2003). Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J. Virol.*; **77 (13)**: 7590-600.
- UZEL M., SASMAZ S., OZKUL A., CETINUS E., BILGIC E., KARAOGUZ A. (2004). Swan-neck deformity and paresthesia following giant orf. *J. Dermatol.*; **31 (2)**: 116-8.
- VAN LINGEN R.G., FRANK R.G., KOOPMAN R.J., JONKMAN, M.F. (2006). Human orf complicated by mucous membrane pemphigoid. *Clinical Experimental Dermatology*; **31 (5)**: 711-2.
- VIEIRA P., DE WAAL-MALEFYT R., DANG M.N., JOHNSON K.E., KASTELEIN R., FIORENTINO D.F., DEVRIES J.E., RONCAROLO M.G., MOSMANN T.R., MOORE K.W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**: 1172–6.
- VOLKERT F.C., YOUNG C.S.H. (1983). The genetic analysis of recombination using adenovirus overlapping terminal DNA fragments. *Virology*; **125**: 175-193.
- WATSON P. (2004). Differential diagnosis of oral lesions and FMD in sheep. *In Practice*; **26**: 182-191.
- WEBSTER R.G., LAVER W.G., AIR G.M., SCHILD G.C. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*; **296(5853)**: 115-21.
- WEILLER G.F. (1998). Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Mol. Biol. Evol.*; **15 (3)**: 326-35.

WHITE K.P., ZEDEK D.C., WHITE W.L., SIMPSON E.L., HESTER E., MORRISON L., LAZAROVA Z., LIU D., SCAGLIARINI A., KURTZ S.E., WHITE C.R. JR., YANCEY K.B., BLAUVELT A. (2008). Orf-induced immunobullous disease: A distinct autoimmune blistering disorder. *Journal of American Academy of Dermatology*; **58 (1)**: 49-55.

WHITEHOUSE, HL. (1963). A theory of crossing-over by means of hybrid deoxyribonucleic acid. *Nature*; **199**: 1034–1040.

WILDY P. (1955). Recombination with herpes simplex virus. *J Gen Microbiol*; **13(2)**: 346-60.

WISE L.M., VEIKKOLA T., MERCER A.A., SAVORY L.J., FLEMING S.B., CAESAR C., VITALI A., MAKINEN T., ALITALO K., STACKER SA. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96(6)**: 3071-6.

WITTEK R., KUENZLE C.C., WYLER R. (1979). High G+C content in paramyxovirus DNA. *Journal of General Virology*; **43**: 231-234.

WIUF C., CHRISTENSEN T., HEIN J. (2001). A simulation study of the reliability of recombination detection methods. *Mol Biol Evol*; **18(10)**: 1929-39.

WOROBAY M. (2001). A novel approach to detecting and measuring recombination: new insights into evolution in viruses, bacteria, and mitochondria. *Mol. Biol. Evol.*; **18 (8)**: 1425-34.

WOROBAY M., HOLMES E.C. (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **80(10)**: 2535-43.

YERUHAM I., NYSKA A., ABRAHAM A. (1994). Parapox infection in a gazelle kid. (*Gazella gazella*). *Journal of wildlife disease*; **30**: 260-262.

ZANIN E., BOLOGNANI G., FARINA G., FRAQUELLI G., MORESCO A. (1997). Segnalazione di un caso di Ectima contagioso nel muflone (ovis musimon, Pallas, 1811) in provincia di Trento. *Atti V Congresso Fe.Me.S.P.Rum. Ozzano Emilia (Bo)5-6 settembre 1997*; 455-459.