

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

DOTTORATO DI RICERCA

Epidemiologia e profilassi delle malattie infettive

XX Ciclo

**Settore scientifico disciplinare di afferenza:**

VET05

**PARAPOXVIRUS:  
BASI GENOMICHE DELLA PATOGENESI**

**Presentata da: Laura Gallina**

**Coordinatore Dottorato**

**Professore Luigi Morganti**

**Relatore**

**Alessandra Scagliarini**

**Esame finale anno 2008**



# INDICE

INTRODUZIONE	1
<b>- PARTE GENERALE</b>	
1. EZIOLOGIA	3
1.1 Inquadramento tassonomico	3
1.2 Morfologia	5
1.3 Genoma	8
1.4 Struttura antigenica	16
1.5 Proprietà biologiche	22
1.6 Resistenza agli agenti chimico-fisici	24
1.7 Ciclo replicativo	25
2. EPIDEMIOLOGIA	33
3. PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA	39
3.1 Infezione negli animali	39
3.2 Infezione nell'uomo	44
4. CONTROLLO DELL'INFEZIONE	47
4.1 Profilassi diretta	47
4.2 Profilassi indiretta	48
4.3 Diagnosi	50
4.4 Terapia	53

<b>- PARTE SPERIMENTALE A:</b>	
<i>Delezione del gene FIL</i>	55

## MATERIALI E METODI

1. Costruzione del vettore plasmidico	58
1.1 Virus	58
1.2 Disegno dei primers delle braccia amplificazione e taglio con enzimi di restrizione	59
1.3 Purificazione del DNA su gel di agarosio	60
1.4 Taglio mediante enzimi di restrizione	60
1.5 Defosforillazione mediante SAP	60
1.6 Precipitazione con etanolo	60
1.7 Reazione con ligasi	61
1.8 Trasformazione di cellule competenti	62
1.9 Boiling prep method	62
2. Transfezione	62
2.1 Substrati cellulari	62
2.2 Transfezione	63
3. Purificazione del virus ricombinante	64
3.1 Controllo della delezione mediante PCR	65
3.2 Virus neutralizzazione con anticorpi monoclonali	66
3.3 Microscopia elettronica	66
3.4 Prova immunostochimica	66

RISULTATI PARTE SPERIMENTALE A	67
--------------------------------	----

<b>- PARTE SPERIMENTALE B:</b>	
<i>Infezione sperimentale in ovi-caprini e analisi genomica</i>	81

MATERIALI E METODI	84
--------------------	----

1. Animali	84
1.1 Infezione sperimentale	84
1.2 Clinical-score	84

1.3	Prelievo bioptico	85
1.4	Estrazione del DNA	85
1.5	Amplificazione dei geni dell'Orf virus	85
	1.5.1 Amplificazione del VEGF virale	86
	1.5.2 Amplificazione dell'A33R virale	87
	1.5.3 Amplificazione dell'A34R virale	87
	1.5.4 Amplificazione dell'F1L virale	87
	1.5.5 Amplificazione del gene B2L del PCPV	88
	1.5.6 Amplificazione del gene IL10 dell'Orf Virus	88
1.6	Corsa elettroforetica, purificazione degli amplificati e sequenziamento	89
1.7	Immunoistochimica	89
1.8	Carica virale e vitalità del virus	90
2.	Approfondimenti sulle ORF s A33R e A34R	91
	<b>RISULTATI PARTE SPERIMENTALE B</b>	93
	<b>- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	111
	<b>- APPENDICI</b>	
	APPENDICE I	119
	APPENDICE II	121
	<b>- BIBLIOGRAFIA</b>	123



## **Introduzione.**

I Parapoxvirus (PPV) rappresentano uno degli otto generi della sottofamiglia chordopoxvirinae nella famiglia Poxviridae. I PPV causano malattie eruttive cutanee che colpiscono mammiferi domestici e selvatici e l'uomo. Questi virus possono essere distinti morfologicamente dagli altri poxvirus mediante microscopia elettronica in colorazione negativa a causa del loro aspetto ovoidale e della presenza di un tubulo superficiale che li avvolge a spirale. Tra i membri della sottofamiglia chordopoxvirinae, i PPV presentano diverse caratteristiche peculiari tra le quali il genoma di minori dimensioni e con il maggiore contenuto in G+C. La struttura generale del genoma dei PPV ricalca per molti aspetti quella di altri poxvirus e l'alto livello di colinearità con il genoma del più conosciuto vaccinia virus (VACV), specie nella parte centrale dove si collocano i geni essenziali, ha facilitato notevolmente lo studio del genoma. Le regioni terminali del genoma presentano sequenze geniche uniche al genere Parapoxvirus indicando un significativo grado di divergenza rispetto agli altri poxvirus. Queste sequenze geniche non essenziali per la replicazione del virus in coltura cellulare, codificano per fattori di virulenza che intervengono nelle fasi di interazione ospite-virus attraverso l'immunomodulazione e la determinazione dell'host range. I PPV come altri poxvirus presentano una elevata capacità di adattamento in colture cellulari di specie animali diverse, ma un ristretto spettro d'ospite in condizioni naturali. Recentemente è stato ipotizzato che le sequenze geniche relative agli open reading frames (ORFs) 109 e 110, del genoma di orf virus, possano determinare la specie specificità dei ceppi virali in condizioni naturali. Questa ipotesi, basata su un numero limitato di sequenze di isolati, provenienti da ovini e caprini, potrebbe far pensare che le caratteristiche dei domini funzionali delle proteine espresse degli ORFs 109 e 110 possano determinare una diversa specie specificità dei ceppi di orf virus.

In analogia con altri poxvirus anche i PPV replicano nel citoplasma cellulare producendo diversi tipi di forme infettanti, gli intracellular mature virions (IMV), intracellular enveloped virions (IEV) e gli extracellular enveloped virions (EEV).

Queste forme virali si differenziano per il numero di membrane che li avvolgono e per le vie di infezione che utilizzano. Le proteine codificate dagli ORFs 109 e 110 sono ortologhe alle A33R ed A34R del VACV e si localizzano sull'envelope degli EEV. Diversi Autori (Turner and Squires 1971; Appleyard and Andrews 1974) hanno dimostrato che, gli anticorpi prodotti nei confronti delle proteine presenti sugli EEV, sono in grado di proteggere maggiormente gli animali in seguito a challenge rispetto agli anticorpi prodotti verso le proteine presenti sulla superficie degli IMV.

Alcune delle proteine localizzate sull'envelope degli IMV sono state recentemente caratterizzate (Housawi *et al* 1998; Scagliarini *et al* 2002; Spehener *et al* 2004). In particolare, la proteina immunodominante F1L si è dimostrata in grado di interagire con i glicosaminoglicani (GAGs) delle membrane cellulari dell'ospite determinando le prime fasi di attacco e adsorbimento. Inoltre, i dati relativi alla predizione della struttura proteica (Scagliarini *et al* 2002) hanno fatto ipotizzare che F1L rappresenti il costituente principale del tubulo superficiale dei virioni ed in analogia alla proteina H3L di VACV, si ancori attraverso il dominio C-terminale idrofobico, alla superficie degli IMV.

In questo studio abbiamo voluto approfondire aspetti legati alla morfogenesi dei Parapoxvirus andando a studiare le proprietà biologiche del virus delecto del gene codificante la proteina immunodominante F1L omologa al gene H3L di VACV. E' stato inoltre effettuato uno studio mirato a chiarire alcuni aspetti patogenetici quali le caratteristiche virali che determinano l'host range. A questo scopo è stata condotta un'infezione sperimentale ed un'analisi delle proteine codificate dagli ORFs 109 e 110 di isolati virali provenienti da ovini e caprini.

# 1 EZIOLOGIA

## 1.1 Inquadramento tassonomico

I Parapoxvirus (PPV) appartengono alla sottofamiglia Chordopoxvirinae, famiglia *Poxviridae*. I *Poxviridae* rappresentano un'ampia famiglia di virus a DNA che replicano all'interno del citoplasma. Questa famiglia è suddivisa in due sottofamiglie, quella delle Entomopoxvirinae e quella delle Chordopoxvirinae che infettano rispettivamente, gli insetti e i cordati.

Le Chordopoxvirinae a loro volta vengono suddivise in otto generi (Avipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Capripoxvirus, Suipoxvirus, Leporipoxvirus, Yatapoxvirus e Parapoxvirus) mentre le Entomopoxvirinae si dividono in tre generi (A, B e C). 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 *Poxviridae* in primo luogo la diversa morfologia e l'elevato contenuto in G/C che, in questo genere, è del 63% e negli altri è del 36-40%.

Nonostante i Parapoxvirus esibiscano un certo grado di cross-reattività con i membri dei generi Orthopoxvirus e Capripoxvirus non c'è nessuna evidenza di cross-protezione. Robinson e Mercer (1988) hanno confermato la diversità immunologica fra i Parapoxvirus e gli Orthopoxvirus dimostrando che non esiste cross-protezione tra Orf (OV) e Vaccinia virus (VACV), infatti, agnelli immunizzati contro il virus Orf non risultano protetti nei confronti di Vaccinia virus e viceversa. La cross-protezione è condivisa solo dai membri dello stesso genere.

Il genere Parapoxvirus comprende attualmente cinque membri: il virus orf 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).

Ci sono anche quelli che vengono definiti “tentative members” poiché sono in attesa di essere inserite nel genere Parapoxvirus: il virus del vaiolo della foca (Becher *et al.*, 2002), il Parapoxvirus del cammello o Ausdyk disease (Dashtseren *et al.* 1984) e l’ectima contagioso del camoscio. Sarebbe poi da inserire tra queste specie anche il Parapoxvirus del leone marino (Sea Lion Poxvirus-1) anche se potrebbe trattarsi di un virus della medesima specie di quello della foca, pur presentandosi da esso filogeneticamente distante ed essendo infrequente, anche se possibile, la trasmissione del virus tra focidi ed otaridi (Nollens *et al* 2006).

Il Poxvirus dello scoiattolo rosso (Sainsbury e Gurnell, 1995) per la sua morfologia era stato inserito in un primo tempo, nel genere Parapoxvirus, veniva infatti identificato come (SPPV), è stato recentemente riclassificato come Squirrelpoxvirus (SQPV), unica specie di un nuovo genere all’interno della famiglia delle *Poxviridae*: gli studi filogenetici condotti sulla proteina maggiore dell’envelope di questo virus dimostrano infatti un’elevata distanza genetica dai Parapoxvirus (McInnes *et al* 2006).

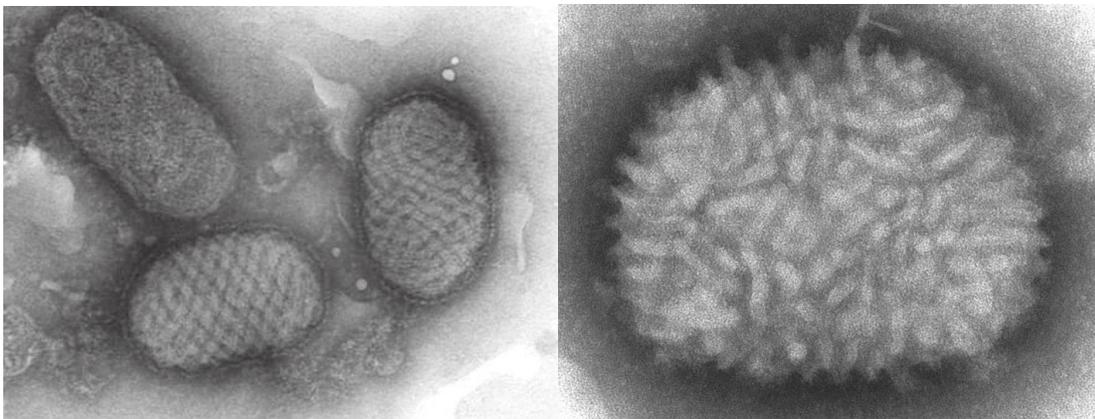
L’attuale classificazione è basata sugli ospiti naturali delle diverse specie virali, sulla struttura genomica e sul profilo delle mappe di restrizione (Murphy *et al* 1995).

Specie	Specie colpite	Morfologia del virione	Dimensioni genomiche	GenBank (numero di accesso)
Orf virus	Sheep, goats, japanese serow, camels, humans	Ovoid 260-160 nm	138 Kbp 64% GC	OV-NZ2 DQ184476 OV-IA82 AY386263 OV-SA00 AY386264
Bovine papular stomatitis virus	Cattle, humans	Ovoid 260-160 nm	134 Kbp	BV-AR02, AY386265
Pseudocowpox virus	Cattle, humans	Ovoid 260-160 nm		
Parapoxvirus of red deer in NZ	Red deer	Ovoid 260-160 nm		
Sealpox virus (tentative)	Seal sp, humans	Ovoid 260-160 nm		
Ausdyk virus (tentative)	Camels	Ovoid		
Parapoxvirus of reinder (tentative)	Reindeer, humans	Ovoid		
Chamois contagious ecthyma virus (tentative)	Chamois	Ovoid		

## 1.2 Morfologia

I virus appartenenti al genere Parapoxvirus, al microscopio elettronico, presentano una particolare morfologia che ha contribuito alla loro inclusione in un gruppo separato dagli altri membri appartenenti alla famiglia *Poxviridae*.

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 (fig.1.1).



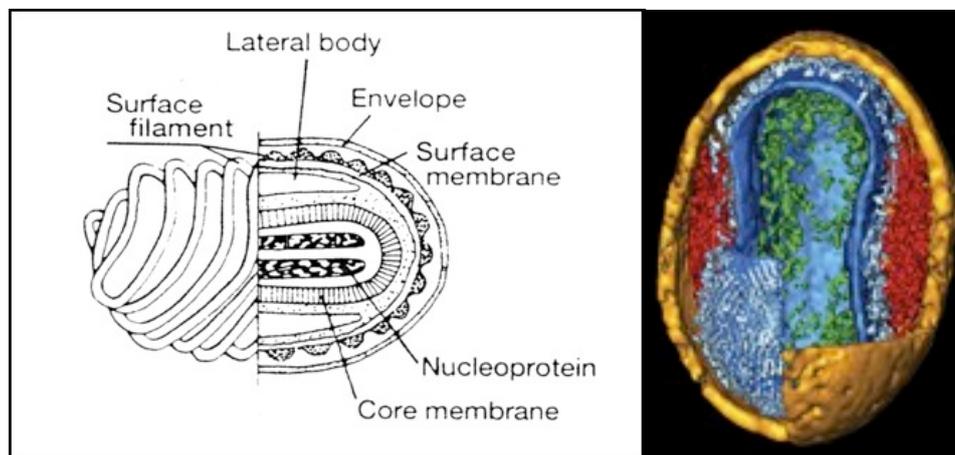
**Figura 1.1** OV a sinistra e VACV a destra. (Foto eseguite in microscopia elettronica colorazione in contrasto negativo. Tratte da [www.virustaxonomyonline.com](http://www.virustaxonomyonline.com))

Al microscopio elettronico con colorazione in contrasto negativo, analogamente a quanto osservato per il Vaccinia virus, i Parapoxvirus appaiono in due forme: la forma C (o "capsular form") in cui il colorante può penetrare nel virione e mostra una sottile membrana che circonda il core amorfo e la forma M (o "mulberry form") in cui il virione, impermeabile al colorante, rivela una struttura tubulare regolare che si avvolge a spirale sinistrorsa (Naginton e Horne, 1962).

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.

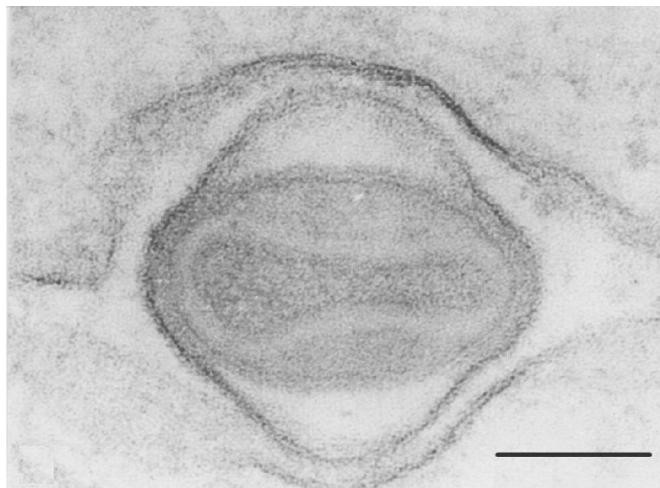
L'osservazione al microscopio elettronico di criolisati cellulari infetti mostra infatti due diversi tipi di virioni, quelli dotati di envelope che presentano una superficie liscia e quelli con tipico aspetto a “gomitolo di lana”, solitamente più numerosi e detti anche “IMV”(intracellular mature virion). 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), (fig. 2).



**Figura 2.** A sinistra: struttura schematizzata del virus orf. A destra: Immagine del VACV ottenuta con la crio-tomografia elettronica: il virus presenta una membrana esterna (arancione) che include i due corpi laterali (rossi), il core biconcavo (blu) con la massa compatta di DNA (verde) e gli spike più cristallini (azzurri) (Grunwald e Cyrklatt, 2006)

Spehner e collaboratori (2004) hanno esaminato il virus orf mediante crio-elettromicroscopia con colorazione in contrasto negativo e hanno confermato che la forma ovoidale e la struttura di tubuli superficiali avvolti a spirale sono caratteristiche autentiche dei parapoxvirus e non artefatti dovuti alla preparazione del campione per

l'osservazione al microscopio elettronico in contrasto negativo. La struttura superficiale dell'OV è stata descritta anche utilizzando un microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (UHR-SEM) e un metodo di preparazione del campione "non-coating" per evitare la presenza di artefatti durante l'osservazione (Hiramatsu *et al.* 1999). Sulla superficie dell'OV appaiono sottili protrusioni lineari che avvolgono le particelle dall'alto al basso, il punto d'inizio e di fine di queste strutture spiraliformi, così come l'angolo di rotazione, appaiono piuttosto variabili. Queste protrusioni spiraliformi osservate mediante UHR-SEM corrispondono esattamente ai filamenti spiraliformi osservati al microscopio elettronico in colorazione negativa. La struttura interna del virus, caratterizzata da involucri concentrici che proteggono il genoma presenta, nella parte più interna, può essere evidenziata mediante osservazione di sezioni ultrafini di substrati cellulari infetti. Il core, a forma di disco biconcavo per la presenza di due corpi proteici laterali, presenta esternamente uno strato proteico liscio in cui si inseriscono elementi cilindrici di origine lipidica. Il materiale nucleoproteico all'interno del core si presenta sottoforma di uno spesso filamento a forma di S e può essere evidenziato dopo sonicazione o trattamento con urea 4 M (Fig. 3) (Naginton e Horne, 1962).



**figura 3.** Pseudocowpox virus, (foto concessa dal Dr Frank Fenner, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, Australia)

### 1.3 Genoma

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 tutte 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'eterogeneità 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, sono conservati la distribuzione e l'orientamento genico in tutta la

famiglia delle *Chordopoxvirinae*: la regione centrale più conservata, contiene i geni essenziali per la replicazione del DNA e la sintesi delle strutture virali nel citoplasma delle cellule infette (Mercer *et al.* 1995) mentre le porzioni terminali presentano sequenze più variabili e contengono geni non essenziali responsabili della virulenza e della patogenicità, queste regioni presentano un elevato grado di divergenza tra il virus orf e quello del Vaccinia.

In particolare, la porzione centrale del genoma contiene 88 geni comuni a tutti i chordopoxvirus e rappresenta il 70% del genoma dell'OV (Gubser *et al.* 2004).

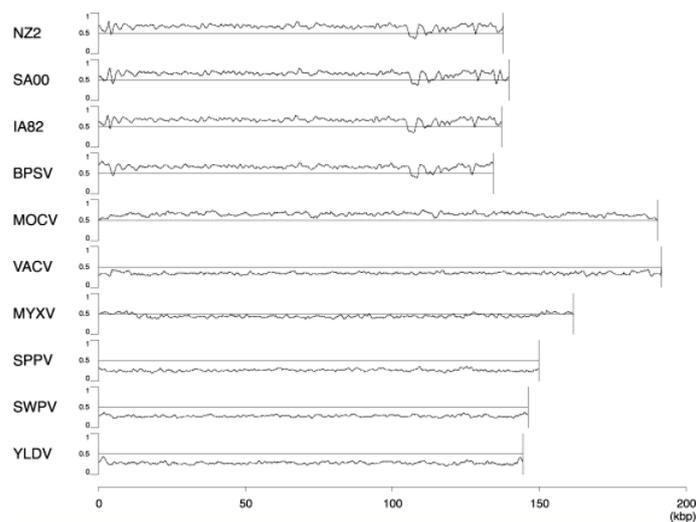
L'analisi genomica, condotta da Mercer e collaboratori, ha predetto 132 geni nel genoma dei tre isolati virali dell'OV e 133 per il BPSV. Per quanto riguarda gli altri due membri del genere parapoxvirus, PCPV e PVNZ, sono stati pubblicati su GenBank solo sequenze di singoli geni, ma la comparazione di altre sequenze geniche non ancora pubblicate confermano che OV, BPSV, PCPV e PVNZ costituiscono un genere distinto all'interno delle *Chordopoxvirinae*. Inoltre analisi filogenetiche dimostrano una più stretta correlazione fra il PCPV e l'OV piuttosto che fra il PCPV e BPSV, l'altro parapoxvirus del bovino,. A livello genomico l'OV e il BPSV hanno un'identità nucleotidica che va dal 67 al 75% (contro il 94% d'identità fra OV-SA00 e OV-IA82) e contengono 127 geni che hanno lo stesso ordine e la stessa direzione; 15 di questi geni sono peculiari del genere parapoxvirus, queste caratteristiche supportano l'inclusione di BPSV e OV nello stesso genere (Delhon *et al.* 2004). L'identità amminoacidica media fra il BPSV AR002 e l'OV-SA00 è del del 71% (94% fra OV-SA00 e OV-IA82).

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 I (VACV H6R) e le proteine strutturali immunogene dell'envelope tra le quali quella immunodominante di 39 kDa omologa al gene H3L del Vaccinia virus, la proteina altamente immunogena di 65 kDa probabilmente associata al core virale (Housawi *et*

*al.* 1998) omologa alla A3L del Vaccinia e la proteina di fusione di 10 kDa (Haig e Mercer, 1998) omologa alla A27L del Vaccinia.

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,).

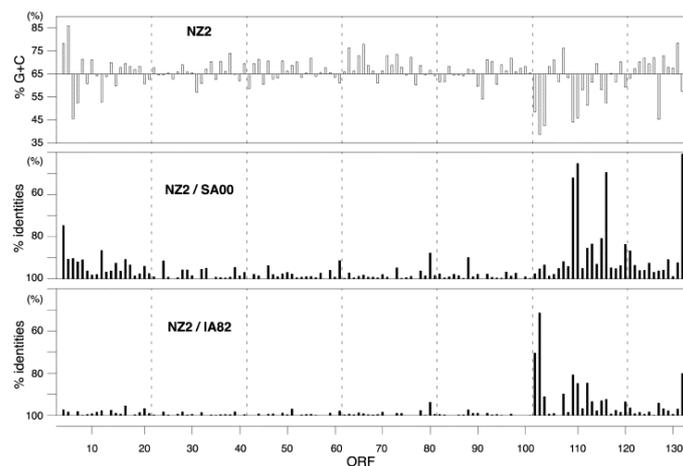
In particolare, nelle regioni terminali, sono stati individuati specifici punti del genoma (porzioni geniche 102-104 e 109-112) in cui il contenuto in G+C diminuisce drasticamente e uniformemente in tutti e quattro i parapoxvirus sequenziati: 43,1% NZ2, 42,8% SA00, 41,7% IA82 e 46,1% BPSV come fosse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



**Figura 1.** 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 2).



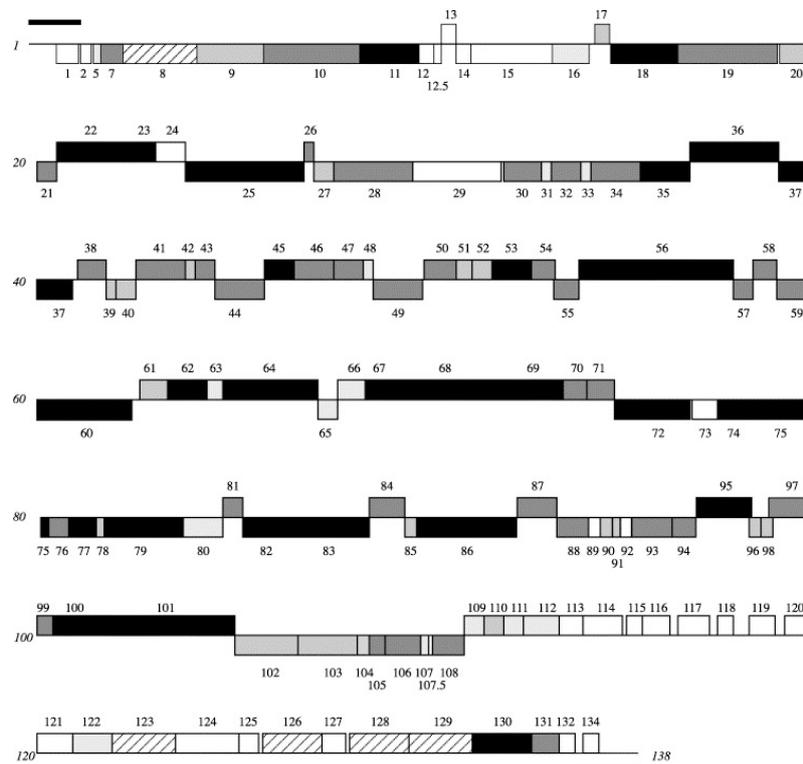
**Figura 2.** Analisi della variabilità delle regioni codificanti dell'OV. Ogni finestra rappresenta il genoma dell'OV NZ2 con tutte le 132 ORF predette in questo studio. La finestra più in alto rappresenta il contenuto in G+C % e la sua variabilità rispetto alla media del 65%. La finestra centrale e la terza finestra in basso mostrano la percentuale di identità amminoacidica rispettivamente fra NZ2 e SA00 e NZ2 e IA82 (Mercer *et al.* 2005).

Le 5 proteine più variabili dell'OV (geni 132, 110, 116, 103 e 109) mostrano un'identità di sequenza del 38-52% . (Mercer *et al.* 2005).

Le ORF 109 e 110 sono ortologhe di due proteine del VACV che sono presenti in tutti i poxvirus dei mammiferi (109) o dei vertebrati (110): A33R e A34R. Sono due glicoproteine dell'envelope presenti nei virioni con envelope intracellulari (IEV) ed extracellulari (EEV) inoltre, la proteina A33R è stata dimostrata essere il target di anticorpi neutralizzanti. Le ORFs 109 e 110 dell' OV-SA00 e dell' OV-IA82 hanno una bassa identità amminoacidica (rispettivamente 56 e 49%), anche nei confronti delle ORF del BPSV (49-50%), le differenze maggiori sono presenti in quello che si è supposto essere il dominio esterno della proteina (Delhon *et al.*, 2004). L'allineamento delle sequenze del gene 109 di OV-IA82, NZ2 e Orf-11 mostra un'identità amminoacidica dell' 88-97%. Al contrario il gene 109 di OV-SA00, l'unico isolato da capra, mostra con gli altri isolati ovini un'identità amminoacidica solo del 50-55%. La variabilità intra-specie, rilevata per queste due proteine dell'OV, potrebbe essere associata a requisiti specifici che il virus deve possedere per infettare ospiti di specie diversa come ad esempio capre e pecore (Delhon *et al.* 2004) (figura 3).

Queste osservazioni fanno ipotizzare che la variabilità di sequenza osservata fra gli isolati virali, sia nelle proteine di superficie dei virioni che nei fattori di virulenza, rappresenti degli “escape mutants”. Finora infatti, la capacità dell'OV di re-infettare gli animali è sempre stata associata all'espressioni di fattori in grado di favorire l'evasione del sistema immunitario (Haig *et al.* 2002), ma è anche possibile che ceppi che esprimono varianti di particolari proteine virali abbiano un effettivo vantaggio di selezione nella re-infezione (Mercer *et al.* 2005). Sia l'OV che il BPSV codificano per proteine (ORFs 102-103) che sembrano essere omologhe a proteine degli orthopoxvirus coinvolte nella formazione di inclusioni di tipo A (ATIs), corpi proteici prodotti nelle cellule infettate con alcuni ceppi di orthopoxvirus (McKelvey *et al.* 2002). Le ORF 102 e 103 dei parapoxvirus sono molto variabili e mostrano un'identità amminoacidica rispettivamente del 67-76% e del 57-58%. Vista la natura molto variabile di questi geni, anche all'interno delle *Chordopoxvirinae*, gli omologhi dei parapoxvirus potrebbero avere un ruolo nei meccanismi genere e specie specifici

di ritenzione o disseminazione degli IMVs (intracellular mature virions) (Delhon *et al.* 2004).



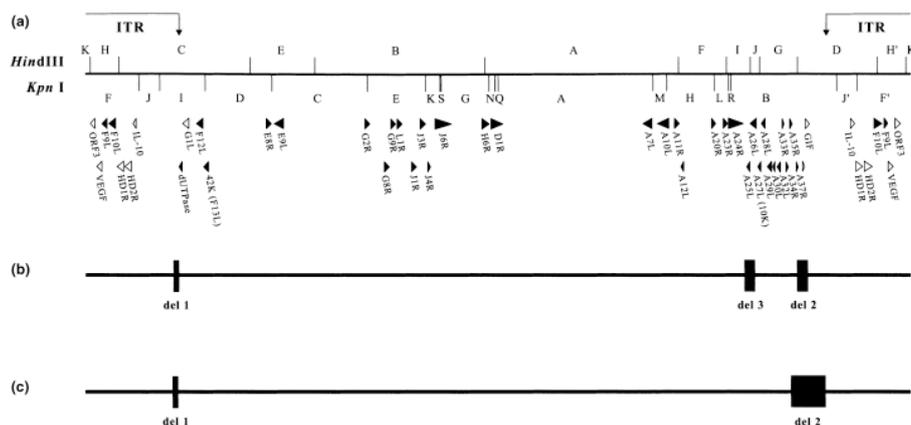
**Figura 3.** Mappa genomica del virus orf NZ2. I geni al di sopra della linea vengono trascritti indirezione 5'-3' mentre quelli al di sotto sono trascritti nell'altra direzione. Ogni linea corrisponde a 20kbp. Le quattro sfumature di grigio, dalla più scura alla più chiara corrispondono ai punteggi, assegnati mediante BLASTP, con l'ortologo VACV: >300, 100-300, 55-99 e 30 54 rispettivamente. I geni dell'OV che non hanno ortologi nel VACV sono rappresentati da quadrati bianchi.

Il passaggio in coltura cellulare, provoca alterazioni genomiche associate all'attenuazione virale che non possono dirsi costanti in tutti i casi; questi fenomeni di riarrangiamento genomico sono stati descritti da diversi Autori (Fleming *et al.* 1995; Cottone *et al.* 1998; Rziha *et al.* 1999; McInnes *et al.* 2002).

In particolare, nel ceppo NZ-2 adattato in coltura (NZ-2p22), 19 kbp dell'estremità genomica destra sono risultate duplicate e traslocate all'estremità sinistra provocando la delezione di una regione di 7 kb. Dei tre geni deleti nel ceppo adattato, due risultano omologhi al Vaccinia e sono E2L omologo del 5K (Fraser *et al.* 1991), E3L codificante per una dUTPasi omologo del gene F2L (Fleming *et al.* 1995; Cottone *et*

al. 2002) e il gene G1L (Sullivan *et al.* 1995). La funzione di questi geni non è ancora del tutto conosciuta, ma la variante virale adattata in coltura, provoca sempre lesioni meno gravi e con risoluzione molto più rapida rispetto al wild type. L'adattamento in coltura di altri ceppi, nonostante il riarrangiamento genomico non coinvolga sempre gli stessi geni, porta costantemente ad attenuazione virale.

Gli studi sull'adattamento in coltura del ceppo tedesco D1701 confermano come, il riarrangiamento genomico e i fenomeni di traslocazione, non possano dirsi costanti in tutti i casi, infatti nel ceppo adattato viene deletato solo il gene E3L con un arricchimento di 18 kbp delle ITR rispetto al wild type conseguente alla duplicazione. Ulteriori studi (Buttner e Rzha 2002) hanno mostrato che, oltre alle delezioni, sono possibili anche duplicazioni di geni virali. L'adattamento su cellule ottenute da specie animali non permissive è accompagnata dalla delezione di tre differenti regioni genomiche, ognuna di 2-3.7 kbp rispetto allo stesso virus propagato in una linea cellulare di ruminanti (figura 4).



**Figura 4.** Mappa delle delezioni genomiche del ceppo D1701 in seguito ad adattamento in coltura cellulare (Buttner and Rziha 2002)

Questi risultati dimostrano che, l'adattamento in coltura cellulare e la successiva attenuazione, sono associate alla perdita di geni non essenziali per il virus, ma legati alla sua virulenza e al tropismo cellulare. L'identificazione di geni non essenziali risulta fondamentale per un'eventuale delezione ed inserimento di geni esogeni in funzione della creazione di orf virus ricombinanti.

Il BPSV e l'OV possiedono rispettivamente 113 e 111 geni omologhi a quelli di altri poxvirus, fra questi sono inclusi gli 88 geni conservati in tutti i Chordopoxvirus, fra questi, 7 degli undici geni più conservati sono coinvolti nella trascrizione, questo significa che i parapoxvirus utilizzano gli stessi meccanismi di base che utilizzano gli altri Chordopoxvirus per la replicazione (Upton *et al.* 2003). Analisi filogenetiche hanno mostrato che i parapoxvirus e il virus del molluscum contagiosum (MOCV) si differenziano dagli altri generi dei poxvirus dei mammiferi. PPV e MOCV condividono alcune caratteristiche genomiche, infatti mancano entrambi di alcuni geni, molto conservati all'interno delle *Chordopoxvirinae*, coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi e hanno genomi ricchi in G+C (64%). La mancanza di questi geni potrebbe essere la conseguenza dell'adattamento ad uno specifico tropismo di tessuto entrambi infatti, crescono in cellule in attiva replicazione (McKeever *et al.* 1988)

## 1.4 Struttura antigenica

Diversamente da quanto accade per il Vaccinia virus sono poche le conoscenze riguardo alle funzioni dei polipeptidi dell'orf virus nell'interazione virus/ospite o nell'induzione della risposta immunitaria. La complessa struttura antigenica dei Parapoxvirus è stata analizzata mediante elettroforesi dei polipeptidi strutturali. Un pattern di circa 30 polipeptidi con peso molecolare compreso fra 18 kDa e 200 kDa è stato evidenziato da diversi Autori che hanno esaminato ceppi di orf virus in SDS-PAGE (Buddle *et al.* 1984; Lard *et al.* 1991). Il profilo proteico si è dimostrato costante nei diversi ceppi di Parapoxvirus a parte nel range di pesi molecolari compresi tra 37 e 44 kDa.

L'analisi mediante western blotting, finalizzata all'individuazione dei peptidi più importanti dal punto di vista immunologico, ha mostrato, proprio all'interno di questo range di pesi molecolari, la presenza di una proteina di circa 40 kDa che viene costantemente riconosciuta dal siero di animali convalescenti definita immunodominante. Questo risultato è stato confermato mediante anticorpi monoclonali anche per altre specie di Parapoxvirus come la stomatite papulosa del bovino e lo pseudovaiolo (Lard *et al.* 1991). Con la stessa tecnica è stato evidenziato il peptide di 39 kDa anche per il ceppo D1701 dell' Orf virus (Czerny *et al.* 1997).

Il peptide di 39 kDa è il primo componente virale ad essere riconosciuto in corso d'infezione primaria sia negli animali che nell'uomo (McKeever *et al.* 1987; Yerrel *et al.* 1994) inoltre, tramite l'utilizzo di MAb, è stato dimostrato il ruolo di questa proteina nella stimolazione della produzione di anticorpi in grado di neutralizzare il virus (Czerny *et al.* 1997). Il peptide di 39 kDa è localizzato a livello di envelope virale, come dimostrato mediante purificazione virale, e rappresenta il maggiore costituente del tubulo superficiale, per questo motivo è stato definito STP (surface tubule protein) (Buddle *et al.* 1984; Housawi *et al.* 1998).

Il peptide di 39 kDa è la terza proteina strutturale dell'Orf virus ad essere stata identificata. Le altre due proteine sono la proteina di 10 kDa omologa alla A27L

(Naase *et al.* 1991) del Vaccinia e la 42 kDa omologa alla F13L del Vaccinia (Sullivan *et al.* 1994).

Un altro peptide di 65 kDa identificato mediante anticorpi monoclonali viene costantemente riconosciuto dal siero di animali convalescenti dimostrando di essere altamente immunogeno. Rimane comunque ancora da chiarire, il ruolo di questa proteina, probabilmente associata al core virale, nella protezione verso l'infezione da orf virus, (Housawi *et al.* 1998).

Il peptide di 39 kDa è codificato dal gene (o ORF) 59 (inizialmente identificato come F1L, costituito da un open reading frame di 1002 bp in grado di codificare una proteina di 36.7 kDa (Housawi *et al.* 1998). Questo gene è l'omologo del gene H3L del Vaccinia virus che codifica per un peptide immunodominante di 35 kDa costituente principale della membrana superficiale del virione (Zinoviev *et al.* 1994).

Il gene 59 è localizzato nella regione centrale del genoma e mostra un livello d'identità del 34% con il gene H3L, ma questo basso valore è imputabile soprattutto al diverso contenuto in G+C dei due geni, pari al 65.1% per F1L e al 34.6% per H3L (Housawi *et al.* 1998).

Il gene 59 viene probabilmente trascritto nelle fasi tardive dell'infezione, infatti il codone d'inizio codificante per la prima metionina (ATG) si trova all'interno della sequenza TAAT(G) e le prime 30 bp all'estremità 5' sono ricche in A/T.

La proteina F1L contiene 10 amminoacidi in più rispetto a quella codificata da H3L, ma la comparazione delle sequenze amminoacidiche ha evidenziato un elevato grado di similarità sia strutturali che funzionali. Plot d'idrofilità per esempio, mostrano che la porzione N-terminale di entrambe le proteine contiene domini idrofilici regolarmente distanziati e che la porzione C-terminale consiste di una regione idrofobica che il programma SAPS (Statistical Analysis for Protein Sequences, Brendel *et al.* 1993) identifica come un dominio transmembrana. In entrambe le proteine i domini risultano estremamente simili e consistono in una catena idrofobica affiancata da residui idrofilici. L'estremità C-terminale sarebbe ancorata alla

membrana superficiale mentre il resto della catena peptidica e l'estremità N-terminale formerebbero una struttura regolarmente spiralizzata sulla superficie della membrana. Recentemente, approfondimenti sulla struttura secondaria della proteina hanno confermato la presenza di una coda C-terminale inserita nel doppio strato lipidico della membrana e di un dominio globulare esposto all'esterno del virus (Scagliarini *et al.* 2002).

Nella porzione N-terminale della proteina è stato individuato un insolito motivo caratterizzato da una sequenza prolina-alanina non presente nell'omologa proteina del Vaccinia virus. In questa regione, il 55% degli amminoacidi sono proline e il 50% di queste sono seguite da alanine (Housawi *et al.* 1998). L'allineamento di sequenze amminoacidiche, di diversi ceppi virali, ha dimostrato come le sequenze PA possono presentare lunghezza variabile, pur conservando lo stesso motivo strutturale caratterizzato, in tutti i casi, da un lungo loop (Scagliarini *et al.* 2002). Infatti, è stato dimostrato che l'esatto numero di ripetizioni non varia la funzione di questi motivi ripetuti di prolina-alanina per questo i ceppi virali contenenti motivi di minore lunghezza conservano la stessa funzione di quelli caratterizzati da loop più lunghi. La funzione di questi motivi strutturali non è stata ancora chiarita anche se i segmenti ricchi in Ala-Pro sembrano funzionare, in genere, come veri e propri "ponti" in grado di collegare elementi strutturali distinti (Bhandari *et al.* 1986), per questa ragione può essere attribuita una funzione simile anche ai motivi presenti nella proteina F1L. L'analisi della sequenza proteica ha rilevato la presenza di motivi di legame per i glicosaminoglicani (GAGs) cellulari, queste sequenze consenso sono state individuate anche nell'omologa proteina del vaccinia virus (Lin *et al.* 2000, Scagliarini *et al.* 2004). I glicosaminoglicani sono un gruppo di molecole costituite da catene polisaccaridiche che espongono gruppi solfato e sono in grado di agire come recettori cellulari. L'eparan solfato (HS) è il membro dei GAGs, più diffuso e si trova legato a proteine del core delle membrane cellulari e nella matrice extracellulare degli eucarioti. I GAGs, HS in particolare, sono presenti ed esposti sulla superficie cellulare dei tessuti dei mammiferi e fungono quindi da recettori

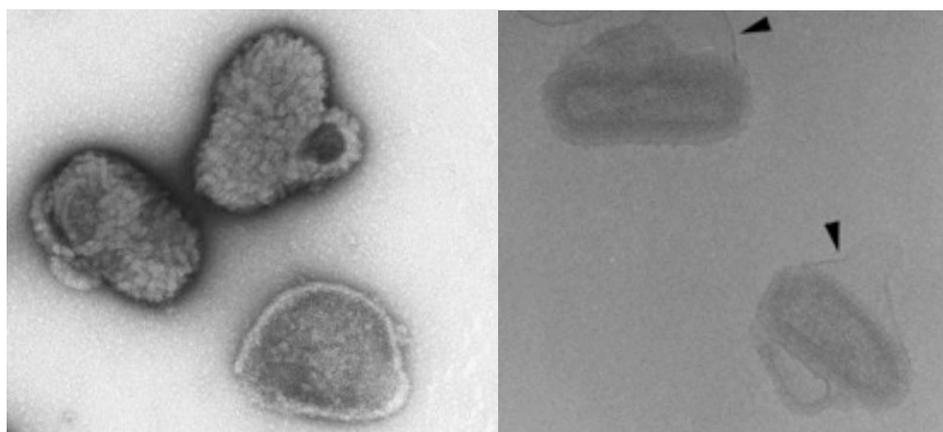
cellulari primari facilmente accessibili per il legame di adesione virale (Spillman *et al.* 2001). La presenza di questi motivi di legame per i GAGs è stata evidenziata su diversi ceppi virali di OV, sia in quelli adattati in coltura che nei wild type, questo suggerisce che il legame del virus ai GAGs presenti sulla superficie cellulare è necessario sia *in vitro* che *in vivo* e che la proteina F1L potrebbe essere coinvolta nell'adsorbimento del virus alla superficie cellulare. Le fasi iniziali d'infezione dell'OV consistono probabilmente nel legame del virus all'HS presente sulle cellule poiché l'attacco del virus alle cellule è inibito in maniera dose-dipendente dall'aggiunta di eparina in coltura cellulare. L'HS potrebbe quindi agire direttamente come recettore o concentrare il virus sulla superficie cellulare per favorire poi l'interazione con specifici recettori ad elevata affinità (Scagliarini *et al.* 2004). Lo stesso meccanismo viene utilizzato da altri Poxvirus e in particolare dalla proteina H3L del VACV (Lin *et al.* 2000) facendo ipotizzare che le fasi iniziali di attacco alla superficie cellulare sia molto simile sia nell'OV e nel VACV. L'efficiente legame della proteina F1L dell'OV ai glicosaminoglicani della superficie cellulare, la sua localizzazione nell'envelope virale e la capacità dell'eparina di bloccare sia il legame alla superficie cellulare che l'infezione delle cellule di testicolo ovino, dimostrano che la proteina F1L ha un importante ruolo durante la fase di adesione del virus alle cellule (Scagliarini *et al.* 2004).

Inoltre, studi di western blotting e immunogold electron microscopy hanno dimostrato che nonostante la variabilità nella sequenza nucleotidica del gene 59 e, di conseguenza, in quella amminoacidica la conformazione strutturale della proteina rimane costante come pure i determinanti antigenici (Scagliarini *et al.* 2002).

Diversi siti antigenici riconosciuti dai linfociti T sono stati identificati utilizzando l'algoritmo AMPHI (Margalit *et al.* 1987) e due motivi di legame per il complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC) sono stati rilevati dall'algoritmo di SETTE (Sette *et al.* 1989) a livello dei residui 243-248 e 262-267. Questi dati indicano che il peptide immunodominante di 39 kDa oltre ad indurre una risposta anticorpale mediata dai linfociti B è un probabile target anche per i linfociti T. Questi dati

rivestono notevole importanza poiché la risposta immunitaria mediata dai linfociti T citotossici, che riconoscono gli antigeni virali associati agli MHC-I, è ritenuta responsabile della guarigione dall'infezione da orf virus e della protezione nei confronti di una successiva infezione (Mercer *et al.* 1997).

Un recente studio di Spohner e collaboratori (2004) ha indagato il ruolo della proteina di 10 KDa mediante la costruzione di un mutante virale delecto dell'ORF (open reading frame) 104 codificante per il peptide di fusione ortologo del gene A27L del VACV. Il mutante ha mostrato una crescita più lenta in coltura cellulare e un differente effetto citopatico con la produzione di particelle infettanti, ma con morfologia aberrante. Le immagini al microscopio elettronico mostrano virioni con tubuli superficiali disorganizzati e corti più simili a quelli osservati nel VACV. Inoltre questi tubuli o loop superficiali risultano come "appesi" alla particella virale, non l'avvolgono. Sembra quindi che questa proteina sia essenziale per la formazione dei tubuli superficiali, il corretto assemblaggio dei virioni e il rilascio delle particelle infettanti (fig.1).



**Figura 1.** A sinistra: foto al ME, colorazione in contrasto negativo dell'OV delecto della proteina di 10KDa. A destra: foto in crio-elettromicroscopia dell'OV delecto della stessa proteina, (Spohner *et al.* 2004)

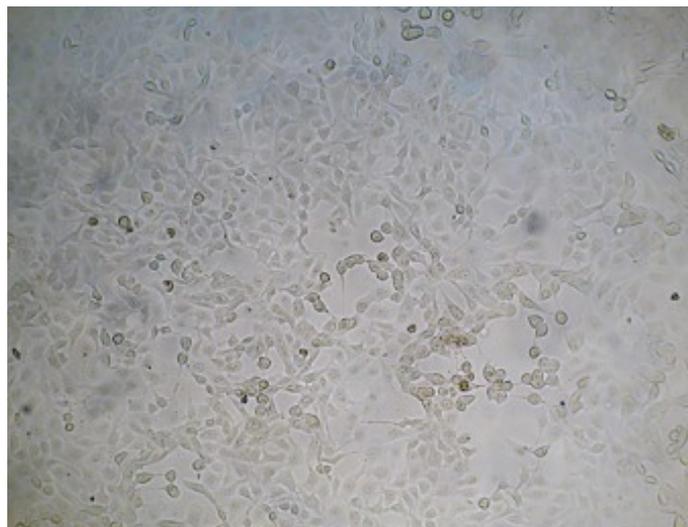
L'analisi del genoma virale dei PPV ha mostrato diverse altre proteine omologhe alle proteine strutturali del VACV. Il virus orf e il BPSV hanno proteine omologhe sia

alle proteine degli IMV che a quelle degli EEV del VACV; la scoperta di queste omologie, insieme alla morfologia del virus, fanno ipotizzare che la struttura e la morfogenesi dei PPV sia simile a quella del VACV.

## 1.5 Proprietà biologiche

I Parapoxvirus replicano facilmente in coltura cellulare dando un caratteristico effetto citopatico con degenerazione palloniforme delle cellule che si staccano dal monostrato lasciando aree di discontinuità nel tappeto cellulare fino alla sua completa distruzione (figura 1).

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 1:** effetto citopatico dovuto all'infezione da orf virus su coltura in monostrato di cheratinociti ovini.

Il tempo di latenza che intercorre tra l'infezione e la comparsa dei primi segni di effetto citopatico varia da 12 a 48 ore e può raggiungere il 100% in un tempo

variabile dalle 25 ore ai 24 giorni in dipendenza dalla dose di virus inoculata, dal ceppo virale, dal tipo di cellule utilizzate e dal numero di passaggi cellulari (Robinson e Ballasau, 1981).

Ottimi risultati sono stati ottenuti con colture organotipiche di cheratinociti di ovino ottenuti da prelievi biotici di prepuzio di agnelli. Le cellule cutanee così ottenute nutrite con Raft medium addizionato con EGF (fattore di crescita endoteliale), vengono stimulate a differenziarsi in cheratinociti. Utilizzando la tecnica “air-liquid interface”, in presenza di un equivalente dermico (uno strato di collagene di tipo I), i cheratinociti tendono a riprodurre una struttura epidermica, con la presenza di uno strato corneo in superficie. Su questo substrato cellulare il virus orf e il PCPV replicano efficacemente determinando effetto citopatico in 48 ore. I raft cutanei infettati fissati e colorati con ematossilina-eosina, si presentano istologicamente identici ai campioni biotici prelevati da animali infetti (Scagliarini *et al.* 2005).

Le più comuni specie di animali da laboratorio si sono dimostrate refrattarie all'infezione da Orf virus, solo il coniglio si è dimostrato debolmente recettivo, sviluppando lesioni che però risultano differenti da quelle che si osservano negli ovi-caprini (Leavel *et al.* 1968).

## 1.6 Resistenza agli agenti chimico-fisici

Il virus orf, all'interno di materiale crostoso è in grado di mantenersi infettante per alcuni anni tra 0°C e 20°C. Possiede un'elevata capacità di resistenza nei ricoveri e nei pascoli che varia a seconda delle 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).

In laboratorio il virus può essere mantenuto per diversi anni a -70°C e può essere inattivato tramite trattamento termico per 90 minuti a 55°C o 30 minuti a 60°C.

Nonostante la presenza dell'envelope, i Poxvirus mostrano un certo grado di resistenza nei confronti di etere e cloroformio mentre vengono inattivati da diversi disinfettanti come ad esempio perossido d'idrogeno al 10%, acido cloridrico 0.001%, creolina al 5%, permanganato di potassio 1%.

Prove effettuate dal nostro gruppo di ricerca (Gallina *et al.* 2007) hanno dimostrato che il Biocidal® ZF (WAK-CHEMIE MEDICAL GMBH, Germania), un disinfettante comunemente utilizzato per la decontaminazione nei laboratori di ricerca, può inattivare completamente il virus orf che, in seguito al trattamento non è più in grado di replicare in coltura cellulare. Anche l'ipoclorito di sodio (7500 ppm) si è dimostrato in grado di inattivare il virus orf. Questo disinfettante induce infatti uno shock iperosmotico sul virus che porta alla rottura dell'envelope e della membrana esterna non consentendo la penetrazione nelle cellule ospiti. L'ipoclorito si dimostra quindi un disinfettante adatto al trattamento delle superfici in allevamento mentre può risultare efficace, ma corrosivo per il trattamento della strumentazione di laboratorio.

## 1.7 Ciclo replicativo

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 1).

L'mRNA che codifica per quest'enzima è infatti trascritto a partire dal core prima del processo di uncoating (svestimento). L'RNA polimerasi permette quindi la produzione di enzimi virali che, associati a quelli cellulari, permettono la liberazione del DNA all'interno delle cosiddette "fabbriche virali" o corpuscoli del Guarnieri, sottoforma di corpi inclusi basofili osservabili nel citoplasma delle cellule infette. 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).

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

Nonostante molti poxvirus mostrino una stretta specie specificità in termini di host range, in coltura cellulare queste specificità possono variare enormemente tanto che cellule isolate da ospiti vertebrati non permissivi possono risultare suscettibili a un'infezione in vitro. Per molti altri virus il tropismo in coltura cellulare è determinato principalmente dalla presenza di specifici recettori necessari per il legame e la penetrazione del virus mentre per i poxvirus non è ancora stato descritto in modo esauriente l'insieme di proteine di fusione di membrana e di recettori cellulari a cui questi virus aderiscono durante la fase di adsorbimento e penetrazione

cellulare (McFadden 2005). Sebbene ci sia una certa correlazione fra il livello di espressione di recettori sulla superficie cellulare e la permissività all'infezione dei poxvirus, diversi lavori hanno mostrato che i poxvirus aderiscono e penetrano sia in cellule permissive e non, ma successivi eventi intracellulari impediscono la replicazione virale in maniera specifica nelle cellule non permissive. I poxvirus quindi possono legarsi e penetrare in molte cellule di mammifero, ma la capacità di completare il ciclo replicativo necessario a generare progenie virale e di diffondersi con successo in un nuovo ospite varia marcatamente fra cellule appartenenti a differenti lineage o originate da specie differenti (Mcfadden 2005). Le conoscenze attuali portano a concludere che i determinanti principali del tropismo cellulare dei poxvirus siano i meccanismi intracellulari che si instaurano in seguito alla penetrazione del virus come i fattori cellulari trans-attivanti della trascrizione e la capacità di inibire i vari meccanismi antivirali messi in atto dalle cellule come l'apoptosi e la produzione d'interferone.

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. Fino ad ora sono state individuate diverse proteine implicate nel legame con i recettori cellulari, ma i determinanti di legame cellulari, sono i glicosamminoglicani che sono espressi in maniera ubiquitaria o componenti della matrice extracellulare responsabili principalmente di legami aspecifici. Tra i recettori cellulari coinvolti nel processo di adsorbimento c'è l'eparansolfato, un glicosaminoglicano presente su tutte le cellule dei mammiferi (Spillmann, 2001). A questo recettore si lega la proteina F1L costituente principale dell'envelope dell' dell'OV omologa alla proteina H3L del Vaccinia virus (Scagliarini *et al.* 2002). Per quanto riguarda il VACV è stato dimostrato che le proteine A27L, D8L e H3L degli IMV si legano ai glicosaminoglicani e che un anticorpo monoclonale specifico per antigeni di superficie cellulare è in grado di bloccare il legame degli IMV alla superficie

cellulare (Chang *et al.* 1995). Per gli EEV nessuna specifica proteina virale si è dimostrata in grado di legare molecole cellulari, ma le proteine A34R e B5R potrebbero avere un ruolo poichè si è osservato un aumento del rilascio di EEV quando queste proteine sono state mutate e ridotta infettività degli EEV quando è stata deleta la proteina A34R (McIntosh and Smith 1996).

La penetrazione del virus all'interno della cellula può avvenire sia per endocitosi che tramite fusione dell'envelope con la membrana cellulare, grazie alla presenza di un peptide di fusione che agisce sia a pH neutro che acido (VACV A28). Anche questo meccanismo è ancora poco conosciuto, sono stati descritti diversi meccanismi di penetrazione, 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.

La trascrizione di mRNA precoci poliadenilati, che rappresentano il 15% del genoma virale, avviene ad opera della RNA polimerasi virale quando l'acido nucleico è ancora all'interno del core: in questo modo vengono prodotti degli enzimi che favoriscono il definitivo svestimento dell'acido nucleico e ne iniziano la replicazione. Durante le prime fasi dell'infezione, il DNA subisce una parziale denaturazione e, per intervento di una nucleasi, le estremità si separano. 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 e per fattori di trascrizione precoci e sono espressi dopo la replicazione del DNA virale. Nella fase precoce, oltre alle proteine a funzione enzimatica, vengono sintetizzati anche fattori in grado di proteggere i

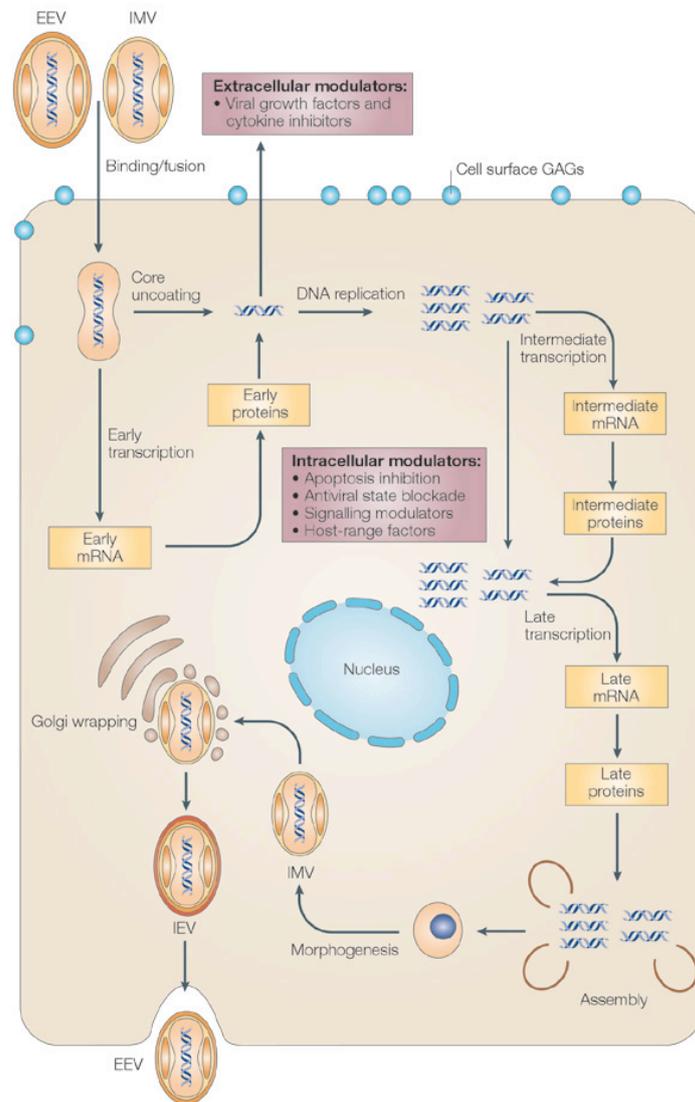
virioni da molecole effettrici antivirali sintetizzate dall'organismo ospite in risposta all'infezione virale. Le tre classi di geni hanno promotori con distinti elementi di sequenza che vengono riconosciuti dalla DNA polimerasi virale producendo una cascata di espressione genica. I promotori precoci dei Poxvirus hanno una sequenza consenso 5'AAAAAAGTGAAAAAAT/A 3'(Davidson and Moss 1989). I trascritti dei geni precoci terminano 20-50 nucleotidi a valle della specifica sequenza di terminazione 5'TTTTTNT 3' (Yuen and Moss, 1987). 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.

I geni intermedi codificano principalmente per transattivatori dell'espressione dei geni tardivi. I pochi promotori dei geni intermedi conosciuti sembrano essere ricchi in A+T e assomigliano ai promotori precoci eccetto che per la sequenza di inizio trascrizione, TAAA (Baldick *et al.* 1992).

Generalmente i promotori dei geni tardivi sono costituiti da sequenze ricche in A+T che precedono il motivo di inizio trascrizione TAAAT. Il codone d'inizio fa sempre parte di questa sequenza (TAAATG). La trascrizione viene promossa da sequenze ricche in residui T a monte del gene. I trascritti dei geni tardivi non hanno terminatori specifici, il risultato è una grande quantità di trascritti nelle fasi tardive dell'infezione. Un'insolita caratteristica di questi mRNA tardivi è che contengono un tratto di poli-A di 35 bp immediatamente a valle della struttura cap 5' e prima dell'open reading frame. La funzione esatta di queste poli-A non è conosciuta. Le proteine virali tardive includono i principali componenti strutturali del virione, i fattori di trascrizione dei geni precoci e altri enzimi virali (Davidson and Moss, 1989).

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. Il VACV replica più velocemente dell'OV, infatti la replicazione del DNA avviene già 1 ora dopo l'infezione e il passaggio della trascrizione dai geni precoci a quelli tardivi avviene dopo 3-4 ore PI (Baldick and Moss, 1993).



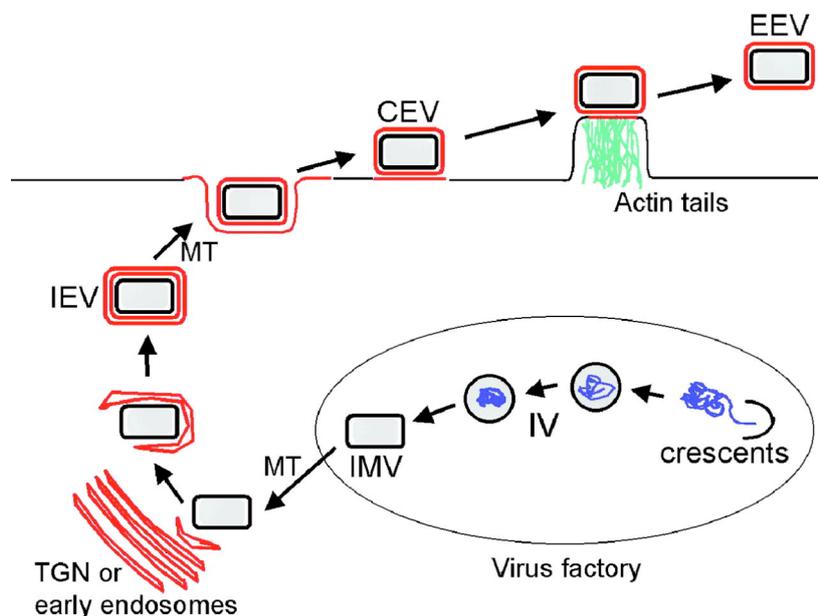
Nature Reviews | Microbiology

**Figura 1.** Tutti i Poxvirus replicano nel citoplasma delle cellule infette mediante un complesso ma largamente conservato ciclo replicativo (illustrazione tratta da McFadden 2005).

L'assemblaggio dei virioni comincia già dopo 2-3 ore dall'infezione in zone del citoplasma dette "fabbriche virali" sedi della sintesi di DNA virale (Figura 2). Nel comparto cellulare intermedio, compreso fra il reticolo endoplasmatico e il *trans*-Golgi network, il materiale nucleoproteico si organizza gradualmente in strutture

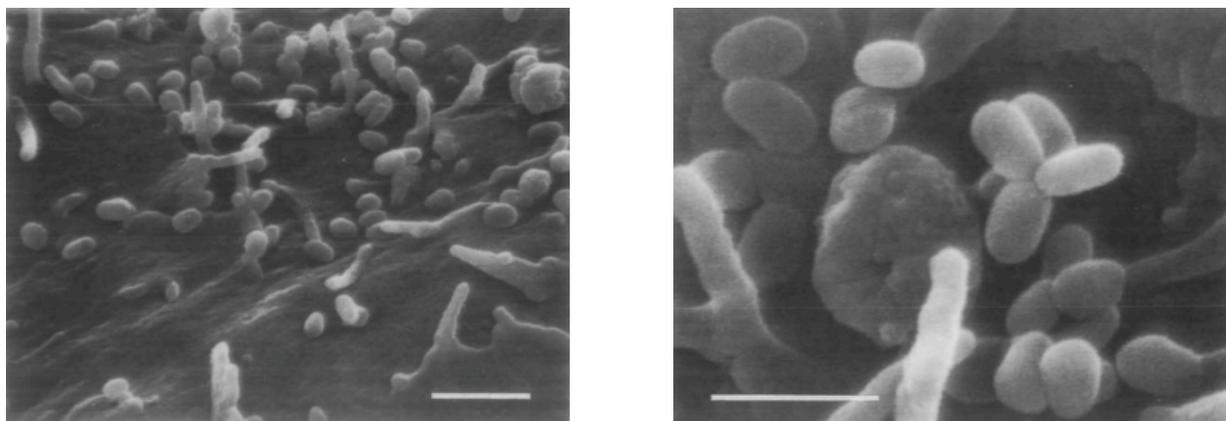
fibrillari e viene circondato da formazioni semilunari che vanno a costituire la membrana del core. In seguito, compaiono i cosiddetti corpi laterali responsabili della forma biconcava del core. Queste formazioni semilunari, costituite da lipidi e proteine codificate dai virioni, crescono fino a formare virioni immaturi (IV), particelle non infettanti costituite da due membrane formatesi dal *trans*-Golgi network.

In seguito a clivaggio delle proteine capsidiche e condensazione del core virale si formano gli IMV. Queste particelle rappresentano la maggiorparte della progenie infettante, rimangono principalmente all'interno delle cellule fino alla lisi oppure possono fuoriuscire per budding attraverso la membrana plasmatica durante gli stadi avanzati dell'infezione. Sono virioni resistenti in grado di trasmettere efficientemente l'infezione fra gli ospiti. Dopo la loro formazione, gli IMV possono spostarsi dalle fabbriche virali, mediante i microtubuli e l'azione della proteina A27L, 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 importanti per la diffusione del virus a più ampio raggio in coltura cellulare e *in vivo*. La produzione di diverse particelle virali durante il ciclo replicativo del VACV rappresenta una strategia per la diffusione del virus e l'evasione dal sistema immunitario dell'ospite.



**Figura 2.** Morfogenesi del VACV (illustrazione tratta da Smith *et al.* 2002)

Diversamente da quanto osservato per il VACV, che utilizza almeno due meccanismi di fuoriuscita dalle cellule, esocitosi e budding, sembra che l'OV fuoriesca dalla cellula prevalentemente per esocitosi (Hiramatsu *et al.* 1999). La differenza nel meccanismo di rilascio virale fra i membri della famiglia Poxviridae sembra dipendere dalle caratteristiche genetiche di ogni poxvirus, questo meccanismo infatti è responsabile anche della differente modalità di acquisizione dell'envelope virale (figura 3).



**Figura 3.** Hiramatsu e collaboratori non hanno rilevato budding virale osservando al microscopio elettronico a scansione cellule infette con OV (foto tratte da Hiramatsu *et al.* 1999).



## **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 Machedo, 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 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). L'orf virus è in grado di infettare diverse specie di ruminanti, Guo e collaboratori hanno riportato un focolaio di dermatite proliferativa nel Minnesota Zoological Garden che ha colpito buoi muschiati (*Ovibos moshatatus*), Sichuan takin (*Budorcas taxicolor tibetana*) e una pecora Shetland (*Ovis aries*) (Guo

*et al* 2004). Negli ultimi anni, sono aumentate le segnalazioni di infezioni da parapoxvirus nel cammello e nella foca, questo fa pensare ad una più ampia distribuzione dei PPV in natura .

L'infezione da PPV dei cammelli è conosciuta anche come malattia di Auzdyk ed è stata descritta per la prima volta nell'Unione Sovietica nel 1972 (Rosliakov 1972). La malattia è stata fino ad ora riportata in Mongolia, in Somalia, in Kenya e in Libia. In un focolaio del Kenya la malattia è stata segnalata solo nelle femmine di *Camelus dromedarius* (Gitao 1994). L'alta letalità nelle femmine di dromedari rappresenta un grave problema per gli allevatori di questi animali. Ci sono evidenze che il parapoxvirus del cammello sia causato dal virus orf. Sono stati riportati casi di orf degli ovini che hanno colpito i cammelli (Hartung 1980) e più recentemente, analisi sierologiche condotte in Libia su cammelli infetti suggeriscono che queste infezioni siano dovute all'OV (Azwai *et al.* 1995). Recentemente, la caratterizzazione genomica effettuata su un isolato virale provenienti da un caso di malattia di di Auzdyk nei cammelli in Arabia Saudita, ha dimostrato, che la causa dell'infezione era il PCPV e non OV (Abubakr *et al.* 2007).

Anche la renna (*Rangifer tarandus tarandus*) è recettiva all'infezione da PPV, gravi focolai d'infezione sono stati riportati nel 1992-1994 tra le renne Finlandesi (Buttner *et al.* 1995) e nel 1999-2000 tra le renne norvegesi allevate allo stato semibrado (Klein e Tryland, 2005). Ceppi virali isolati dal focolaio in Norvegia sono stati caratterizzati mediante analisi dei pattern di restrizione e parziale sequenziamento del DNA dimostrando che la causa delle infezioni era OV. E' quindi stato ipotizzato che il virus sia stato trasferito dalle pecore alle renne attraverso personale , attrezzature e cibo utilizzato per entrambe le specie animali. L'analisi genomica effettuata sui virus isolati dai focolai finlandesi hanno invece dimostrato come un focolaio sia stato causato da OV e l'altro da PCPV (Tikkanen *et al.* 2004).

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).

Sono in aumento le segnalazioni d'infezioni parapox-like dei pinnipedi, il primo report risale al 1969 e descrive l'infezione in un leone marino californiano (*Zaophus californianus*) (Wilson *et al.* 1969). Fino ad ora, infezioni attribuite a PPV, sono state riportate in Sud America (*Otarya bryonia*), nel mare del nord della Germania (*Phoca vitulina*), nelle foche da pelliccia del Nord (*Callorhinus ursinus*), nelle foche grigie delle coste della Cornovaglia (*Halichoerus grypsus*) e nelle foche dell'Antartico (*Leptonychotes weddell*). I primi studi si basavano sulle lesioni istopatologiche e sulla microscopia elettronica delle particelle virali. I lavori più recenti includono invece, l'ibridazione in situ con sonde di DNA di PPV e il sequenziamento dei prodotti di PCR. Attualmente sembra che i virus che infettano i pinnipedi costituiscano una nuova specie all'interno del genere PPV, ma i dati che sono tuttora a disposizione non sono sufficienti per classificarli definitivamente (Becher *et al.* 2002; Nollens *et al.* 2006).

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 mussulmano 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).



### **3. PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA**

#### **3.1 Infezione negli animali**

I PPV presentano uno spiccato epiteliotropismo, penetrano nella cute e nelle mucose tramite soluzioni di continuo per poi replicare nei cheratinociti danneggiati e neo formati 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 1) rendendone 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).



**Figura1.** Lesioni da BPSV a sinistra e da PCPV a destra.

Le lesioni da OV, negli agnelli si localizzano a livello labiale ed orale (fig. 2).



**Figura 2.** Lesioni labiali

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 3).



**Figura 3.** 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 4).



**Figura 4.** 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. 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).

Nella specie caprina sono frequenti le segnalazioni di infezioni “maligne” da OV inoltre, sono stati riportati casi di focolai d'infezione in greggi misti di ovini e caprini, nei quali solo le capre venivano colpite dall'infezione facendo ipotizzare che i ceppi virali responsabili delle infezioni nelle capre possano essere diversi da quelli in grado di infettare gli ovini (de la Concha-Bermejillo *et al.* 2003; Guo *et al.* 2003). Si è ipotizzato che fattori predisponenti individuali o genetici possano contribuire alla persistenza e alla progressione delle infezioni ad esempio capre di razza boera e ovini di razza frisona sembrano più predisposti a sviluppare infezioni maligne (Moriello and Cooley 2001; de la Concha *et al.* 2003).

Nel cervo rosso (*Cervus elaphus*) le lesioni possono formarsi sul musello ma anche estendersi multifocalmente a tutto il corpo (Horner *et al.* 1987).

Nelle renne (*R. tarandus tarandus*) si sono osservate erosioni, papule, pustole e ulcere nella bocca (Buttner *et al.* 1995; Tikkanen *et al.* 2004).



**Figura 5.** Erosioni a livello buccale nella renna.

Nella *Phoca vitulina* sono state riportate lesioni sulla pelle e a livello di mucosa della cavità orale (Becher *et al.* 2002) e nell'infezione della foca grigia (*H. grypus*) si sono osservate pustole cutanea che sono progredite fino a coinvolgere estese regioni della cute.

### 3.2 Infezione nell'uomo

BPSV, PCPV e OV possono causare infezione nell'uomo. Anche i PPV dei pinnipedi sono agenti zoonotici, come dimostrato da almeno due casi d'infezione in addetti alla cura dei leoni marini e foche (Clark *et al.* 2005).

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 6).



**Figura 6.** Lesioni da ectima contagioso nell'uomo

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.

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 (Leavel *et al.* 1968):

1. stadio di macula e papula (1°-7° giorno PI) caratterizzato dalla vacuolizzazione delle cellule dello strato superficiale dell'epidermide, macroscopicamente la lesione è una macula eritematosa rilevata.
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'inflammatione.
3. Stadio acuto (14°-21° giorno PI): la lesione è costituita da un nodulo con lesione ulcerata e con fenomeni di trasudazione; istologicamente 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 sua completa guarigione è possibile che si formino in successione due o tre croste.

La malattia, nelle forme tipiche, ha 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

(Rogers *et al.* 1989; Gurel *et al.* 2002). Lesioni particolarmente gravi si osservano in pazienti colpiti da leucemia (Hunnskaar 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.

## **4. CONTROLLO DELL'INFEZIONE**

### **4.1 Profilassi diretta**

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 (creolina al 5% o permanganato di potassio 1%), mentre il rischio di pascoli contaminati per gli animali allevati in maniera estensiva è sempre molto alto ed il risanamento 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).

Per quanto riguarda l'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).

## 4.2 Profilassi indiretta

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. Infatti, 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.

È noto che in seguito ad infezione da OV si sviluppi una vigorosa risposta immunitaria ed infiammatoria; la risposta cellulo-mediata ha un ruolo predominante nel conferire l'immunità nei confronti del virus mentre non è ancora chiaro il ruolo della risposta umorale. Nonostante la presenza di elevati titoli anticorpali in sieri di animali infetti, il trasferimento passivo dell'immunità mediante colostro non conferisce protezione nei confronti di un'infezione challenge (Buddle and Pulford 1984; Mercer *et al.* 1994). L'immunità nei confronti dell'OV è di breve durata e sia gli animali che l'uomo possono essere soggetti a re-infezione sebbene le lesioni siano di minore gravità e vado incontro a risoluzione più rapidamente (Haig and Mercer 1998). Per sopravvivere e replicare all'interno dell'ospite, i Poxvirus hanno sviluppato particolari meccanismi di evasione del sistema immunitario mediante

l'espressione di geni per la virulenza che interferiscono con le molecole effettrici della risposta infiammatoria e immunitaria come gli interferoni, il complemento e le citochine. Il virus orf codifica per immuno-modulatori della risposta infiammatoria, dell'immunità innata e di quella acquisita. I geni dei fattori di virulenza immuno-modulatori sono localizzati nella porzione terminale del genoma (Fleming *et al.* 1997; Seet *et al.* 2003; Deane *et al.* 2000; McInnes *et al.* 1998).

L'approfondimento delle conoscenze sull'organizzazione del genoma virale sono fondamentali per la selezione di componenti virali in grado di assicurare un'immunità duratura; in particolare l'identificazione dei geni per la virulenza può favorire lo sviluppo di mutanti deleti attenuati ma ancora fortemente immunogeni (Haig e Mercer, 1998).

Le nuove strategie vaccinali hanno quindi 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).

L'identificazione di antigeni virali ad azione immunostimolante, quali alcuni componenti dell'envelope, forniscono importanti spunti per la messa a punto di vaccini a subunità (Buttner e Rziha, 2002) poiché alti livelli anticorpali potrebbero essere in grado di raggiungere il sito d'infezione abbastanza rapidamente per minimizzare la replicazione virale (Haig e Mercer, 1998). L'immunogenicità della proteina F1L dell'Orf virus è stata valutata per un suo possibile utilizzo come subunità vaccinale: i risultati hanno mostrato una riduzione della durata e della gravità dell'infezione (Gallina *et al.* 2004).

Infine, un approccio alternativo è stato quello di clonare il genoma del virus Orf nel vettore Vaccinia virus e di immunizzare gli agnelli con l'intero panel genico (Mercer *et al.* 1997a e b). L'ottenimento di un certo grado di protezione nei confronti del challenge con virus virulento ha suggerito l'utilizzo del Vaccinia virus come vettore

vaccinale in grado di esprimere specifiche porzioni genomiche del virus Orf codificanti per antigeni proteggenti.

### **4.3 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 linfadenopatia ciò può portare a confondere la malattia con altre infezioni come la sporotricosi, il micobatterio marino e la leishmaniosi.

Una diagnosi certa può essere raggiunta mediante gli esami di laboratorio volti a dimostrare la presenza del virus. Non si è ancora sviluppato un test diagnostico standard utilizzabile in tutto il mondo in particolare, dei test diagnostici sviluppati nessuno è in grado di distinguere fra le infezioni dovute al virus vaccinale o a quello wild type. Un test diagnostico standard sarebbe importante anche per stabilire la prevalenza delle infezioni da OV e da altri PPV nei vari paesi consentendo anche una

valutazione delle perdite economiche subite dagli allevamenti in seguito a focolai di ectima contagioso.

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. Inoltre il tipico effetto citopatico può non essere evidente nei primi passaggi in coltura e richiedere diversi passaggi "ciechi".

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).

#### 4.4 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 ovicapri. In India e in diversi Paesi Africani sono stati utilizzati l'olio di sesamo e di castagna, il succo di *Acra* (*Calotropis procera*) e quello di *Euphorbia spp* (Geerlings 2001) mentre l' *Ilex aquifolium* è stato utilizzato per curare e prevenire l'ectima nei Paesi Bassi e in Francia (Brisebarre, 1996; Van Asseldonk and Beijer, 2006).

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 primariamente le lesioni da orf sono stati provati molti trattamenti come l'applicazione, dopo la rimozione delle croste, di 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) . in alcuni casi si è reso necessario l'uso della crioterapia (Degraeve *et al.* 1999). Per quanto riguarda le forme proliferative in letteratura sono riportati esempi di recidive in seguito ad un primo trattamento con la crioterapia o con l'INF $\alpha$  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).

Il (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonmethoxy)propyl]-2,6-diaminopurine (HPMPC, cidofovir, CDV, Vistide<sup>®</sup>), è una molecola di sintesi che ha una potente e selettiva attività nei confronti di molti virus a DNA e dei Poxvirus (De Clerq 2003).

La sensibilità dell'OV e del PCPV al cidofovir è stata dimostrata *in vitro* (Nettleton *et al.* nel 2001) ed *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 ditone 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<sup>®</sup>) di un uomo con un linfoma non-Hodgkins che aveva sviluppato una lesione da orf virus non rispondente alla rimozione chirurgica e alla terapia con cidofovir (Lederman *et al.* 2007). L'utilizzo di questo trattamento topico potrebbe evitare ai pazienti l'intervento chirurgico che spesso si è rivelato di poca utilità (Ara *et al.* 2008)

**PARTE SPERIMENTALE *A*:**  
**Delezione del gene F1L**



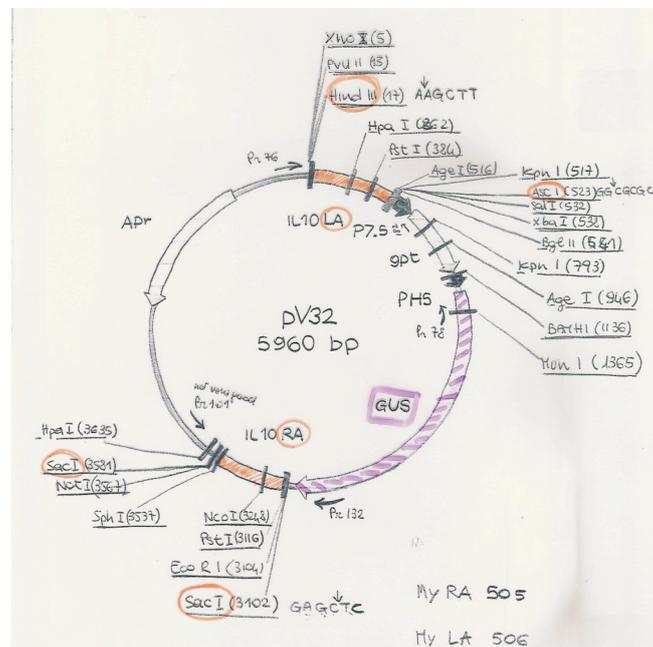
La costruzione dell'orf virus delecto del gene 59L ha lo scopo di fornire ulteriori informazioni riguardanti il ruolo della proteina immunodominante di 39KD nella morfogenesi e nella struttura dei virioni dei parapoxvirus.

I principi generali per la costruzione di virus ricombinanti stabiliti per il più conosciuto ed approfonditamente studiato VACV i sono dimostrati applicabili anche per OV. I Poxvirus possiedono un genoma molto grande la cui manipolazione risulta piuttosto difficile per questo motivo si sono sviluppati vettori plasmidici utilizzabili per l'inserzione o la delezione di geni eterologhi nel genoma virale mediante ricombinazione omologa. Questa metodica prevede che il vettore plasmidico, veicolante il gene d'interesse, venga transfettato in cellule precedentemente infettate con il virus wild type e sfrutta la ricombinazione omologa che può frequentemente avvenire durante la replicazione dei virus appartenenti alla famiglia Poxviridae. La ricombinazione omologa riguarda scambi di materiale genetico fra due molecole di DNA, o segmenti della stessa molecola, che possiedono un'ampia regione di sequenze omologhe. I metodi utilizzati per la costruzione di orf virus ricombinanti differiscono da quelli utilizzati per il vaccinia virus, dato il limitato host range del virus orf si impone infatti l'utilizzo di colture cellulari primarie di origine ovina o bovina, inoltre variano i metodi di selezione dei ricombinanti e i siti d'inserzione a livello genomico.

Per la costruzione del virus orf delecto del gene 59L è stato utilizzato il vettore plasmidico pV32 messo a punto nella Virus research unit (Otago University, New Zealand) (figura 1). Il plasmide di 5960 bp contiene il gene per la resistenza all'ampicillina e il gene codificante l'enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS) di *E.coli* già ampiamente utilizzato come reporter gene e metodo di selezione positiva in diversi sistemi (Howley et al., 1996; Jefferson et al., 1986). Il gene si trova sotto il controllo del promotore 7.5 del VACV ed in seguito alla produzione dell'enzima funzionante durante la replicazione virale, produce un precipitato di colore blu in presenza del substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucronide (X-Gluc). Le due "braccia" IL-10LA (left arm) e IL-10RA (right arm) presenti sul plasmide, fiancheggianti il gene  $\beta$ -

glucuronidase, sono state sostituite con sequenze geniche presenti a monte e a valle del gene 59L nel genoma virale del virus orf. Le due “braccia” rappresentano le sequenze geniche attraverso le quali può avvenire la ricombinazione omologa permettendo l’appaiamento con il DNA virale e quindi lo scambio di materiale genetico che, in questo caso, porta alla delezione del gene 59L e all’inserimento del gene Gus nel genoma virale.

Le braccia sono state disegnate in modo da eliminare quasi totalmente il gene della proteina F1L, nel genoma virale rimangono infatti, 12 nucleotidi contenenti il codone d’inizio trascrizione e 91 nucleotidi della porzione 3’terminale. Il nuovo plasmide così ottenuto è stato denominato pVU11.



**Figura 1.** Plasmide pV32 dal quale si è partiti per la costruzione del plasmide per la delezione del gene F1L

## MATERIALI E METODI

### 1. Costruzione del vettore plasmidico.

#### 1.1. Virus.

La delezione è stata eseguita sul ceppo di riferimento NZ2 il cui genoma è stato interamente sequenziato e brevettato (GenBank accession number DQ184476). Su tale ceppo sono stati condotti la maggior parte degli studi pubblicati sul virus orf.

## 1.2 Disegno dei primers delle braccia, amplificazione e taglio con enzimi di restrizione.

I primers sono stati disegnati in modo da ottenere braccia di circa 500 bp e contenenti i siti di restrizione necessari per il conseguente inserimento nel plasmide. Il braccio sinistro ossia la sequenza presente a monte del gene 59L (F1L LA) è stato inserito mediante gli enzimi HindIII e AscI mentre il braccio destro (F1L RA) è stato inserito mediante taglio enzimatico con SacI (tabella 1).

<b>Braccio sinistro</b>			
Primers	sequenza	annealing	Prodotto PCR
senso LAF	5'tc <u>gaagctt</u> tcggcaagtacgcgcgcatc3'	56°C	518 bp
antisenso LAR	5'tgggcgcgc <u>ccctt</u> catcctggcgtacctgc3'		
<b>Braccio destro</b>			
senso RAF	5'cgtgagctcgggtggatccatttagttat3'	56°C	513 bp
antisenso RAR	5'ccc <u>gagctc</u> acgcccgcgagagccccgac3'		

**Tabella 1.** I siti di restrizione presenti sui primer sono sottolineati.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con termociclatore Omnigene (Hybaid, Germany) ed erano costituite da circa 100 ng di DNA, 0.2 mM dNTP, 20 pmoli di ogni primer, 2 µl di DMSO, 6µl MgCl<sub>2</sub>, 5µl di Pwo buffer e 1 unità di Pwo Taq polimerase (Boehringer Mannheim) aggiunta solo dopo 5 minuti di denaturazione del DNA a 99°C.

Le miscele di amplificazione sono state sottoposte a una prima fase di denaturazione a 99 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una prima fase di denaturazione a 99°C per 20 secondi, una seconda fase di annealing a 56°C per 1 minuto e a una fase di allungamento a 76°C per 1 minuto. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di annealing a 56°C per 1 minuto e ad un'estesione finale di 5 minuti a 76°C

### **1.3 Purificazione del DNA su gel di agarosio**

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% colorato con bromuro d'etidio e le bande d'interesse tagliate direttamente dal gel. La purificazione è stata eseguita con QIAquick gel extraction kit (Qiagen) .

### **1.4 Taglio mediante enzimi di restrizione**

Il plasmide (2 $\mu$ g) e i prodotti di PCR sono stati sottoposti a taglio mediante enzimi di restrizione a 37°C per 2 ore utilizzando il buffer appropriato e 2 unità di enzima per  $\mu$ g di DNA.

Per verificare che la digestione da parte dell'enzima di restrizione fosse avvenuto completamente, il DNA plasmidico è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio 0,8% e visualizzato mediante colorazione con bromuro d'etidio.

### **1.5 Defosforilazione mediante SAP**

Per l'inserimento del braccio destro è stato utilizzato il solo enzima Sac I e, per impedire che il plasmide si richiudesse per la presenza delle "sticky ends" create dal taglio con l'enzima di restrizione, è stato sottoposto all'azione dell'enzima SAP (Shrimp alkaline phosphatase, Roche). La fosfatasi alcalina catalizza infatti la defosforilazione in 5' del DNA, la reazione di ligasi può avvenire quindi solo in presenza dell'inserito di DNA contenente un gruppo fosfato in 5'. La reazione prevede un'incubazione a 37°C per 15 minuti e la successiva inattivazione dell'enzima SAP a 65°C per 10 minuti.

### **1.6 Precipitazione con etanolo**

I Prodotti di PCR e il DNA plasmidico sono stati sottoposti a precipitazione con etanolo dopo ogni taglio con enzima di restrizione per eliminare enzimi e buffer prima della reazione di ligasi.

Ad ogni campione è stato aggiunto il doppio del volume di etanolo assoluto e 1,1 volumi di sodio acetato 2.5 M. La soluzione è stata lasciata a -20°C per 20 minuti e poi centrifugata a massima velocità per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e il pellet di DNA lavato con etanolo al 70%. Dopo centrifugazione a massima velocità per 5 minuti il surnatante è stato rimosso e il pellet lasciato ad asciugare all'aria, è stato poi risospeso in TE buffer (tris 10mM, EDTA 1mM).

### 1.7 Reazione con ligasi

Il braccio destro e quello sinistro sono stati inseriti nel plasmide mediante reazione enzimatica con T4 DNA ligasi (Roche) che catalizza il legame fosfodiesterico fra un terminale fosfato 5' e un idrossile 3' in molecole di DNA ed RNA a doppio filamento. Per la reazione sono stati utilizzati DNA plasmidico ed inserto in un rapporto di concentrazione di 1 a 3, sono state inoltre allestite reazioni di controllo come mostrato nella tabella 2.

La reazione è avvenuta a 15°C per 18 ore.

	<b>L</b>	<b>NL</b>	<b>SL</b>	<b>NL ND</b>	<b>SL ND</b>
<b>Vettore ND</b>	-	-	-	1µl	1µl
<b>Vettore</b>	1µl	1µl	1µl	-	-
<b>Inserto (dx/sx)</b>	8µl	-	-	-	-
<b>Ligasi</b>	1µl	-	1µl	-	1µl
<b>Buffer 10X</b>	2µl	2	2µl	2µl	2µl
<b>acqua</b>	8µl	17	16µl	17µl	16µl
<b>Volume finale</b>	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl

**Tabella 2.** **L**= reazione di ligasi, **NL**= rappresenta il controllo negativo e la porzione di plasmide non tagliato (non ligation), **SL**= self ligation, **NLND**= controllo dell'attività dell'enzima SAP (non ligation, no dephosphorilation), **SLND**= controllo dell'attività dell'enzima SAP (self ligation, no dephosphorilation)

## **1.8 Trasformazione di cellule competenti**

Le reazioni di ligasi sono state diluite 1:5 in TE buffer freddo e poi utilizzate per la trasformazione delle cellule competenti DH5 $\alpha$ . 10 $\mu$ l di ogni reazione di ligasi sono stati aggiunti alle cellule batteriche precedentemente scongelate in ghiaccio. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio le cellule sono state sottoposte a shock termico a 37°C per 5 minuti e dopo l'aggiunta di 900  $\mu$ l di Luria Bertani liquido sono state incubate per 1 ora a 37°C. Infine le cellule sono state seminate in piastre di terreno 2YT agarizzato contenente ampicillina (20mg/ml).

I cloni, cresciuti nella piastra di trasformazione della reazione di ligasi dopo una notte di incubazione a 37°C, sono stati raccolti e seminati in terreno liquido (Luria Bertani e ampicillina). La verifica del corretto inserimento delle braccia è stata eseguita su ogni singolo clone mediante taglio con appropriati enzimi di restrizione dopo estrazione del DNA plasmidico dai brodi di coltura mediante "boiling prep method".

## **1.9 Boiling prep method**

1,5 ml di coltura batterica sono stati centrifugati a massima velocità per 30 secondi, il surnatante è stato rimosso e il pellet cellulare risospeso in 350  $\mu$ l di STET buffer e 25  $\mu$ l di lisozima. Le provette sono quindi state immerse immediatamente in acqua bollente per 40 secondi e poi centrifugate per 10 minuti a massima velocità. I debris cellulari sono stati rimossi con uno stecchino sterile e il DNA è stato fatto precipitare aggiungendo 40  $\mu$ l di sodio acetato 2.5 M e 420  $\mu$ l di isopropanolo freddo. Il pellet di DNA è stato raccolto in seguito a centrifugazione a massima velocità per 10 minuti ed è stato risospeso in TE buffer ed RNase.

## **2 Transfezione**

### **2.1 Substrati cellulari**

Per la coltivazione del virus orf sono state utilizzate colture primarie di cheratinociti di origine ovina e caprina (PLK e PKK isolati da tessuto prepuziale di agnelli e

capretti. Il prelievo di tessuto è stato eseguito mediante circoncisione e cellule di testicolo ovino (TOB) isolate da testicoli di agnelli.

Prima di essere processati i tessuti sono stati lavati in ipoclorito di sodio 3500 rpm successivamente si è proceduto alla triturazione meccanica con forbici sterili. I frammenti così ottenuti sono stati immersi in tripsina/EDTA 0,05% (Gibco) ed incubati a 37°C in oscillazione per 30 minuti. La reazione di digestione enzimatica è stata interrotta aggiungendo pari volume di terreno di coltura il tutto è stato poi centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti a +4°C. La reazione è stata quindi ripetuta con le stesse modalità.

Il pellet cellulare, ottenuto in seguito a centrifugazione, è stato lavato in PBS antibiotato, centrifugato nuovamente a 1500 rpm per 10 minuti a +4°C, risospeso in terreno di coltura e distribuito in fiasche per coltura cellulare.

I cheratinociti ovini sono stati coltivati in fiasche con collagene di tipo I (Collagen bed cell culture flask, Beckton Dickinson) in RAFT medium, un terreno di coltura costituito da 2/3 di D-MEM (Gibco), 1/3 di Ham's F12 (Gibco) arricchito con 10% di siero fetale bovino, 1% antibiotico-antimicotico (Gibco), 2mM di L-glutammina (Gibco), 1 mM di sodio piruvato (Gibco), 7,5% di sodio bicarbonato (Gibco), 2 ng/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',5'-triiodo-2-tironina e 0,1 nM di tossina colerica (Sigma).

Le cellule di testicolo fetale ovino sono state coltivate in D-MEM (Gibco), 10% siero fetale bovino, 2mM di L-glutammina (Gibco), 7,5% di sodio bicarbonato (Gibco) e 1% antibiotico-antimicotico (Gibco).

## **2.2 Transfezione.**

Una fiasca da 25cm<sup>2</sup> di PLK, confluenti all'80%, è stata infettata ad una moi (multiplicity of infection) di 1 con il ceppo virale NZ2. Il virus è stato lasciato adsorbire per 1 ora a 37°C in un volume di 0.5 ml e, per l'ora successiva, in 5 ml di terreno al 2% di siero fetale bovino. Nel frattempo in una provetta di polistirene sono

stati miscelati 10µl di lipofectine (invitrogen) a 500 µl di medium senza siero OptiMEM (Gibco) mentre 2 µg di plasmide sono stati uniti a 500 µl di OptiMEM in un' altra provetta. Il tutto è stato lasciato incubare per 30-45 minuti prima di unire il contenuto di entrambe le provette in un unico tubo. La miscela è stata quindi lasciata a temperatura ambiente per altri 15 minuti per permettere al DNA di legarsi al lipofectin. Eliminato l'inoculo virale, il tappeto cellulare è stato lavato con OptiMEM e la miscela di DNA/lipofectin è stata aggiunta e lasciata in incubazione per tutta la notte a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno è stato quindi aspirato e sostituito con DMEM al 2% di SFB.

Il terzo giorno post infezione (PI) sono stati aggiunti 37 µl di 5-bromo-4-chloro-3indolyl-β-D-glucuronic acid (X-Gluc) ad una concentrazione di 20 mg/ml (sigma) per controllare che la tranfezione fosse avvenuta. Le cellule sono state quindi staccate mediante scraper e raccolte nel terreno di coltura, il tutto è stato sottoposto a centrifugazione di 8-10 minuti a 1500 rpm. Il terreno è stato rimosso e conservato separatamente dal pellet cellulare che è stato invece risospeso in 0.5 ml di PBS. Il tutto è stato stoccato a -80°C.

### **3 Purificazione del virus ricombinante**

Per procedere alla purificazione del virus ricombinante sono state allestite colture di PLK, PKK e TOB in piastre da 6 pozzetti. Le preparazioni virali, costituite dal lisato cellulare raccolto dopo la transfezione, sono state scongelate e sonicate per 1 minuto per favorire la lisi cellulare e la dispersione del virus. Sono state quindi preparate diluizioni in base dieci del virus in PBS ed ogni pozzetto è stato infettato con 200 µl d'inoculo virale. Il virus è stato lasciato adsorbire per 1 ora a 37°C, successivamente l'inoculo virale è stato rimosso e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 2 ml di agarosio 2% (Lonza) miscelato 1:1 con DMEM+HAM'S F12, 4% SFB, 4% antibiotico-antimicotico. L'agarosio è stato lasciato solidificare a temperatura ambiente dopodichè le piastre sono state poste in incubazione a 37°C per 4-5 giorni capovolte. Per la colorazione delle cellule è stata preparata una miscela contenente: agarosio 2%

e PBS in rapporto 1:1, 15 µl di X-Gluc (20mg/ml) per pozzetto e in alcuni casi 0.015% Neutral Red (sigma). Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 1,5 ml di questa miscela, l'agarosio è stato fatto solidificare a temperatura ambiente e le piastre sono state poste nuovamente in incubazione a 37°C.

### **3.1 Controllo della delezione mediante PCR**

Il DNA virale è stato estratto a partire da 100 µl della miscela di transfezione mediante il kit NucleoSpin® Tissue (Machery-Nagel, Germany). La PCR è stata eseguita utilizzando come primer senso orfB2 (5'cac cat ggc cgt gac cag c3') e come antisenso GusR (5'-agt ccc gct agt gcc ttg tcc ag-3') per amplificare una porzione del gene per la β-glucuronidase inserito in seguito a transfezione e la porzione finale del gene 59 del genoma virale. Il ciclo di amplificazione prevede una fase di denaturazione a 94°C per 5 minuti seguita da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 57°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 1 minuto.

### **3.2 Virus neutralizzazione con anticorpi monoclonali.**

Per facilitare l'isolamento di virioni deleti è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale (Mab) 4D9 (Czerny et al 1997) allestendo una reazione di virus neutralizzazione su monostrato confluyente di PLK. Gli anticorpi 4D9 sono in grado di legare specificamente la proteina F1L prevenendo l'entrata dei virus wild type nelle cellule. Gli anticorpi diluiti 1:100 sono stati messi a contatto con le diluizioni 1:10 e 1:100 della miscela di transfezione e con  $10^3$ TCID<sub>50</sub> del ceppo NZ2 utilizzato come controllo positivo. Dopo una incubazione di 45 minuti a 37°C, in agitazione, sono stati infettati monostrati confluenti di PLK allestiti in piastre da 6 pozzetti con la stessa modalità descritte nel paragrafo 1.3.

### **3.3 Microscopia elettronica**

Le cellule (PLKs) infettate e colorate di blu, in seguito ad aggiunta di X-Gluc sono state raccolte con uno scraper e risospese in 500 µl di PBS per essere inviate al Laboratorio di microscopia elettronica dell'IZS Brescia.

### **3.4 Prova immunostochimica**

TOB e PLK sono state fatte crescere su vetrini sterili posti in piastre per coltura cellulare a 24 pozzetti. Per ogni pozzetto sono state seminate  $1 \times 10^4$  cellule che sono state infettate dopo una notte d'incubazione a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Parte dei pozzetti sono stati infettati con la diluizione 1:10 e parte con la diluizione 1:100 della miscela di transfezione raccolta tre giorni PI. Dopo 48 ore è stato aggiunto X-Gluc, 15µl per pozzetto di uno stock di 20mg/ml, e dopo 18 ore le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% fredda per 20 minuti. Le cellule sono poi state incubate a 4°C per tutta la notte con gli anticorpi monoclonali 2E5 (Housawi et al., 1998) diluiti 1:150 in PBS 0,3% Triton-X. Il giorno seguente, dopo appropriati lavaggi, le cellule sono state incubate con gli anticorpi secondari (anti mouse IgG coniugati con perossidasi diluiti in PBS 0,3% Triton-X) per 30 minuti a 37°C poi si è proceduto allo sviluppo aggiungendo una soluzione composta da diaminobenzidina (DAB, Sigma) 0,5mg/ml 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris 0,05 M pH 7.5.

## **RISULTATI PARTE SPERIMENTALE A**

Per la costruzione del plasmide di transfezione pVU11 si è utilizzato il plasmide pV32 al quale sono stati sostituiti il braccio destro (IL 10 RA) e sinistro (IL 10 LA) con porzioni di circa 500 bp dei geni fiancheggianti il gene 59 target della delezione.

Il braccio destro è stato amplificato con i primers RAF e RAR che hanno permesso l'inserimento dei siti di restrizione per l'enzima Sac I nell'amplificato di 513 bp.

Il braccio destro, F1L RA, è stato inserito per primo poiché nella sequenza del braccio sinistro, F1L LA, era presente un sito di restrizione per l'enzima Sac I. Il prodotto di PCR F1L RA, purificato dal gel di agarosio, e il plasmide pV32 sono stati sottoposti a taglio enzimatico con l'endonucleasi di restrizione Sac I e sottoposti a reazione di ligasi. Le colonie di *E.coli* DH5 $\alpha$  cresciute su terreno selettivo in seguito a trasformazione con reazione di ligasi sono state analizzate per identificare il plasmide pV32 contenente il frammento F1L RA. Per l'individuazione dei cloni batterici contenenti il plasmide ricombinante sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione perchè permettono di analizzare contemporaneamente fino a 20 cloni e sono un metodo di screening piuttosto economico e relativamente rapido. L'inserzione del braccio destro è stata verificata mediante restrizione con enzima Bam HI che ha prodotto un taglio in posizione 14 dell' F1L RA e in posizione 1135 del plasmide pV32 producendo due frammenti (uno di 2 kbp e uno di 4 kbp) nei plasmidi ricombinanti e un solo frammento in quelli non ricombinanti che sono stati visualizzati su gel di agarosio (figura 1). Dei due cloni sequenziati il numero 1 conteneva la sequenza corretta, ne è stato fatto uno stock in glicerolo e il nuovo plasmide è stato denominato pVu610.

Il braccio sinistro è stato amplificato mediante i primers LAF e LAR che hanno permesso l'inserimento dei siti di restrizione per gli enzimi Hind III e Asc I nell'amplificato di 518 bp. F1L LA è stato inserito nel plasmide pVu610 con lo stesso procedimento descritto per il braccio destro. Lo screening sui cloni batterici prodotti è stato eseguito con l'enzima Sac I che producendo un taglio in posizione 136 del braccio sinistro e due tagli nel plasmide in posizione 3101 e 3113 ha

permesso di visualizzare tre bande nei plasmidi contenenti la nuova F1L LA (0.5 kbp, 2.5 kbp e 2.9 kbp) e due bande nei plasmidi non ricombinanti (0.5 kbp e 5.5 kbp)(figura 2). I cloni ricombinanti n. 3 e 16 sono stati sequenziati per confermare l'inserimento del nuovo braccio sinistro. Il plasmide contenente le due nuove braccia F1L RA e F1L LA è stato denominato pVU11.

Il plasmide ricombinante pVU11 insieme al virus orf NZ2 sono stati utilizzati per la transfezione di un monostrato di PLK all'80% di confluenza. L'aggiunta di X-Gluc al terzo giorno PI ha prodotto un'intensa colorazione blu dopo circa 4 ore d'incubazione. Le cellule infette, raccolte separatamente dal terreno di coltura, sono state utilizzate per infettare piastre da 6 pozzetti e purificare il virus ricombinante delecto della proteina F1L dal virus wild type con il metodo delle placche. L'infezione è stata eseguita inizialmente su monostrati confluenti di PLK e PKK utilizzando la miscela di transfezione alle diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000. L'aggiunta di X-Gluc ai pozzetti infetti al quarto o quinto giorno PI ha prodotto nella maggior parte dei casi una colorazione blu diffusa nelle diluizioni 1:10 e 1:100 che si è sviluppata 18-24 ore PI (figura 3). Non è stata prodotta alcuna colorazione blu aggiungendo l'X-Gluc il secondo o il terzo giorno PI nonostante fosse visibile l'effetto citopatico in coltura cellulare.

Solo nelle diluizioni 1:1000 è stato possibile osservare l'effetto citopatico caratteristico dell'OV costituito da placche d'infezione separate e distinte (figura 4 e 7) poiché nelle altre diluizioni le cellule che si sono colorate di blu hanno mostrato foci d'infezione con cellule rotondeggianti su tutto il monostrato (figura 5 e 6). La mancanza di placche d'infezione blu visibili ad occhio nudo ha reso impossibile la purificazione del virus delecto. Sono stati eseguiti diversi tentativi di raccolta delle sole cellule blu con ago sterile al microscopio ottico, ma la successiva infezione di PLK non ha prodotto effetto citopatico. L'utilizzo dell'anticorpo monoclonale 4D9 nella prova di virus neutralizzazione non ha inibito al 100% la crescita del virus wild type ma ne ha rallentato la crescita in coltura perchè il monostrato cellulare, al quarto giorno PI, era ancora intatto e ha mostrato foci d'infezione di colore blu diffusi e

scarsa lisi cellulare che si è invece osservata nel controllo positivo costituito da cellule infette in assenza di MAb (figure 8 e 9).

Il surnatante della transfezione è stato testato più volte in coltura, ma, solo in un caso è stata evidenziata la colorazione blu.

L'infezione di monostrati confluenti di TOB ha prodotto placche blu visibili ad occhio nudo anche se molto deboli e in numero limitato (figure 10, 11 e 12).

L'infezione con una delle placche raccolte di una nuova coltura cellulare ha prodotto altre placche blu visibili ad occhio nudo (figure 13 e 14).

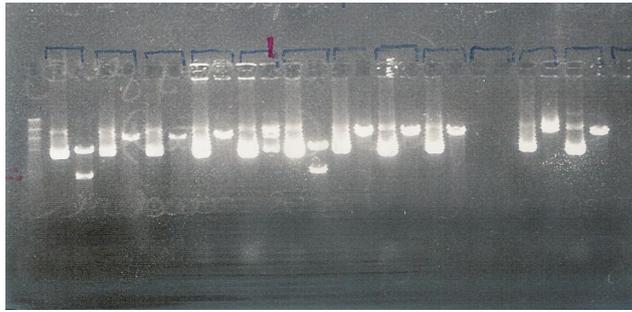
Le diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 della miscela di transfezione utilizzate per l'infezione di colture cellulari e le cellule di pozzetti infetti coloratesi di blu sono state testate in PCR per verificare la delezione del gene 59 e l'inserimento del gene  $\beta$ -glucuronidase. L'amplificazione ha prodotto un amplificato di circa 1500 bp come atteso inoltre, la contemporanea assenza di amplificati per il campione contenente il DNA del ceppo NZ2 utilizzato come controllo, ha confermato la specificità della banda visualizzata su gel di agarosio e la riuscita della transfezione e successiva ricombinazione omologa (figura 15). La positività del medium raccolto al terzo giorno post transfezione in seguito a colorazione potrebbe comunque essere dovuta alla presenza di plasmide residuo utilizzato per la transfezione.

Il lisato cellulare infettato con la miscela di transfezione diluita 1:10 è stato raccolto in 500  $\mu$ l di PBS ed osservato al microscopio elettronico in colorazione negativa.

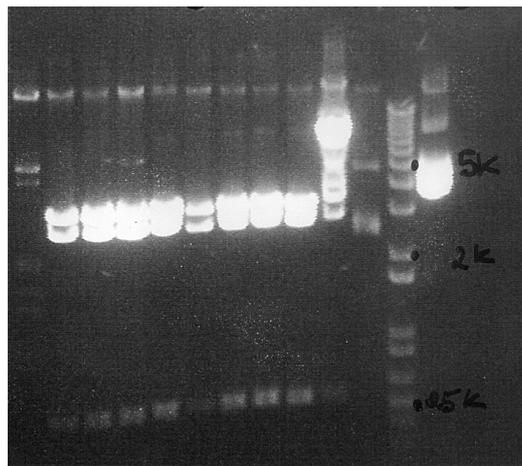
Nel complesso il virus deleto è apparso alterato rispetto alla forma e morfologia consuete (figure da 16 a 24). Le particelle osservate erano in larga parte tondeggianti, spesso con bordo irregolare e frastagliato e in pochi casi erano visibili i tipici virioni allungati. Erano comunque dominanti le particelle di tipo M con superficie elettrolucente e presenza di filamenti di superficie ma arrangiati in maniera disordinata non a gomito come nelle particelle wild-type. Erano poi visibili alcune particelle simil-C elettrondense, ma anche in questo caso, abbastanza difformi dalla forma equivalente visibile in campioni clinici. In particolare il bordo mammellonato non era

pressoché mai visibile e in alcuni casi si percepivano sottili filamenti di superficie e il livello di alterazione e distruzione appariva più marcato ed evidente.

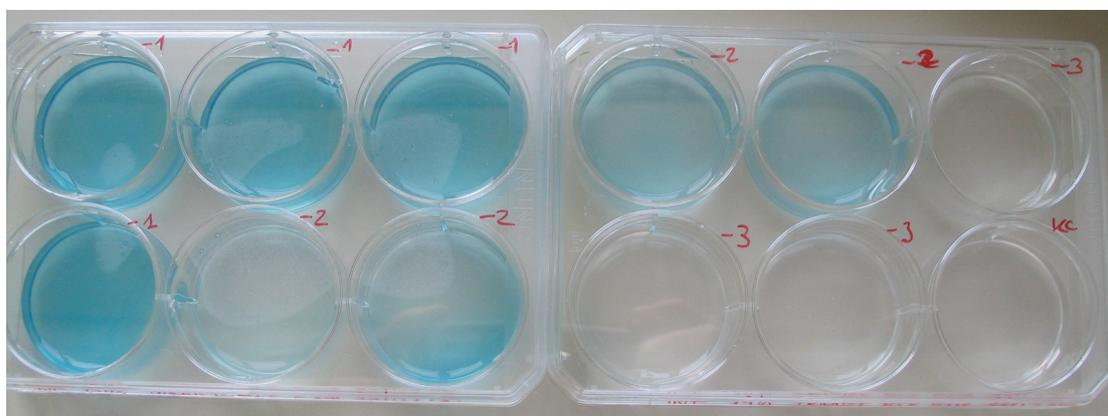
La prova immunistochemica con anticorpi monoclonali 2E5 che riconoscono la proteina F1L ha permesso di evidenziare l'assenza di questa proteina nelle cellule coloratesi di blu dopo aggiunta di X-Gluc confermando quindi che i foci d'infezione blu visibili al microscopio sono effettivamente generati dal virus deleto (figura 25)



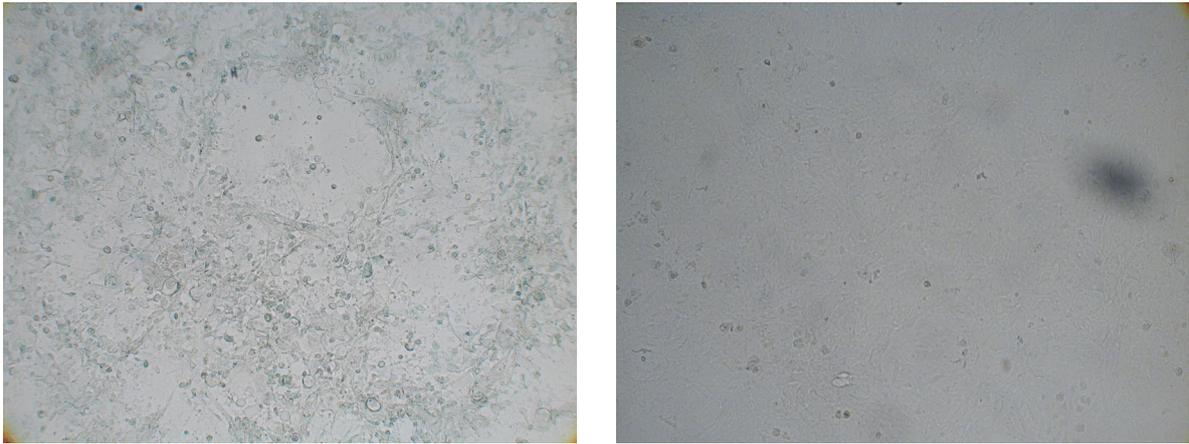
**Figura 1.** Gel di agarosio dei plasmidi tagliati con enzima di restrizione Bam HI. I plasmidi ricombinanti sono visibili nelle lane 3 e 12.



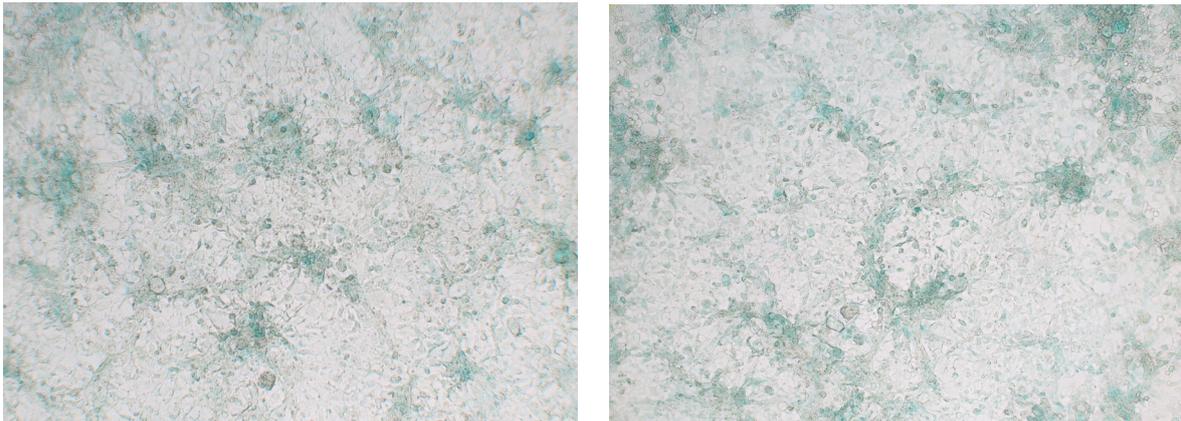
**Figura 2.** Gel di agarosio dei plasmidi tagliati con enzima di restrizione Sac I plasmidi ricombinanti sono visibili nelle lane 2-9.



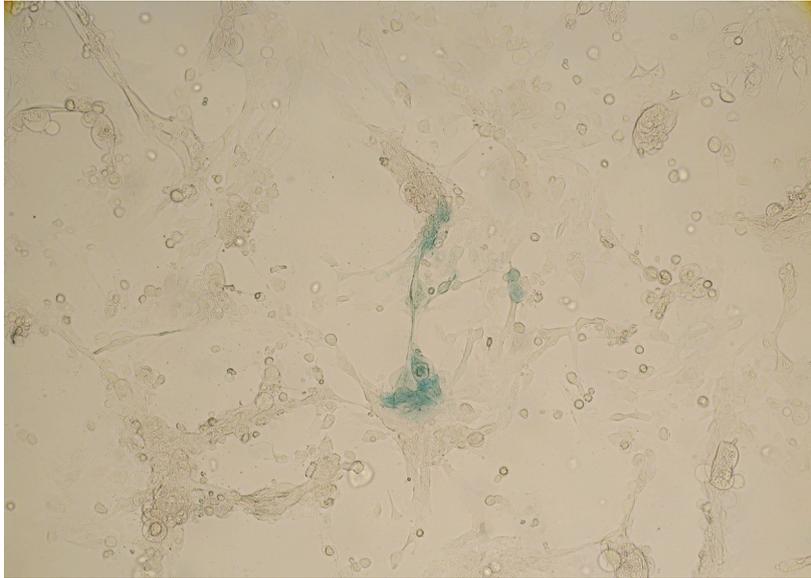
**Figura 3.** Piastre da 6 pozzetti contenenti colture primarie di PKK infette con la miscela di transfezione dopo aggiunta di x-Gluc.



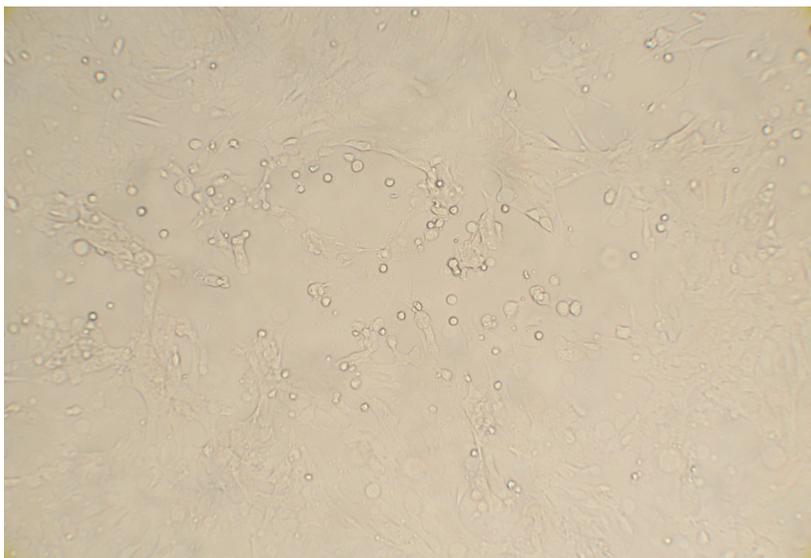
**Figura 4.** PKK infette con la miscela di transfezione osservate al microscopio (ingrandimento 10X). A sinistra è visibile una placca non colorata in seguito ad aggiunta di X-Gluc probabilmente generata dal virus wild type e singole cellule blu rotondeggianti. Controllo cellule a destra.



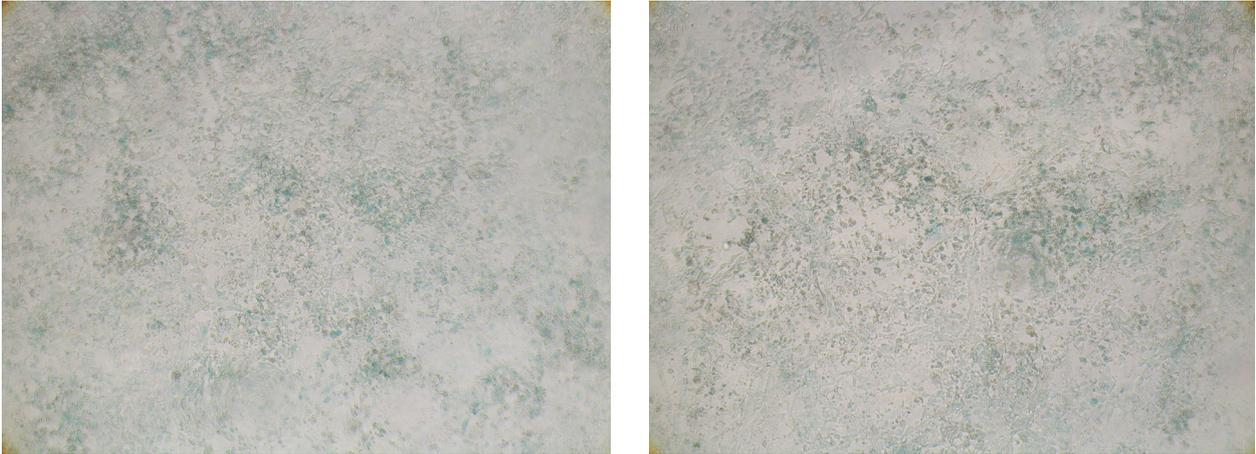
**Figura 5.** Monostrato di PKK infette con la miscela di transfezione osservate al microscopio, ingrandimento 10X (diluizione 1:10 a sinistra, 1:100 a destra)



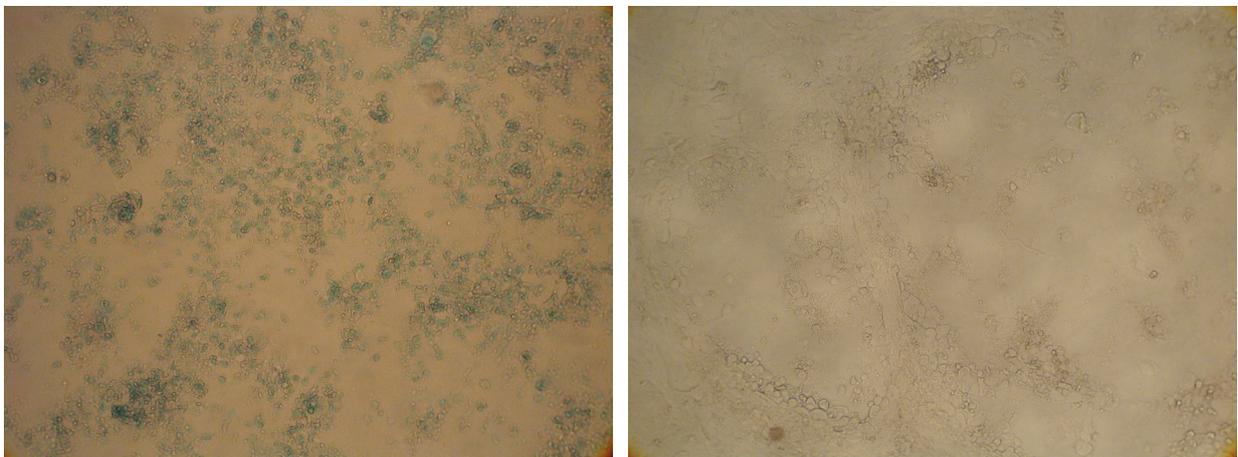
**Figura 6.** PLK infette con la diluizione 1:1000 della miscela di transfezione osservate al microscopio ottico (ingrandimento 10X): cellule infette con mutante deleto (colorazione blu dopo aggiunta di x-Gluc).



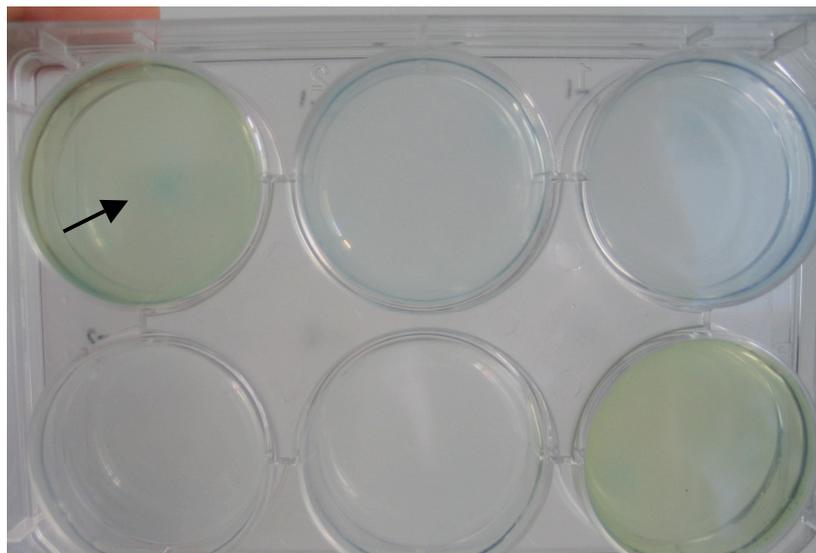
**Figura 7.** PLK infette osservate al microscopio (ingrandimento 10X): placca con virus wild type.

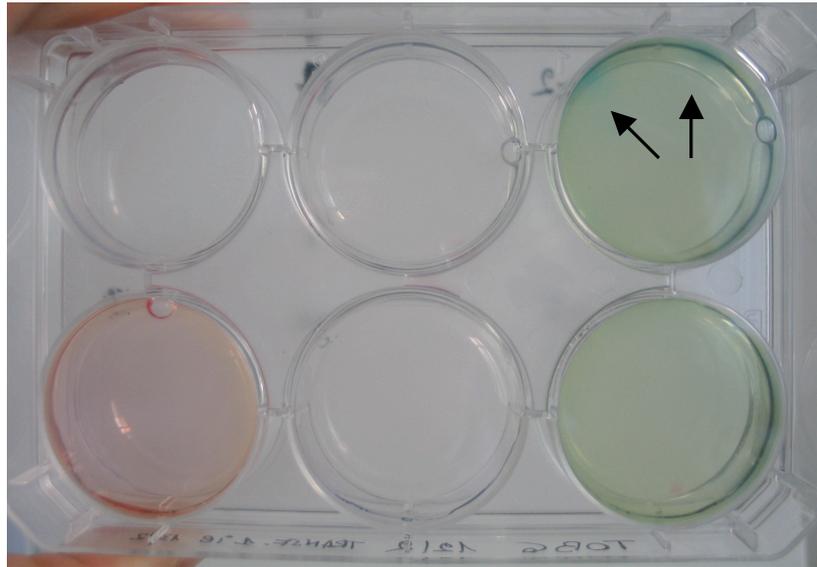


**Figura 8:** prova di virus neutralizzazione con anticorpi monoclonali. Pozzetto contenente la diluizione -1 della transfection mix e Mab 4D9 diluiti 1:100. Chiaramente visibili i foci d'infezione colorati di blu, quasi assente il caratteristico effetto citopatico del virus orf in coltura (placche d'infezione circolari con cellule rotondeggianti e rinfrenanti)

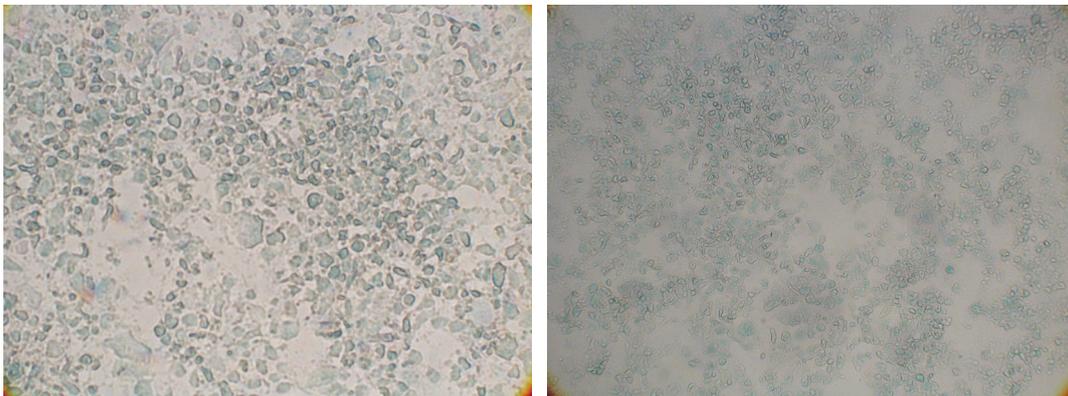


**Figura 9.** A sinistra: controllo positivo, pozzetto contenente la diluizione -1 della transfezione in assenza degli anticorpi monoclonali 4D9. A destra: controllo virus. Pozzetto infetto con il ceppo NZ2 wild type in presenza di Mab 4d9. L'effetto citopatico caratteristico del virus orf è chiaramente visibile, due placche d'infezione centrali

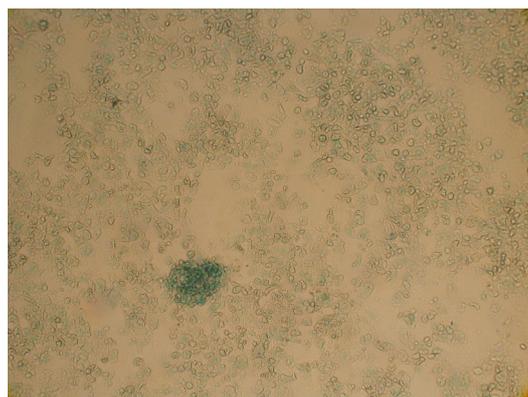




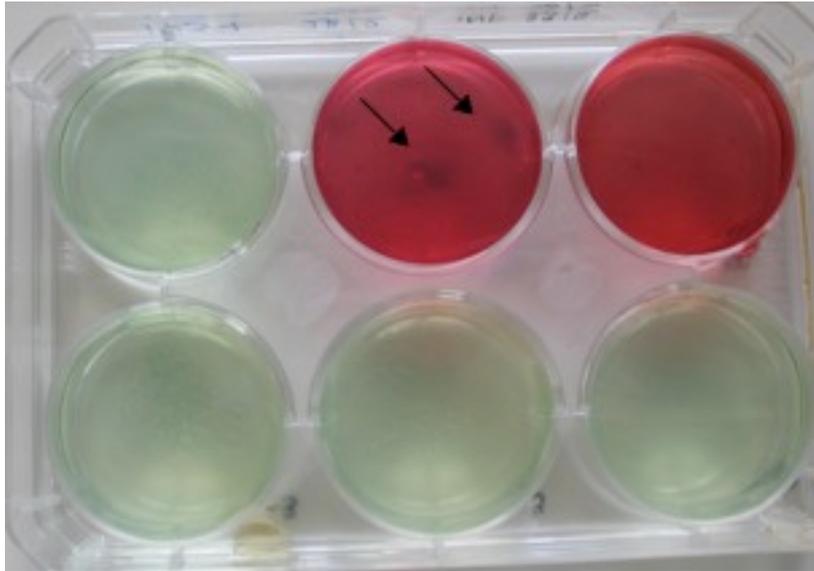
**Figura 10:** piastre di TOB colorate al quarto giorno PI in assenza di neutral red. Visibili ad occhio nudo placche blu, nella foto indicate dalle frecce.



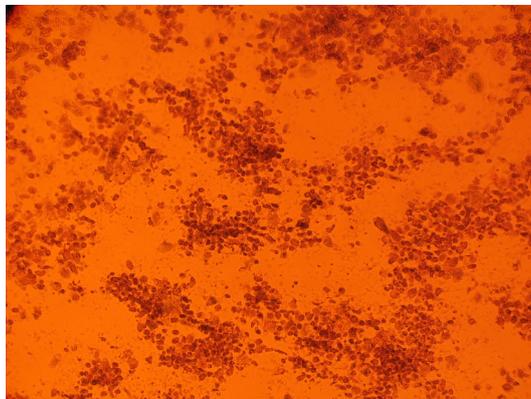
**Figura 11.** Cellule delle placche blu visibili ad occhio nudo colorate senza neutral red osservate al microscopio ottico rovesciato (ingrandimento 40X a sinistra e 10X a destra).



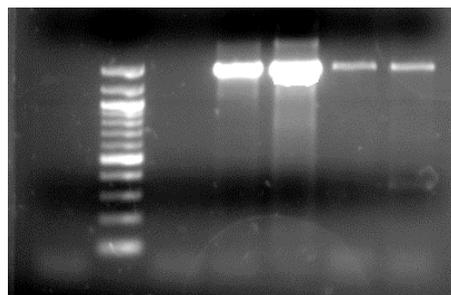
**figura 12.** Foci d'infezione blu prodotti su colture di TOB osservate al microscopio ottico con ingrandimento 10X. In questi pozzetti nessuna placca blu era osservabile ad occhio nudo.



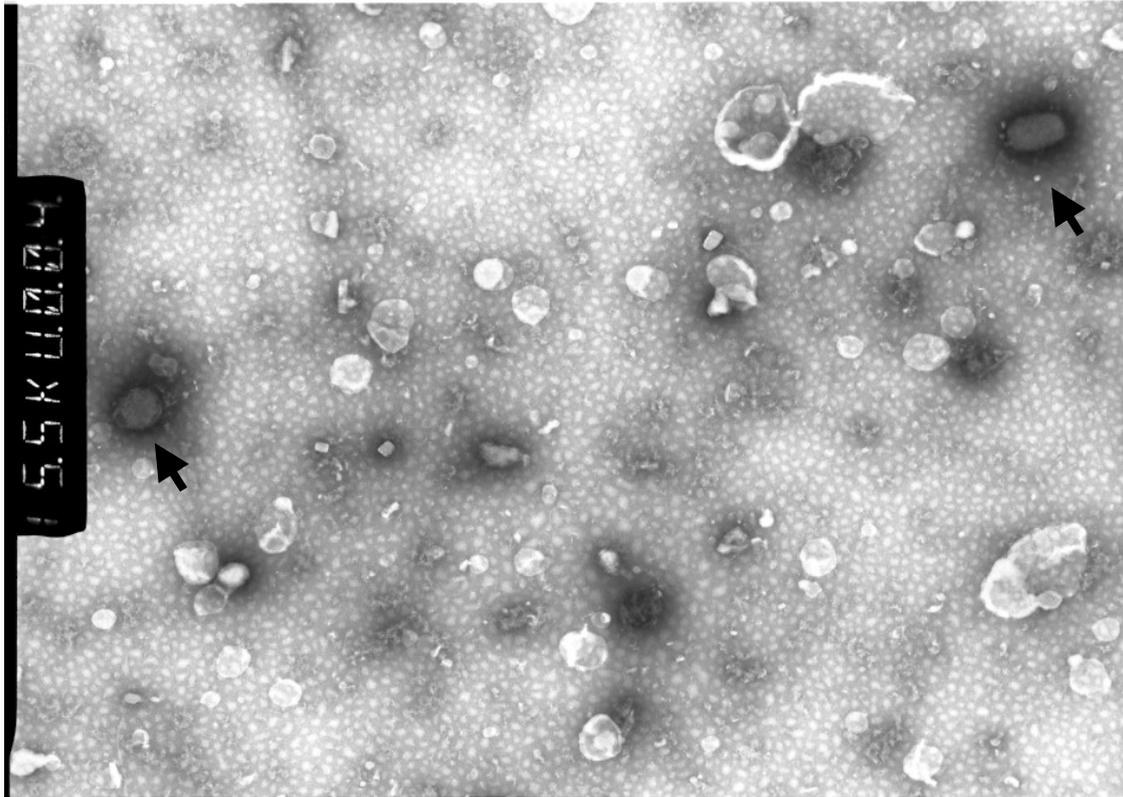
**Figura 13.** Piastra di TOB con due pozzetti colorati in presenza di neutral red: le due frecce indicano placche blu cresciute in seguito ad infezione con una delle placche blu raccolte dal pozzetto di figura 10.



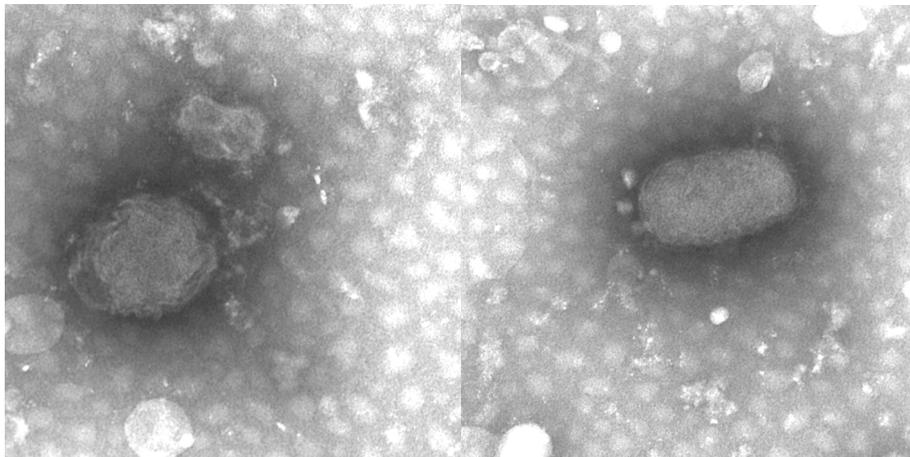
**Figura 14.** Cellule della placca blu visibile ad occhio nudo osservate al microscopio ottico rovesciato (ingrandimento 10X). La colorazione rossa è dovuta alla presenza del neutral red.



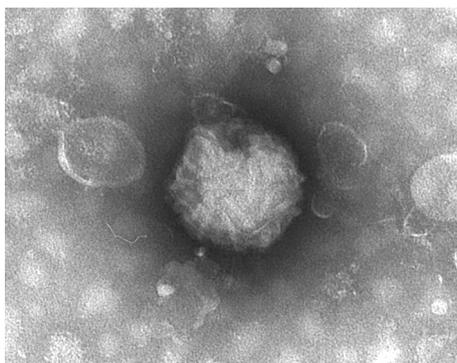
**Figura 15.** Gel di agarosio dei prodotti di PCR della Transfezione. Da sinistra verso destra: Bianco mix, marker 1 Kbp, ceppo NZ2 WT, transfezione 1:10, transfezione 1:100, cellule infette, surnatante.



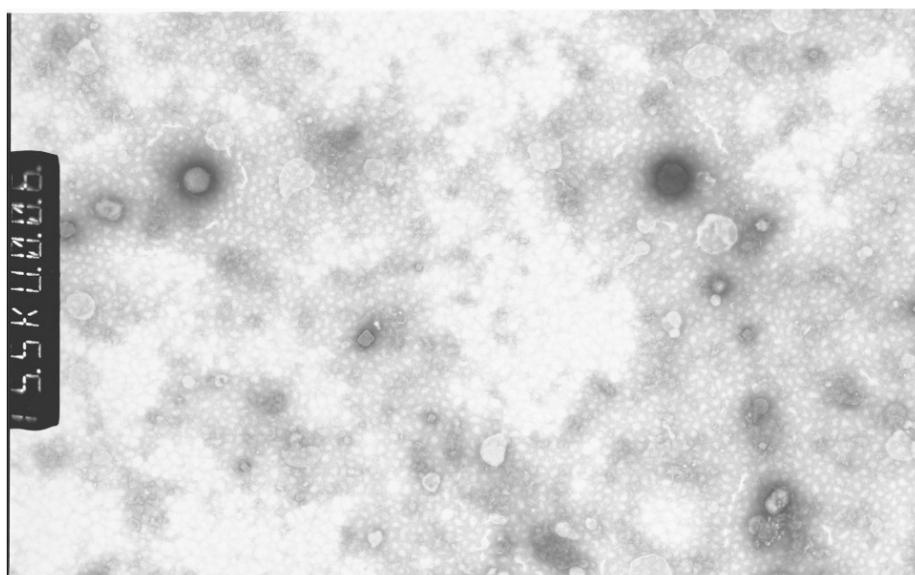
**Figura 16.** Due particelle: una allungata (in alto a dx) e 1 tondeggiante (in basso a sx) a superfciie omogenea, tipo forma C, prive di tubuli di superfciie. (x15500)



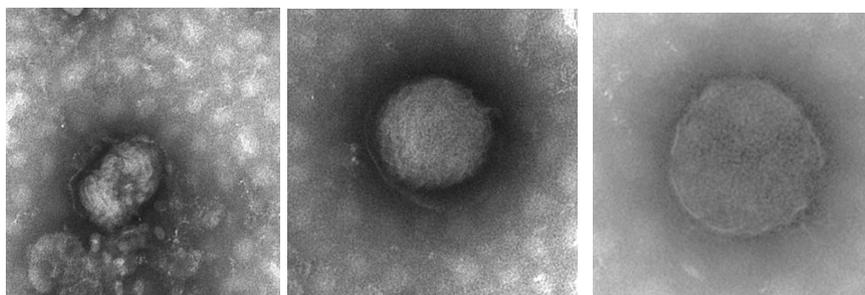
**Figura 17:** Ingrandimenti delle particelle di tipo C di figura 16.



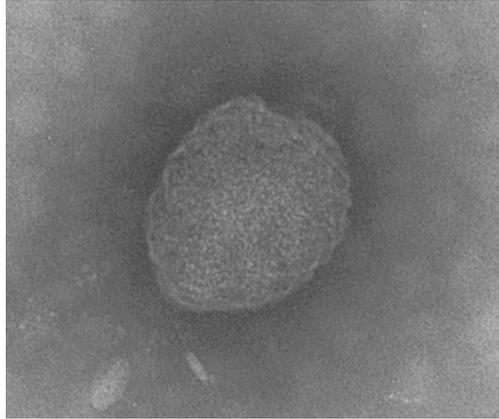
**Figura 18.** Singola particella tondeggiate (forma M) con tubuli evidenti ma con assetto disordinato (x28500)



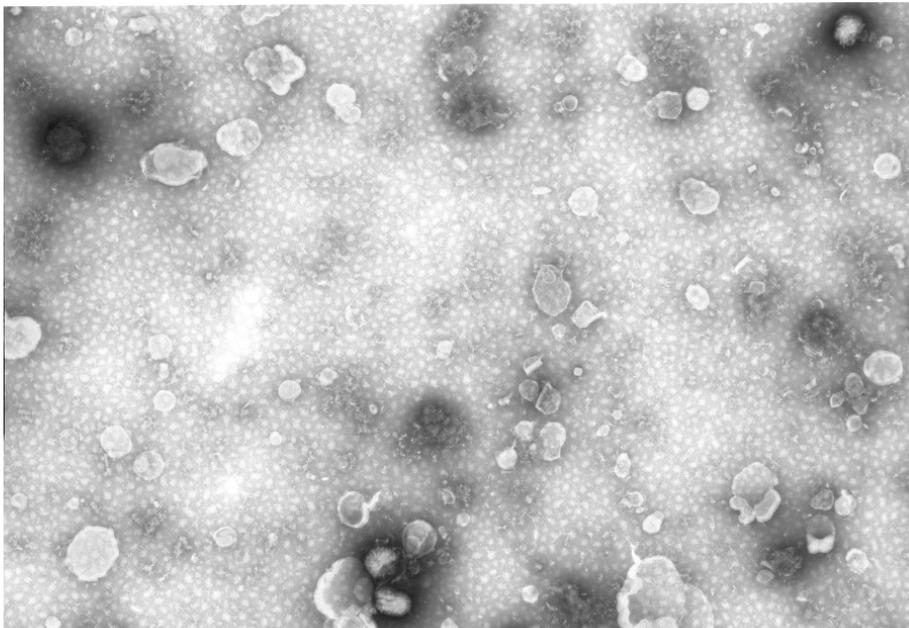
**Figura 19.** Tre particelle di cui due forme M ed 1 forma C; una M (in alto a sx) e la C (in alto a dx) hanno aspetto tondeggiate, l'altra M è allungata, più piccola (in basso a dx). I tubuli di superficie sono sempre disposti in modo disordinato (x15500).



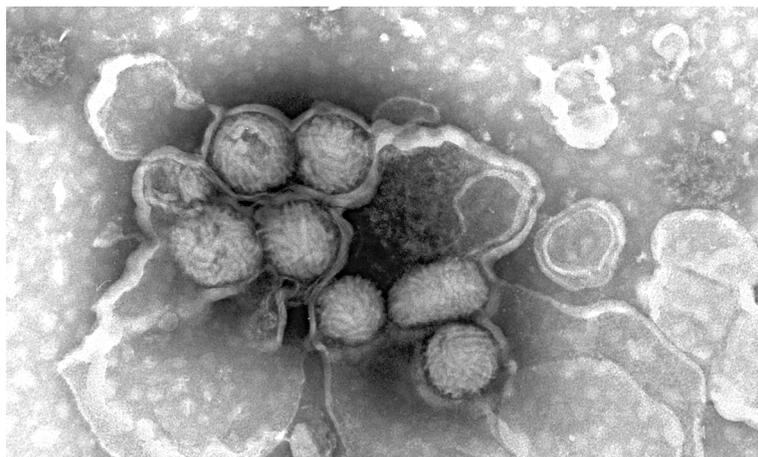
**Figura 20.** A sinistra, particella M allungata; al centro, particella M tondeggiate; a destra, particella C. (le foto sono ingrandimenti delle particelle osservate in figura 19).



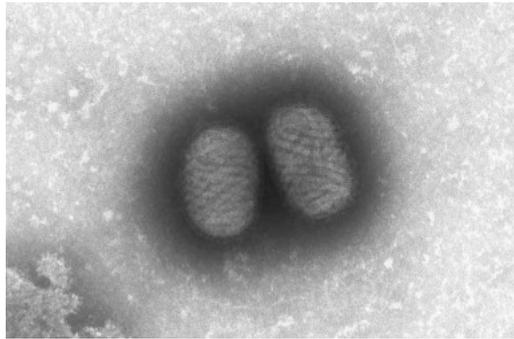
**Figura 21.** Particella intermedia M-C, poco elettrolucente con filamenti percepibili ma più sottili e disordinati (x28500)



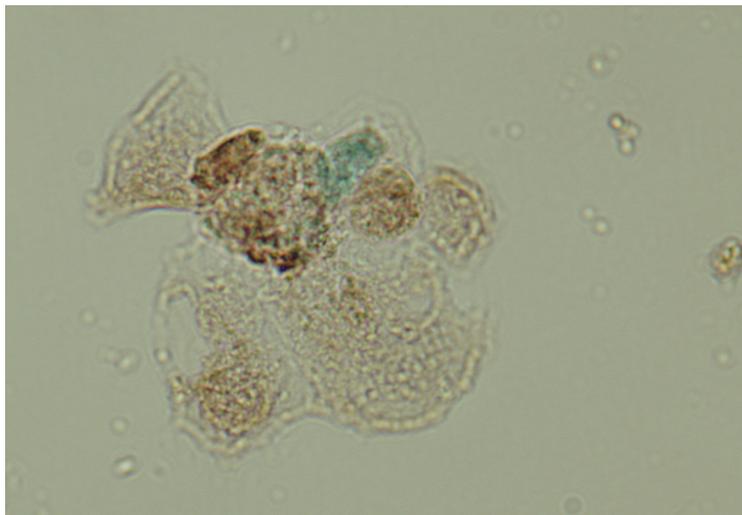
**Figura 22.** 4 particelle: tre forme M sempre tondeggianti con disposizione irregolare dei filamenti



**figura 23.** Particelle rotondeggianti e allungate con filamenti irregolari.



**Figura 24.** Particelle di OV wild type di confronto (x21000)



**figura 25.** Esame immunoistochimico. L'anticorpo 2E5 non si lega alle cellule blu infettate con virus deleto della proteina F1L mentre si lega alle cellule infette con virus wild type (colorazione marrone dovuto allo sviluppo mediante DAB)

**PARTE SPERIMENTALE *B*:**

**INFEZIONE SPERIMENTALE IN OVI-CAPRINI E  
ANALISI GENOMICA**



Recentemente sono stati riportati casi di ectima maligno nelle capre o focolai d'infezione in greggi misti di ovini e caprini, nei quali solo le capre venivano colpite. Questo ha fatto ipotizzare che i ceppi virali in grado di infettare le capre possano avere caratteristiche differenti rispetto a quelli che infettano gli ovini (de la Concha-Bermejillo et al 2003; Scagliarini et al 2006). Inoltre, analisi genomiche effettuate sul gene VEGF di ceppi di OV isolati da capre, hanno dimostrato che questo presenta caratteristiche intermedie tra il gene del virus OV degli ovini e il PCPV suggerendo possibili eventi di ricombinazione (Ueda et al 2003). Durante la replicazione dei poxvirus le ricombinazioni sono infatti un evento piuttosto frequente. Dati derivati dall'analisi genomica di diversi Orthopoxvirus ha rivelato che gli eventi di ricombinazione sono più frequenti nell'estremità destra del genoma, questa regione è la più variabile nei Parapoxvirus è possibile quindi che questa variabilità sia da ricercarsi in possibili eventi di ricombinazione (Mercer et al 2006). In questa porzione genomica dei Parapoxvirus sono concentrate sequenze codificanti ORF (open reading frame) ricche in AT che vengono considerate le regioni acquisite più recentemente dal genoma di cellule ospiti o di altri virus co-infettanti. Fenomeni di ricombinazione genomica naturale tra specie diverse di Parapoxvirus non sono mai stati descritti e per poter avvenire necessitano di substrati permissivi che garantiscono il successo replicativo per entrambi i virus co-infettanti. Fin ora, solo la Renna (*Rangifer tarandus*) ha dimostrato di essere una specie naturalmente recettiva ad OV che a PCPV (Tikkanen et al 2004). Lo scopo di questa sperimentazione è stato quello di verificare la recettività delle specie ovina e caprina all'infezione da PCPV e verificare possibili eventi di mutazione genomica in seguito all'infezione con un isolato di OV di origine ovina nelle capre.

## **MATERIALI E METODI**

### **1 Animali**

Nella prova sperimentale sono stati utilizzati due ovini di razza massese e 5 capretti di razza Saanen di circa due mesi. Capre ed ovini provenivano da un'azienda indenne da ectima contagioso. Dopo un periodo di adattamento di circa un mese, nel quale gli animali sono stati svezzati e sottoposti a un costante controllo clinico, si è proceduto all'infezione sperimentale.

La sperimentazione è stata condotta nel rispetto del D.Lvo 116/92 sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali.

#### **1.1 Infezione sperimentale**

Il ceppo di OV IT987/04, utilizzato per l'infezione, proveniva da un focolaio di ectima contagioso di un allevamento ovino dell'Emilia Romagna in cui si erano osservate gravi forme della malattia in animali adulti, mentre il ceppo di PCPV 1303/05 era stato isolato dalle mammelle di una bovina in Sicilia. Gli inoculi per l'infezione sono stati preparati a partire da 1 grammo di materiale crostoso tritato in 10 ml di PBS (Phosphate buffered saline) antibiotato (pennicillina 1000 UI/ml, streptomycin 10 mg/ml, amfotericina B 25 mg/ml). La soluzione è stata centrifugata a 2000xg per 30' a +4° e il surnatante è stato filtrato con filtro sterile da 0.45 mm.

L'infezione è stata effettuata mediante scarificazione del piatto interno della coscia, in modo da ottenere tre linee di scarificazione lunghe circa 3 cm su entrambi gli arti posteriori.

Sono stati utilizzati 200 µl di sospensione virale, applicati mediante tamponi sterili sulle linee di scarificazione. La coscia destra degli animali è stata infettata con OV e la sinistra con PCPV (Figura 5).

#### **1.2 Clinical-Score**

Durante tutto il periodo della sperimentazione, gli animali sono stati sottoposti giornalmente ad esame clinico generale con particolare riferimento alla valutazione

della progressione clinica delle lesioni conseguenti all'infezione. L'entità della flogosi è stata valutata misurando lo spessore cutaneo a livello delle linee di scarificazione mediante cutimetro.

Le croste prodotte dagli animali infetti sono state raccolte e conservate a -80°C prima del loro distacco spontaneo.

### **1.3 Prelievo bioptico**

Al decimo giorno post-infezione (PI) sono state effettuate due biopsie di 3 mm in ciascun capretto, a livello delle linee di scarificazione infettate con PCPV.

Di queste una è stata congelata a -80°C per la ricerca del DNA virale mediante PCR, mentre la seconda è stata fissata in formalina per essere sottoposta ad analisi immunostochimica utilizzando l'anticorpo monoclonale 2E5 (Housawi et al., 1998).

### **1.4 Estrazione del DNA**

Il DNA è stato estratto dal pool di croste prelevate da ciascun animale e dai campioni bioptici conservati a -80°C, mediante il kit NucleoSpin® Tissue (Machery-Nagel, Germany) secondo le indicazioni del costruttore.

Per ciascun campione sono stati sminuzzati 25 mg di tessuto mediante pestello sterile e polvere di quarzo in 100 ml di PBS (Phosphate buffered saline).

### **1.5 Amplificazione dei geni dell' orf virus**

I geni VEGF (ORF 132), A33R (ORF 109), A34R (ORF 110), F1L (ORF 059), sono stati amplificati mediante PCR a partire dal DNA estratto dalle croste raccolte da tutti gli animali. Per l'amplificazione sono state preparate diverse miscele di reazione come indicato in tabella 1.

COMPONENTI	VOLUME
Buffer 10x	5 ml
Solution Q	10ml
dNTPs 10 mM	4 ml
Primer Foward 20 pmoli/ml	1 ml
Primer Reverse 20 pmoli/ml	1 ml
Taq DNA Polymerase (5 U/ml)	0.15 ml
H <sub>2</sub> O DNAsi e RNasi-free	23.75 ml
DNA	5 ml

**Tabella 1.** Miscela della reazione di amplificazione utilizzando il kit Taq DNA polimerase (Qiagen)

I primers degli ORF (open reading frame) 109, 110, 116, sono stati disegnati mediante l'ausilio del programma Primer Analysis software version 6.69 (OLIGO from Molecular Biology Insights, Plymouth, MN), in seguito ad allineamento delle sequenze genomiche di tre ceppi di OV depositate su GenBank: IA82 (AY386263) isolato da un ovino in Iowa (Delhon et al., 2004), SA00 (AY386264) isolato da una capra negli Stati Uniti (Guo et al., 2003) e NZ2 (DQ184476) isolato da un ovino in Nuova Zelanda (Robinson et al., 1982).

### 1.5.1 Amplificazione del VEGF virale (ORF 132)

Il primer senso GF1 (5'-GCGGGATCCGCCATGAAGTTGCTCGT-3') e l'antisenso GF2 (5'- GCGGAATTCCTAGCGGCGTCTTCTGG-3') sono stati utilizzati per amplificare una regione di 400 bp, comprendente l'intero gene VEGF.

La miscela di amplificazione è stata sottoposta a una prima fase di denaturazione a 94 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di annealing a 58°C per 30 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 45 secondi. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad annealing a 58°C per 2 minuti e ad un'estensione finale di 7 minuti a 72°C.

### **1.5.2 Amplificazione dell'A33R virale (ORF 109)**

La coppia di primers A33R1 (5'-GACATCCATCGTATATTTACTGT-3') e l'A33R2 (5'-ACAGCAACCCATTTATTAGA- 3') è stata utilizzata per amplificare una regione genomica di 602 bp contenente l'intero gene.

La miscela di amplificazione è stata sottoposta a una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una prima fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una seconda fase di annealing a 53°C per 40 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 45 secondi. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di annealing a 53°C per 2 minuti e ad un'estensione finale di 7 minuti a 72°C.

### **1.5.3 Amplificazione dell'A34R virale (ORF 110)**

Il primer senso A33R1 (5'-AGTATTTGAAGTCGCGACA-3') e l'antisenso A33R2 (5'-TCTAATAAATGGGTTGCTG- 3') sono stati utilizzati per amplificare una porzione di 558 bp contenete l'intera sequenza genica.

La miscela di reazione è stata sottoposta ad una prima fase di denaturazione a 94 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una prima fase di denaturazione a 94°C per 40 secondi, una seconda fase di annealing a 50°C per 40 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 1 minuto. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di annealing a 50°C per 2 minuti e ad un'estensione finale di 7 minuti a 72°C.

### **1.5.4 Amplificazione dell' F1L virale (ORF 059)**

Per l'amplificazione del gene F1L sono stati utilizzati il primer di senso ORFA (5'-ATGGATCCACCCGAAATCA-3') e quello antisenso ORFB (5'-TCACACGATGGCCGTGACC- 3') che amplificano l'intero gene (1002 bp) codificante per la proteina dell'envelope F1L (Scagliarini et al., 2002).

La miscela di amplificazione è stata sottoposta a una fase iniziale di denaturazione a 94 °C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una

prima fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una seconda fase di annealing a 58°C per 30 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 1 minuto. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di annealing a 58°C per 2 minuti e ad estensione finale di 7 minuti a 72°C.

### **1.5.5 Amplificazione del gene B2L del PCPV**

Per verificare l'esito dell'infezione del PCPV sulle aree scarificate, il DNA estratto, sia dalle croste che dalle biopsie congelate a -80°C, è stato sottoposto ad amplificazione del gene B2L (594 bp), codificante per la proteina p37K utilizzando i primers universali forward PPP1 (5' GCTGTCCACGATGAGCAGCT 3') e reverse PPP4 (5' TACGTGGGAAGCGCCTCGCT 3') (Inoshima et al., 2000)

La miscela di amplificazione è stata sottoposta a una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di amplificazione ciascuno costituito da una prima fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una seconda fase di annealing a 58°C per 30 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 35 secondi. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di estensione di 5 minuti a 72°C

### **1.5.6 Amplificazione del gene IL10 dell'Orf virus (ORF 127)**

Allo scopo di escludere una possibile cross-contaminazione con OV sulle biopsie e sulle lesioni crostose raccolte dalle aree infettate da PCPV, dopo l'estrazione del DNA, è stato effettuato il tentativo di amplificazione del gene per l' IL10 (ORF 127) di OV.

Questo gene infatti non è mai stato identificato all'interno del genoma del PCPV, mentre ne è nota la sequenza nell' orf virus (Fleming et al., 2000).

I primers utilizzati per l'amplificazione sono IL10F (5' ATGTCGAAGAACAATAATTCT 3') e IL10R (5' TTGTAAACACCTCGTTCCTG 3') (Dr Colin McInnes) che amplificano una regione di circa 200 bp del gene. Il ciclo di amplificazione consisteva di: denaturazione a 94°C per 5 minuti, 35 cicli ciascuno

costituito da una prima fase di denaturazione a 94°C per 60 secondi, una seconda fase di annealing a 50°C per 30 secondi e a una fase di allungamento a 72°C per 30 secondi. Al termine dei 35 cicli la miscela è stata sottoposta ad un'ultima fase di estensione di 5 minuti a 72°C.

### **1.6 Corsa elettroforetica, purificazione degli amplificati e sequenziamento.**

Al termine di ogni PCR gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel agarosio al 2%. Il DNA amplificato è stato colorato con bromuro di etidio e visualizzato mediante transilluminatore (luce ultravioletta), le immagini state acquisite mediante il software Quantity One in dotazione all'analizzatore d'immagine (FluorS Biorad®, Germany). La purificazione degli amplificati per il successivo sequenziamento è stata eseguita utilizzando il kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (ROCHE®, Germany).

La quantificazione del prodotto PCR purificato è stata effettuata su gel d'agarosio 1% utilizzando un marker quantitativo di pesi molecolari (100 bp DNA Ladder BioLabs, Newengland) mediante il software Quantity One (BIORAD®, Germany).

Per ogni gene sono stati sequenziati due campioni di OV isolato da capra e uno isolato da ovino nella direzione senso e antisenso. Il sequenziamento è stato eseguito mediante sequenziatore automatico ABI 3730 (Applied Biosystem) presso i laboratori BioFab, Roma.

### **1.7 Immunoistochimica**

I prelievi biotici effettuati dalle lesioni infettate con PCPV e fissati in formalina al 10% sono stati processati per effettuare l'esame immunoistochimico con anticorpo monoclonale 2E5 (Housawi et al., 1998), presso Moredun Research Institute Edimburg UK.

## 1.8 Carica virale e vitalità del virus

Per monitorare l'efficienza dell'infezione, a partire dai campioni bioptici e crostosi, sono state valutate la carica virale mediante SYBR Green real time PCR (Gallina et al., 2006) e la vitalità del virus mediante infezione di colture primarie di cheratinociti di origine ovina e caprina (PLK e PKK).

La Real-Time PCR messa a punto per la quantificazione di OV (Gallina et al., 2006) si basa sull'amplificazione di un frammento di 70 bp di una regione molto conservata del gene B2L mediante il primer forward qorF 5'-cag cag agc cgc gtg aa-3' ed il primer reverse qorR 5'-cat gaa ccg cta caa cac ctt ct-3'. Per la quantificazione assoluta è stato costruito uno standard di DNA plasmidico, all'interno del plasmide pCR4-TOPO (Invitrogen) è stato clonato un frammento di DNA di 325 bp del gene B2L amplificato tramite i primer PPP3-PPP4 (Inoshima et al. 2001) dal ceppo italiano IT-613/02. I plasmidi sono stati linearizzati mediante l'endonucleasi di restrizione PmeI e stoccati a -20°C in diluizioni in base dieci. La quantificazione è stata effettuata mediante curva di calibrazione costruita sulla base di 5 diluizioni in base 10 del plasmide standard.

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µl contenenti: 5µl di DNA, 10 µl di QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen) e 0,2 µM di primers senso e antisenso. Il profilo termico della reazione consiste di 15 minuti a 95°C per l'attivazione della Taq polimerase seguiti da 40 cicli di denaturazione a 90°C per 10 secondi, annealing a 60°C per 15 secondi e allungamento a 72°C per 20 secondi. Al termine dell'amplificazione si calcola la temperatura di melting di tutti i campioni della reazione partendo da 55°C fino a 95°C con un aumento termico di 1°C ogni 2 minuti. L'analisi della reazione è stata seguita mediante apposito software in dotazione allo strumento Rotor gene 3000, Corbet research, Australia.

Per verificare la vitalità del virus i campioni crostosi sono stati triturati mediante pestello sterile e sabbia di quarzo, risospesi in PBS contenente il 10% di antibiotico, filtrati con filtro da 45 µm. La soluzione virale è stata utilizzata per inoculare colture primarie di cheratinociti in piastre a 6 pozzetti. Dopo un'ora d'incubazione a 37°C è

stato aggiunto D-MEM+HAM'S F12 al 2% di SFB; le colture infette sono state lasciate in incubazione per 5-6 giorni o fino alla comparsa dell'effetto citopatico.

## 2 Approfondimenti sulle ORFs A33R e A34R.

Le ORF A33R e A34R di isolati virali di capra e di ovini (tabella 2) sono state amplificate mediante PCR e sequenziate. In seguito ad allineamento delle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche, effettuato con metodo Clustal W (Thompson et al., 1994) implementato nel programma MegAlign (DNASTAR software, Lasergene Inc., USA) è stata eseguita un'analisi filogenetica utilizzando il software PHYLIP versione 3.6 (Felsenstein, 2001). 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 infine valutata mediante test BOOTSTRAP (Felsenstein, 1985) sulla base di 1000 replicazioni.

Lo studio della possibile presenza siti antigenici riconosciuti dai linfociti T e di motivi di legame per il complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC) è stato effettuato utilizzando gli algoritmi AMPHI (Margalit et al. 1987) e SETTE (Sette et al. 1989) implementati nel programma DNASTAR.

<b>Campione</b>	<b>origine</b>	<b>ORF</b>
987/04	ovino, Emilia R.	A33R, A34R
613	ovino, Emilia R.	A33R, A34R
IT C2	ovino, Emilia R.	A33R
5L	capra, Lazio	A33R, A34R
8L	capra, Lazio	A33R, A34R
19T	capra, Toscana	A33R
1481	capra, Veneto	A33R

**Tabella 2.** Campioni di OV e PCPV sottoposti ad amplificazione e sequenziamento per le ORF A33R e A34R



## **RISULTATI PARTE SPERIMENTALE B**

Per tutta la durata dell'infezione, gli animali non hanno manifestato alcuna alterazione sistemica, la temperatura, monitorata giornalmente, si è sempre presentata nella norma, così come le restanti voci dell'esame obiettivo generale.

L'infezione con il ceppo di OV IT987/04 (figura 1) ha provocato, in tutti gli animali, lesioni cutanee caratteristiche con un'evoluzione simile.

Dopo un giorno dall'infezione, i capretti e gli agnelli hanno sviluppato eritema ed edema in corrispondenza delle linee di scarificazione (Figura 2). Dal terzo giorno PI tutti gli animali hanno mostrato lesioni pustolose associate a un marcato eritema (Figure 3 e 4).

Fra il quarto e il quinto giorno, gli animali hanno sviluppato un edema piuttosto marcato, (rilevazione dello spessore > di un centimetro), insieme ad un aumento di volume del linfonodo inguinale ipsilaterale.

Dal sesto giorno PI, le pustole si sono diffuse lungo le linee di scarificazione di tutti gli animali e l'edema locale era aumentato (figura 5).

All'ottavo giorno PI, gli agnelli hanno mostrato croste già formate (figura 6) mentre nei capretti le pustole si sono diffuse alla lingua e al musello, ventre, inguine e arcata dentaria superiore. (Figure 7 e 8).

All'undicesimo giorno PI, tutti gli animali hanno mostrato croste formate e, da due capretti e un agnello, sono stati raccolti dei campioni crostosi che iniziavano a staccarsi e congelati a -80°C (figura 9). Al di sotto delle formazioni crostose è stato osservata la presenza di abbondante tessuto granulomatoso ipertrofico e sanguinante.

Tutte le croste sono state prelevate entro il diciannovesimo giorno PI e al ventesimo giorno lo spessore cutaneo delle aree scarificate è tornato ad essere nella norma in tutti gli animali (figure 10 e 11).

Lo spessore cutaneo nel corso dell'infezione ha raggiunto una media di 1,4 cm in tutti gli animali, fino ad un massimo di 2,4 cm in due soggetti (Tabella 1).

L'analisi statistica effettuata con metodo ANOVA, ha mostrato che non c'è stata differenza statisticamente significative nell'evoluzione delle lesioni tra i diversi

animali ( $P > 0.05$ ). Le lesioni, conseguenti all'infezione sperimentale, non hanno mostrato differenza significativa nemmeno dal punto di vista clinico in ovini e caprini, sia in termini di durata che di evoluzione dell'infezione. L'unica differenza riscontrata è stata una diffusione delle lesioni dall'area di infezione ad altre parti del corpo nelle capre, in particolare a livello labiale, gengivale o ventrale. L'infezione con PCPV 1303/05 non ha prodotto lesioni cliniche evidenti fatta eccezione per un leggero eritema ed edema totalmente scomparsi 7 giorni PI (tabella 2, figure 12,13 e 14). All'esame istologico, i campioni bioptici hanno mostrato un evidente stato infiammatorio e la presenza di corpi inclusi caratteristici dell'infezione da Parapoxvirus. L'analisi immunohistochimica ha confermato la presenza di particelle virali endocellulari 10 giorni PI nonostante, al momento del prelievo bioptico, non fossero presenti lesioni evidenti (figure 15 e 16). Gli stessi campioni bioptici sono risultati positivi in PCR quantitativa seppure con un esiguo numero di copie di DNA virale (tabella 3) confermando la presenza di DNA di PPV a livello endocellulare. La PCR eseguita per amplificare il gene dell'IL-10 ha dato risultato negativo confermando la presenza di DNA di PCPV a livello endocellulare. I campioni crostosi, raccolti nel sito di scarificazione del PCPV, sono risultati negativi sia in SYBR Green real time PCR che all'isolamento in coltura cellulare.

Le sequenze nucleotidiche delle ORF, localizzate nella porzione destra del genoma, sono state analizzate mediante PCR e sequenziamento a partire dai campioni crostosi derivati dall'infezione con OV dei capretti 497, 499, dell'ovino OV-F e dall'inoculo virale 987/04. L'allineamento e l'analisi delle sequenze hanno mostrato un'identità del 100% con le sequenze del ceppo OV IT987/04 utilizzato per l'infezione.

Per quanto riguarda le ORF 109 e 110 ortologhe alle A33R e A34R di VACV, è stato possibile amplificare questi geni da diversi ceppi di OV isolati da capre e pecore (Appendici I e II). L'analisi filogenetica eseguita sulle sequenze aminoacidiche ha dimostrato, per entrambe le proteine, la formazione di 2 raggruppamenti principali che non sono correlati né alla provenienza geografica né alla specie animale di origine dei ceppi virali (figure 17 e 18). Per quanto riguarda la percentuale di identità

tra le sequenze aminoacidiche codificate dall'ORF 109, questa varia da una completa identità (100%) tra il ceppo virale 613 e 987 fino ad un minimo del 50% tra i ceppi 987 e 613 e il ceppo 8L e tra il ceppo 613 e C2 (Figura19). Per quanto riguarda la percentuale di identità tra le sequenze aminoacidiche codificate dall'ORF 110, questa varia da un massimo di 100% tra i ceppi virali 613 e 987 ad un minimo di 43,6% tra NZ-2 ed il ceppo 613. L'analisi proteica ha evidenziato la presenza di motivi strutturali per gli MHC e per i linfociti T, la posizione e la numerosità di questi motivi contribuisce alla clusterizzazione delle varianti proteiche evidenziate dagli alberi filogenetici (Figura 20).



**Figura 1:** giorno dell'infezione sperimentale, sono ben visibili le linee di scarificazione nel piatto interno delle coscia del soggetto 499, infezione con orf virus a destra e con pseudocowpoxvirus a sinistra.



**Figura 2:** primo giorno post-infezione, evidente l'eritema



**Figura 3:** secondo giorno post-infezione, marcato edema ed eritema sulle linee di scarificazione con ORFV



**Figura 4:** quarto giorno post-infezione: edema marcato associato a lesioni pustolose a carico delle linee infette con orf virus



**Figura 5:** ottavo giorno post-infezione, formazione della crosta nera sulle linee infettate con orf virus nell'agnello OV-F



**Figura 6:** nono giorno post-infezione, le pustole si presentano asciutte nel soggetto 499



**Figura 7:** quattordicesimo giorno post-infezione, le lesioni al musello del soggetto 494



**Figura 8:** quattordicesimo giorno post-infezione, lesione a carico del labbro inferiore nel soggetto 494



**Figura 9:** quindicesimo giorno post-infezione, in OV-V la crosta si è staccata



**Figura 10:** quindicesimo giorno post-infezione, lesioni crostose in via di risoluzione



**Figura 11:** diciannovesimo giorno post-infezione, lesione crostosa quasi completamente risolta in un capretto



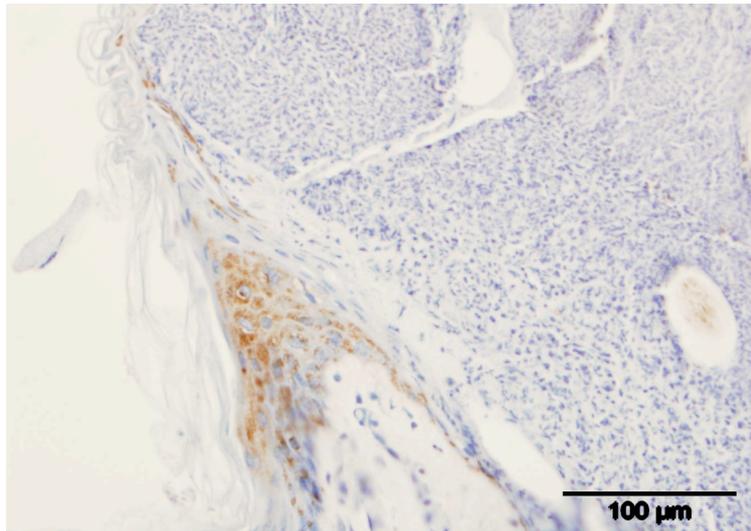
**Figura 12:** terzo giorno post-infezione, a livello della coscia sinistra infettata con PCPV del soggetto 491 visibile solo un leggero edema causato dalla scarificazione



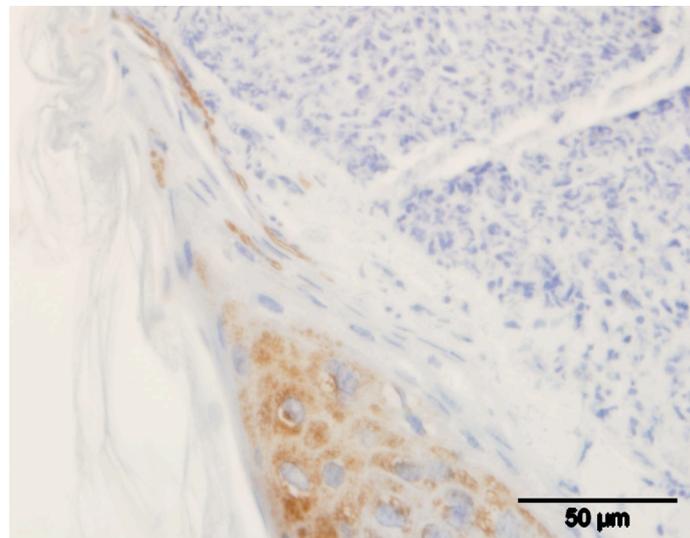
**Figura 13:** ottavo giorno post-infezione, a carico del piatto interno della coscia sinistra le linee infettate con PCPV si presentano prive di lesioni.



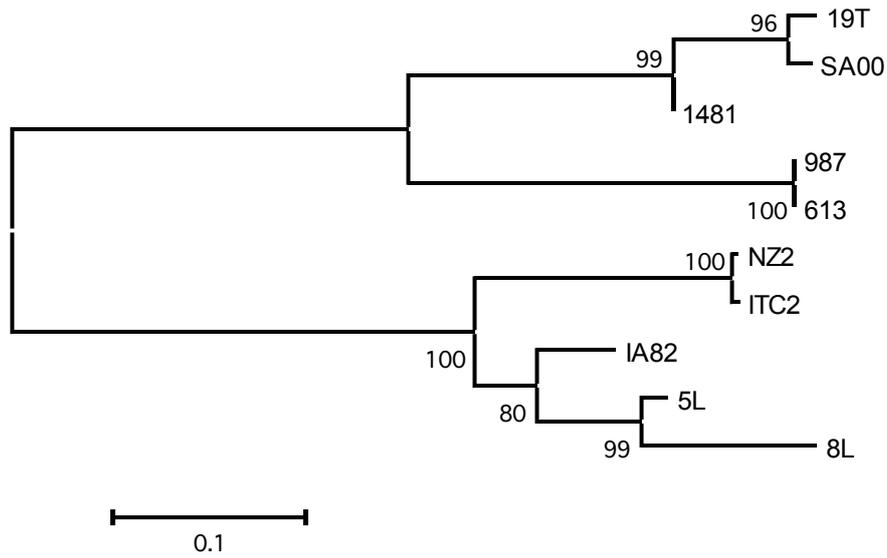
**Figura 14:** nono giorno post-infezione con PCPV: la cute è completamente integra



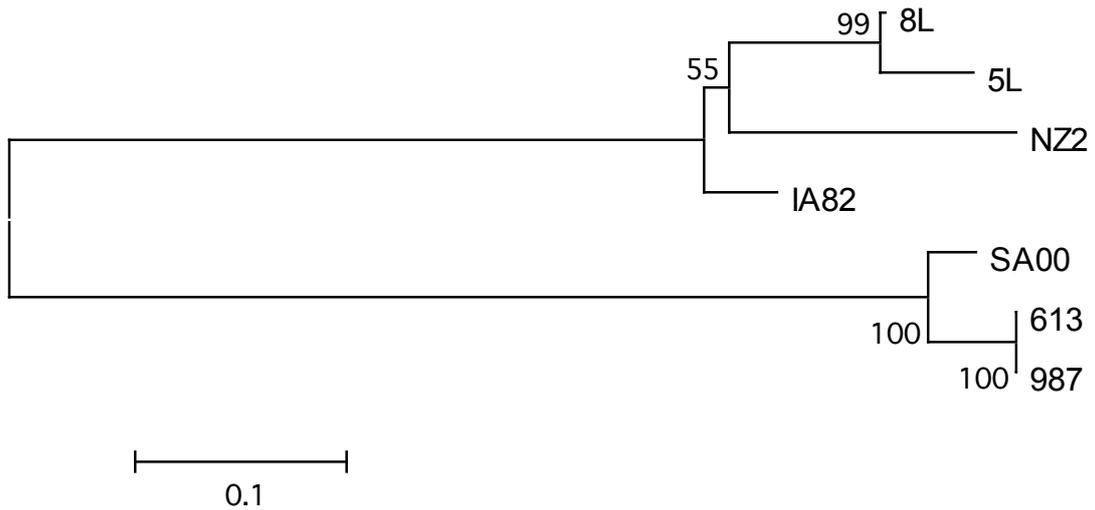
**Figura 15:** esame immunohistochimico del campione biptico (immagine al microscopio ottico, ingrandimento 20x). Si evidenzia la presenza del virus a livello citoplasmatico, marcato con anticorpo monoclonale 2E5.



**Figura 16:** esame immunohistochimico del campione biptico (immagine al microscopio ottico, ingrandimento 40x).



**Figura 17.** Albero filogenetico costruito sulla base delle sequenze amminoacidiche della proteina A33R



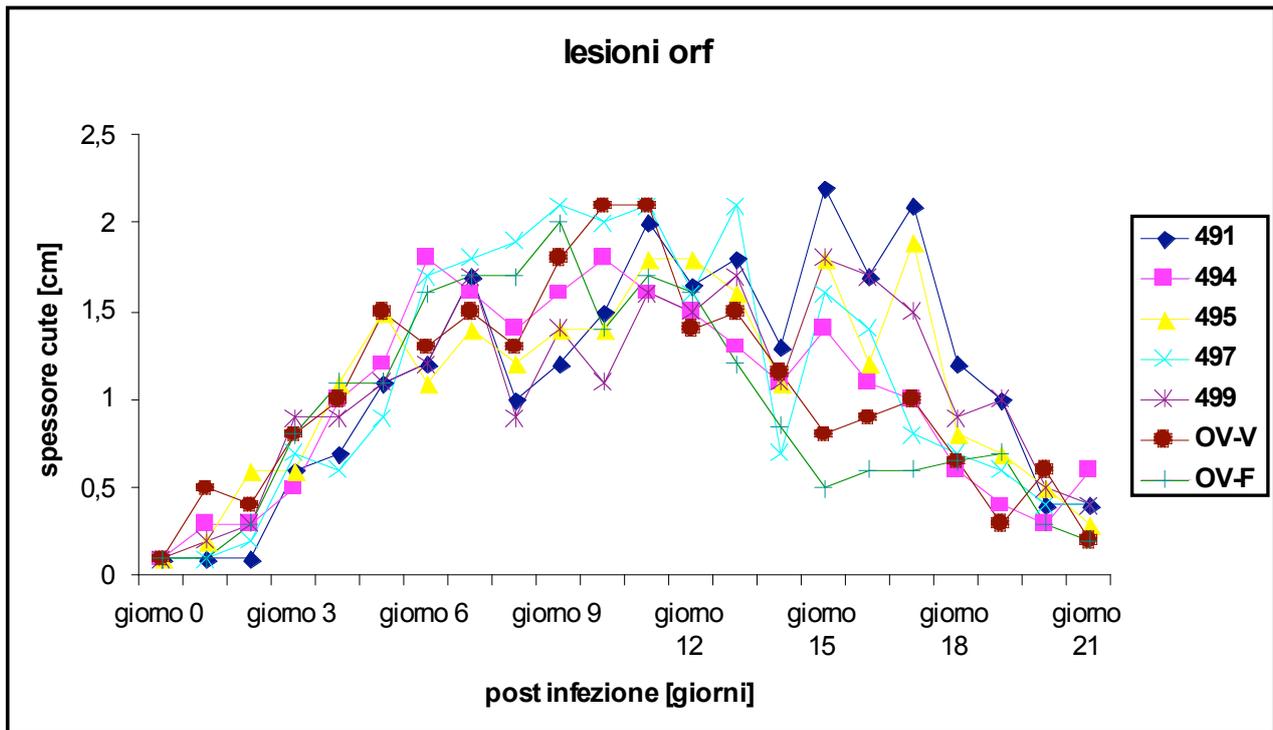
**Figura 18.** Albero filogenetico costruito sulla base delle sequenze amminoacidiche della proteina A34R

		Percent identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	█	56.2	53.8	96.9	70.0	55.0	70.0	52.5	91.9	51.2	<b>1</b>	19T
	2	62.4	█	80.0	55.6	55.6	88.1	55.6	78.8	60.0	83.8	<b>2</b>	IA82
	3	67.7	21.2	█	53.1	51.2	78.8	51.2	96.2	57.5	73.8	<b>3</b>	NZ2
	4	3.3	63.9	69.2	█	69.4	54.4	69.4	51.9	95.0	50.6	<b>4</b>	SA00
	5	36.3	64.5	74.7	37.3	█	53.1	100.0	50.0	69.4	50.0	<b>5</b>	987
	6	66.2	12.8	23.7	67.7	71.5	█	53.1	78.1	58.8	90.6	<b>6</b>	5L
	7	36.3	64.5	74.7	37.3	0.0	71.5	█	50.0	69.4	50.0	<b>7</b>	613
	8	70.9	21.9	0.7	72.4	78.1	23.5	78.1	█	56.2	73.1	<b>8</b>	ITC2
	9	8.2	55.5	60.4	4.7	38.4	59.0	38.4	63.4	█	55.0	<b>9</b>	1481
	10	75.6	18.5	31.2	77.3	79.9	10.5	79.9	30.9	67.7	█	<b>10</b>	8L
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

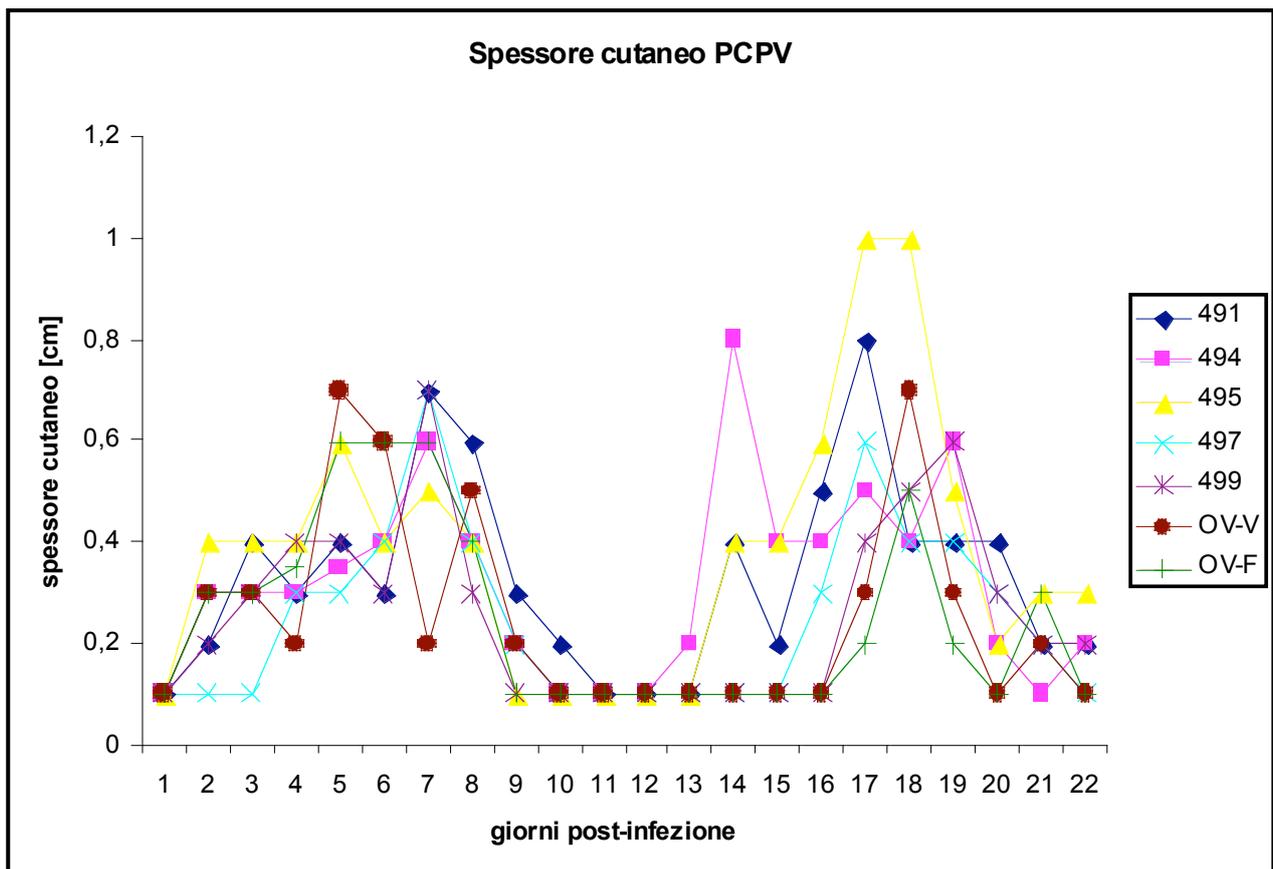
FIGURA 19. Identità amminoacidiche della proteina A33R fra i ceppi di OV

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1	█	84.0	44.2	43.6	43.6	81.4	79.5	<b>1</b>	NZ2
	2	18.3	█	48.1	47.4	47.4	89.1	85.3	<b>2</b>	IA82
	3	97.0	85.2	█	92.3	92.3	46.2	44.9	<b>3</b>	SA00
	4	99.1	87.1	6.8	█	100.0	45.5	44.2	<b>4</b>	613
	5	99.1	87.1	6.8	0.0	█	45.5	44.2	<b>5</b>	987
	6	21.7	12.0	90.9	92.9	92.9	█	95.5	<b>6</b>	8L
	7	24.4	16.7	94.9	97.0	97.0	4.7	█	<b>7</b>	5L
		1	2	3	4	5	6	7		

FIGURA 20. Identità amminoacidiche della proteina A34R fra i ceppi di OV



**Tabella 1:** andamento dello spessore cutaneo misurato con cutimetro delle linee di scarificazione infettate con orf virus



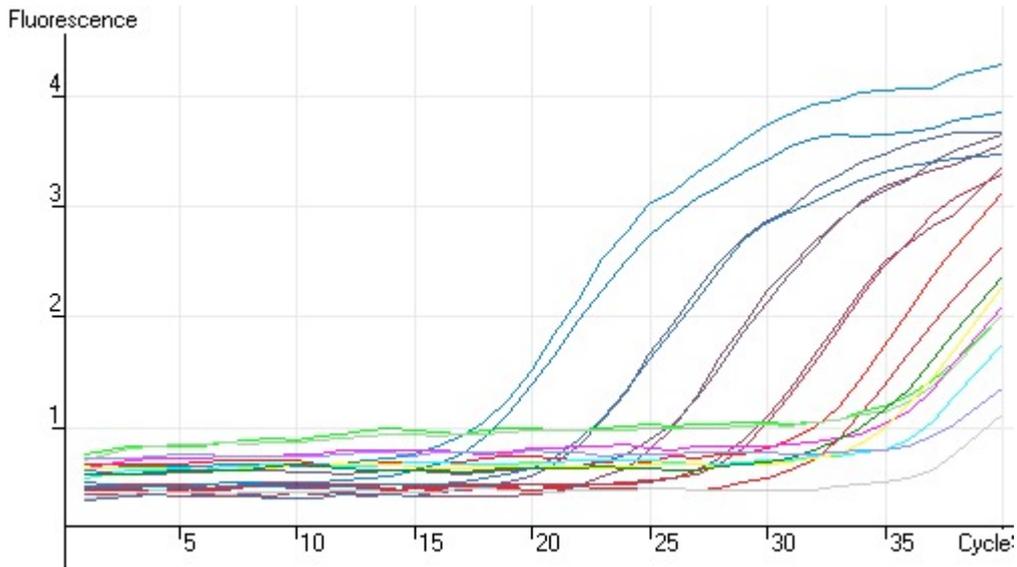
**Tabella 2:** andamento dello spessore cutaneo misurato con cutimetro a livello delle linee di scarificazione infettate con PCPV

Threshold	0,03108
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,270*CT + 9,430)}$
Standard Curve (2)	CT = $-3,701*\log(\text{conc}) + 34,903$
Reaction efficiency (*)	0,86287 (* = $10^{(-1/m)} - 1$ )
M	-3,70121
B	34,90346
R Value	0,99809
R^2 Value	0,99618
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
No Template Control Threshold	19%
Sample Page	Page 1

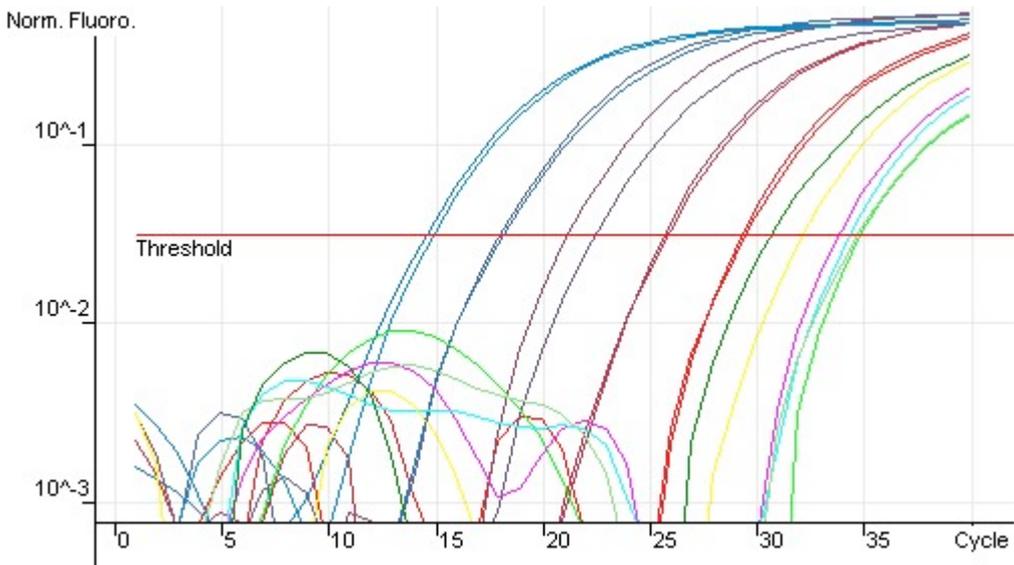
## Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 90°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 20 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr)
Melt (72-95°C) , hold 45 secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A(FAM/Sybr)	

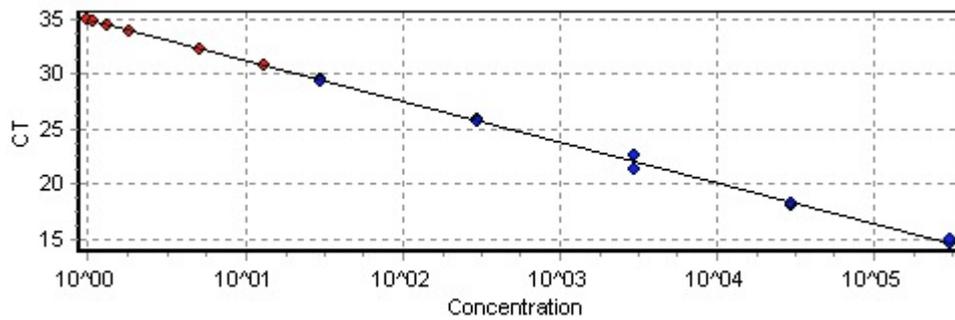
## Raw Data For Cycling A.FAM/Sybr



**Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr**



**Standard Curve**



No.	Colour	Name	Ct	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)	Rep. Ct
1	Orange	plasmide 1	29,56	3,00E+01	2,78E+01	29,47
2	Red	plasmide 1	29,37	3,00E+01	3,12E+01	
3	Dark Red	plasmide2	25,92	3,00E+02	2,68E+02	25,83

No.	Colour	Name	Ct	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)	Rep. Ct
4		plasmide2	25,74	3,00E+02	2,99E+02	
5		plasmide3	21,26	3,00E+03	4,85E+03	21,90
6		plasmide3	22,54	3,00E+03	2,19E+03	
7		plasmide4	18,12	3,00E+04	3,43E+04	18,19
8		plasmide4	18,27	3,00E+04	3,12E+04	
9		plasmide5	14,62	3,00E+05	3,03E+05	14,78
10		plasmide5	14,94	3,00E+05	2,47E+05	
11		491	34,92		9,89E-01	34,92
12		494	33,91		1,86E+00	33,91
13		495	34,45		1,32E+00	34,45
14		497	34,79		1,07E+00	34,79
15		499	32,26		5,18E+00	32,26
16		OV-F	30,75		1,33E+01	30,75
17		OV-V				
18		bianco				

**Tabella 3:** risultati real time PCR



## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Questo studio ha avuto come obiettivo quello di chiarire alcuni aspetti della patogenesi e dell'interazione tra il virus e l'ospite attraverso lo studio funzionale di 3 proteine dell'envelope virale.

Il nostro gruppo di ricerca ha contribuito già in passato agli studi sul ruolo della proteina immunodominante F1L presente sull'envelope degli IMV. Per chiarire il ruolo di questa proteina nel ciclo virale è stato prodotto un virus delecto del gene codificante. La proteina F1L contribuisce al processo di adesione del virus alla cellula mediante il suo legame con i glicosaminoglicani presenti sulla superficie cellulare (Scagliarini *et al.* 2004). In assenza della proteina questa interazione viene ad essere ridotta sfavorendo l'adsorbimento e l'infezione dei virus delecto rispetto al virus wild type. D'altra parte la non totale inibizione della crescita in coltura del virus wild type dopo trattamento della miscela di transfezione con anticorpo monoclonale 4D9 suggeriscono la presenza di altre proteine virali in grado di mediare l'adsorbimento e la penetrazione del virus nelle cellule, come ad esempio la proteina 10 Kd omologa alla A27 L del VACV (Spehner *et al.* 2004).

La delezione del gene F1L ha inoltre impedito la formazione di placche d'infezione in coltura cellulare sostituite da foci di cellule infette distribuiti su tutto il monostrato, facendo ipotizzare che i virioni delecti possano passare da cellula a cellula senza provocare lisi cellulare.

Il virus inoltre ha dimostrato una velocità di crescita inferiore rispetto al virus wild type infatti, l'aggiunta di X-Gluc alle cellule infette 2 o 3 giorni PI non ha prodotto colorazione blu nonostante la presenza di CPE indicando una scarsa replicazione dei virioni delecti nei primi giorni d'infezione. Inoltre la maggior velocità di replicazione del virus wild type non ha permesso di protrarre l'infezione in coltura oltre i cinque giorni impedendo così di aumentare il titolo virale del virus delecto per i successivi passaggi di purificazione. Tutte queste osservazioni fanno ipotizzare che la proteina F1L abbia un ruolo anche nel rilascio e nella diffusione dei virioni infetti. L'infezione di monostrati di PLKs con il surnatante cellulare della transfezione non ha infatti

permesso la produzione di cellule blu determinate dalla presenza di virioni deleti. La proteina F1L infatti, potrebbe mediare l'assemblaggio dei virioni come l'omologa proteina del VACV H3L (Lin *et al.* 2000), e un'alterata formazione potrebbe influire anche sul rilascio degli stessi.

L'osservazione al microscopio elettronico del virus delecto, raccolto da lisati cellulari infetti, suggerisce un importante ruolo della proteina F1L nella morfogenesi e nella struttura del virione, la sua delezione infatti, provoca un'alterata morfologia delle particelle virali intracellulari. La microscopia elettronica ha evidenziato una maggior quantità di particelle M rispetto alle C, ma i filamenti di superficie sono risultati più sottili e arrangiati in maniera disordinata rispetto a quelli del virus wild type (WT). A differenza di quanto osservato in seguito alla delezione del gene della proteina omologa alla A27L di VACV, non si osservano loop-structures appese alla superficie virale dimostrando ulteriormente che l'attività di sealing del tubulo superficiale dipende da quest'ultima proteina, mentre F1L costituirebbe l'unità globulare fondamentale del tubulo. Inoltre i virioni deleti della proteina F1L sono più piccoli e rotondeggianti rispetto al virus WT, sembra quindi che questa proteina sia importante nel conferire rigidità e forma al virione e che i virus deleti presentino una struttura superficiale più lassa. La minore infettività dell'OV delecto, rispetto al wild type, potrebbe essere dovuta anche alla differente struttura del virione tanto da rendere meno efficace il processo di adsorbimento virale. In conclusione l'assenza della proteina F1L interferisce con la maturazione dei virioni alterandone la tipica morfologia e riducendo l'infettività di questi ultimi.

Allo scopo di approfondire alcuni aspetti del genoma virale in grado di determinare la specie-specificità dei ceppi e la patogenesi delle infezioni è stata realizzata una infezione sperimentale su ovini e capre.

Nella specie caprina sono frequenti le segnalazioni di infezioni "maligne" da OV (Guo *et al.* 2003) ma non è ancora chiaro se questi focolai siano dovuti a una particolare virulenza dei ceppi virali o a fattori legati alla specie ospite. I risultati del nostro studio dimostrano che il ceppo di OV di origine ovina isolato da un focolaio di

estima maligno, non ha provocato lesioni “maligne” nè nelle capre nè nelle pecore. Questo risultato conferma, anche per la specie caprina, quanto precedentemente riportato (Scagliarini *et al.* 2005; Guo *et al.* 2004), sull’origine delle forme maligne negli ovini che non sarebbero il risultato di infezioni da parte di ceppi ipervirulenti ma potrebbero essere provocate da fattori legati all’ospite, quali la risposta immunitaria. L’analisi delle sequenze ha dimostrato una completa identità con il ceppo utilizzato per l’infezione suggerendo che la specie caprina non è in grado di determinare alcuna mutazione genomica nella progenie virale. Analisi filogenetiche svolte su ceppi virali isolati da capre hanno dimostrato che tali ceppi sono per la maggior parte portatori della variante NZ-7 del gene VEGF. E’ stato ipotizzato che la variante NZ-7 di orf virus possa essere il prodotto di una ricombinazione naturale tra i ceppi di OV e PCPV (Ueda *et al.* 2003). Durante la replicazione dei poxvirus le ricombinazioni sono un evento piuttosto frequente ed è la stessa DNA polimerasi virale a mediare questo fenomeno. La comparazione genomica di diversi poxvirus ha rivelato che gli eventi di ricombinazione sono più frequenti nell’estremità destra del genoma (Da Silva e Upton 2005), questa regione è la più variabile nei PPV, è possibile quindi che questa variabilità sia da ricercarsi in possibili eventi di ricombinazione. In questa regione sono localizzate sequenze codificanti ricche in AT, che vengono considerate le regioni acquisite più recentemente dal genoma delle cellule ospiti o di altri virus co-infettanti (Mercer *et al.* 2005; Da Silva e Upton 2005). Fenomeni di ricombinazione genomica naturale tra specie diverse di Parapoxvirus non sono mai stati descritti e per poter avvenire necessitano di specie animali permissive che garantiscano un buon successo replicativo per le specie virali co-infettanti. Solo la renna (*Rangifer tarandus*) ed il dromedario (*Camelus dromedarius*) si sono dimostrati naturalmente recettivi sia per OV che per PCPV (Tikkanen *et al.* 2004; Abubakr *et al.* 2007). Al fine di verificare se la specie caprina possa rappresentare un substrato naturale permissivo per le ricombinazioni tra specie diverse di PPV è stata effettuata una infezione sperimentale utilizzando un ceppo di OV e un ceppo di PCPV. Questa sperimentazione rappresenta il primo tentativo

d'infezione con PCPV negli ovi-caprini il ceppo di PCPV da noi utilizzato si era già dimostrato in grado di replicare su substrati cellulari di origine ovina e caprina (PLK e PKK). La prova *in vivo* ha confermato la capacità del virus di penetrare nelle cellule, senza dare luogo a replicazione, come dimostrato dall'assenza di lesioni cliniche evidenti e di particelle virali nei campioni crostosi. Questi risultati confermano ciò che è stato già indicato per altri poxvirus. Questi virus aderiscono e penetrano sia in cellule permissive che non ma, i meccanismi intracellulari che s'instaurano in seguito alla penetrazione del virus, come ad esempio la capacità di inibire i meccanismi antivirali attraverso l'apoptosi e la produzione d'interferone, possono impedire la replicazione virale in maniera specifica in ospiti non permissivi (Mcfadden 2005). I nostri risultati sembrano quindi escludere la possibilità che eventi di ricombinazione tra OV e PCPV possano avvenire durante l'infezione naturale nelle capre. L'origine delle varianti NZ-7, isolate dalla specie caprina, potrebbe invece essere ricercata in specie animali selvatiche o semi-addomesticate con le quali le capre possono condividere l'ambiente.

Allo scopo di verificare quanto ipotizzato da diversi Autori (Delhon *et al.* 2004; Fleming e Mercer. 2007) relativamente alla possibilità che i domini funzionali delle proteine presenti sull'envelope degli EEV codificate dagli ORF 109 e 110 ed ortologhe alle proteine A33R e A34R, possano determinare la specie specificità dei ceppi virali, è stata eseguita una analisi filogenetica delle sequenze aminoacidiche di isolati virali isolati da ovini e caprini. I nostri risultati smentiscono tale ipotesi non essendo possibile ottenere una clusterizzazione sulla base della specie ospite colpita e nemmeno su base geografica. Per entrambe le sequenze aminoacidiche è invece possibile osservare un raggruppamento piuttosto evidente determinato da diverse varianti antigeniche delle proteine a sottolineare il ruolo nella stimolazione della risposta immunitaria da parte delle stesse. Questi particolari raggruppamenti determinati dalla variabilità antigenica delle proteine di superficie potrebbero confermare l'ipotesi di Mercer *et al.* 2005 in base alla quale la variabilità riscontrata in taluni isolati di orf virus potrebbe testimoniare l'esistenza di "escape mutants" in

grado di possedere un vantaggio selettivo rispetto ad altri ceppi virali nella re-infezione.

Le conoscenze relative al genoma dei PPVs derivano essenzialmente da studi effettuati su un numero esiguo di ceppi di riferimento e dalle analogie riscontrate con il più conosciuto tra i poxvirus il VACV. Tali conoscenze risultano fondamentali alla luce del fatto che i PPVs rappresentano possibili candidati, alternativi al VACV, per un utilizzo come vettori virali per la produzione di vaccini ricombinanti e presidi di terapia genica. A questo scopo è necessario accrescere le conoscenze relative agli eventi correlati al ciclo replicativo e alla funzione di diverse proteine virali.

I risultati dello studio sul mutante deleto del gene F1L definiscono l'esatto ruolo della proteina immunodominante nella morfogenesi del virus orf, mentre i dati raccolti in seguito all'infezione sperimentale nelle capre chiariscono alcuni aspetti della patogenesi e dell'interazione virus-ospite. Infine, l'analisi delle proteine codificate dagli ORF 109 e 110, identificate solo di recente nel genoma dei PPVs, suggerisce un possibile ruolo nella stimolazione della risposta immunitaria dell'ospite mettendo in discussione la loro implicazione nella definizione della specie-specificità dei virus. Questi risultati, derivati dallo studio di un numero cospicuo di ceppi virali isolati da infezioni naturali, sottolineano l'importanza di integrare gli studi genomici, già effettuati sui ceppi di riferimento, per derivarne informazioni più accurate.



## **APPENDICI**



# APPENDICE I

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
19T : MAHNTFNDSESAANNANYVASVKRQKAIIRRYIKLFFRIVAAIAIIVLAILVVLLALELDRCKEKEQSTH-QDYHHTTNKTCDEGLFPEN-K : 86
IA82 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVILSLSLDBCLHREHP-HDYSHVQNSTCGIPLG--D : 84
NZ2 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVILSLSLDBCLHREHP-HDYSHVQNSTCGITLGG-E : 86
SA00 : MAHNTFNDSESAANNANYVASVKRQKAIIRRYIKLFFRIVAAIAIIVLAILVVLLALELDRCKEKEQSTH-QDYHHTTNKTCDEGLFPEN-K : 86
987 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKTIIRRYIKMFFRFVAAIAIIVLAILVVLLALELDRCKQESAH-T--HYTTNRTCEGLAPDN-K : 83
5L : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVILSLSLDRCKLHKEHS-HDYSHVQNSTCGITLGG--D : 84
613 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKTIIRRYIKMFFRFVAAIAIIVLAILVVLLALELDRCKQESAH-T--HYTTNRTCEGLAPDN-K : 83
ITC2 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVILSLSLDBCLHREHPHPPHYSHVQNSTCGITLGGGE : 87
1481 : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVLLALELDRCKEKEQSTH-QDYHHTTNKTCDEGLFPEN-K : 85
8L : MAHNTFNDSESAANN-QYVASVKRQKMIIRRYIKMFFRFVTAIAIIVLAILVVILSLSLDRCKLHKKHP-HDYSHVQNSTCGIPLG--D : 84
      MAHNTFe DSE3 ANN qYVASVKRQK IRRYIK6FFR 6 AIAIIVLAILVV6L L LD C dy h N TC g6

      *           100           *           120           *           140           *           160
19T : WCLLKFDEFTTINQARSMCTGIGQTLPSKEDIVRYLPWLKGYLTGTWSDAK-GGVFSGSGSTSEVWWSGASEQEK : 156
IA82 : KCLRLNLEPATMEDANQMCNLCFSLPSKGLLR-TPWLDYLDGTWGNKLGNVFQPTGELEQVMGQ-HETRK : 153
NZ2 : KCLRLNLEPATMEDANROCGNLGFYLPSTGLEKFPWLVTYLDGTWGNLQNSVFGPTGDLQNVIG--PKEYK : 155
SA00 : WCLLKFDEFTLROAKSMCTGIGQTLPSKEDIVLYPWLKGYLTGTWSDK-GGVFSGSGSTSEVWWSGASEQEK : 156
987 : WCLLKRYEFTTDAANSICSSIGQTLPSKDTVNTYPWLEQYLTGTWASKKGEVFKSLGETAKIWNAGAGAANR : 154
5L : KCLTENTPSTMEDANQMCNLCFSLPSKGLFRGNHLLTTFDGTWGNKLSNVFGPTGDLQFVMGP-QETRK : 154
613 : WCLLKRYEFTTDAANSICSSIGQTLPSKDTVNTYPWLEQYLTGTWASKKGEVFKSLGETAKIWNAGAGAANR : 154
ITC2 : KCLRLNLEPATMEDANROCGNLGFYLPSTGLEKFPWLVTYLDGTWGNLQNSVFGPTGDLQNVIGGPKKEYK : 158
1481 : WCLLKFDEFTLROAKSMCTGIGQTLPSKEDIVLYPWLKGYLTGTWSDK-GGVFSGSGSTSEVWWSGASEQEK : 155
8L : KCLTENTPSTMEDANKRCSILCFSLPSKGLFRGNHLLTTFDGTWENQLKNVFGPTGDLQFVMGP-HETRK : 154
      CLt P Tw A C 6G LPS k pWL yl GTW VFG G 6 4

```

Allineamento delle sequenze amminoacidiche della proteina A33R degli isolati virali sequenziati



## APPENDICE II

```

*          20          *          40          *          60          *          80
N22 : IRTLKKA SCPVASLV TILSLV TSLGAI VRYTNE FLKEAC DEGWMP IKNIC I LNTHE FEATND DAHRI CENLDG KPPAT I PNPTLL KGVTVL : 89
IA82 : IRTLKRV SCPVASLV TILSLA TSLCAI VRYTNE FLKEAC DEGWMP IKDICI LNTHE KATKDD AHRI CESLDG NPPAT I PNPTLL KGVTVL : 89
SA00 : LLTLKRA SCPVASLV SVL SVFTSIC AIKYTD LFLKEAC ENDWVPI KDL CVYNTQVIT NVTLARDI CASMDS DLPAI PD TMFLR GIMFI : 89
613 : LLTLKRA SCPVASLV SVL SVFTSIC AIKYTD LFLKEAC ENDWVPI KDL CVYNTQVMT NLT LAKDI CASMDS DLPAI PD TMFLR GIMFI : 89
987 : LLTLKRA SCPVASLV SVL SVFTSIC AIKYTD LFLKEAC ENDWVPI KDL CVYNTQVMT NLT LAKDI CASMDS DLPAI PD TMFLR GIMFI : 89
8L : VRTLKKA SCPVATLV TILSLI TSLGAI VRYTKI FMKEAC DEGWMP IREVCI LNTHE KATED DAHRI CESLDG NPPAT I PNPTLL KGVTVL : 89
5L : VRTLKKA SCPVATLV TILSLI TSLGAI VRYTKI FMKEAC DEGWMP IREVCI LNTHE KATED DAHRI CENLDG HPPAT I PNPTLL KGVTVL : 89
6 TLK4aSCPVA3LV36LS6 TS6 AI64YT F6KEAC W6PIK 6C6 NT A IC 6D PA P1 L4G6m 6

*          100          *          120          *          140          *
N22 : TGEKKF WMTTHH EDYTTVE EHIDD-RTT PKNT-DYDSK KHTCLM SEDGLIHHNCMMNVT VVCKE M HG : 154
IA82 : TGERQF WMTTHH PDYTSVY EHN EK-LQI PKNT-KYDKDR HICLM SEDGLIHHNCMMNVT VVCKE M HG : 154
SA00 : VEATSF WMTTHH DAYKNVYLP KRGSHTGAYV-EYDKD THVCLINLQGLMH HDCNONTT VVCKE M YN : 155
613 : VEATSF WMTTHH DAYRNVYLP KRGSHTGAYV-EYDKD THVCLINLQGLMH HDCNONTT VVCKE M YN : 155
987 : VEATSF WMTTHH DAYRNVYLP KRGSHTGAYV-EYDKD THVCLINLQGLMH HDCNONTT VVCKE M YN : 155
8L : TGERQF WMTTHH PDYTSVY EHN EN-WQI PKNT-KYDKDK HTCLM SEDGLIHHNCMLNVT VVCKE M HG : 154
5L : TGERQF WMTTHH PDYTSVY EHN EN-WQI PKNT-KYDKDK HTCLM SEDGLIHHNCMLNVT VVCR KKTCTD : 154
FWMTHH Y V5 Y1kd H CL6 GL6HH1C N TVVC K m

```

Allineamento delle sequenze amminoacidiche della proteina A34R degli isolati virali sequenziati



## BIBLIOGRAFIA

- Abu Elzein e Hosawi, (1997), Severe long lasting contagious Ectyima infection in goat 's kid. *Journal of Veterinary Medicine*, 64: 61-62.
- Abubakr M.I., Abu-Elzein E.M., Housawi F.M., Abdelrahman A.O., Fadlallah M.E., Naiel M.N., Adam A.S., Moss S., Forrester N.L., Coloyanna E., Gameel A., Al-Afaleq A.I., Gould E.A., (2007) Pseudocowpox virus: the etiological agent of contagious ecthyma (Auzdyk) in camels (*Camelus dromedarius*) in the Arabian peninsula. *Vector borne Zoonotic Disease*. 7(2): 257-260.
- 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. *Journal of Virology*. 79: 966-977.
- Agger W.A. and Webster S.B., (1983). Human orf infection complicated by erythema multiforme. *Cutis*. 31(3): 334-338.
- Amichai, B.; Marcelo, H.; Abraham, A.; Halevy, S.. (1993). Tense Bullous Lesions on Fingers. *Archive of Dermatology*. 129 (8): 1043-1046.
- Appleyard G., Andrews C., (1974), Neutralizing activities of antisera to poxvirus soluble antigens. *Journal of General Virology*. 23: 197-200.
- 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.
- Azwai S.M., Carter S.D., Woldehiwet Z. (1995). Immune responses of camel (*Camelus domedarius*) to contagious ecthyma (Orf) virus infection. *Veterinary Microbiology*. 47: 119-131.
- Balassu T.C. and 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.
- Baldick C.J.Jr, Keck J.G., Moss B. (1992). Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate class-promoters. *Jorurnal of Virology*. 66(8):4710-4719.
- Baldick C.J. Jr.; Moss B. (1993). Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermadiate-stage genes. *Journal of Virology*. 67(6):3515-3527.
- Becher P., Konig M., Muller G., Siebert U., Thiel H.J. (2002). Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Archives of Virology*, 147: 1133-1140.

- Bhandari D.G., Levine B.A., Trayer I.P., Teaton M.E. (1986). <sup>1</sup>H-NMR study of mobility and conformational constraints within the proline-rich-N-terminal of the LC1 alkali light chain of skeletal myosin. Correlation with similar segments in other protein systems. *European Journal of Biochemistry* Oct 15;160(2):349-356.
- Bodnar M.J., Miller F., Tyler W.B. (1999). Facial Orf. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40: 815-817.
- Brendel V., Bucher P., Nourabakhsh I., Blaisdell B.E., Karlin S. (1993). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 89: 2002-2006.
- Brisebarre, A. (1996). Tradition and modernity: French Shepherd's use of Medicinal Bouquet cited in: Van Asseldonk, T. and Beijer, H. (2006). Herbal folk remedies for animal health in the Netherlands. *Proceedings of the IV<sup>th</sup> International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*, 257-263.
- Buchan J. (1996). Characteristic of orf in a farming community in mid-Wales. *British Medical Journal*. 313: 203-204.
- Buddle B.M., Dellers R.W., Schurig G.G. (1984). Heterogeneity of Contagious Ectyima isolates. *American Journal of Veterinary Research*, 45(1): 75-79.
- Buddle B.M., Pulford H.D. (1984). Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ectyima virus. *Veterinary Microbiology*, 9: 515-522.
- Buttner M, von Einem C., McInnes C., Oksanen A. (1995). Clinical findings and diagnosis of a severe parapoxvirus epidemic in Finnish reindeer. *Tierarztl Prax* 23:614-618
- Buttner M., Rziha H.J. (2002). Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *Journal of Veterinary Medicine*, 49: 7-16
- Chang W., Hsiao J.C., Chung C. S. and Bair C.H. (1995). Isolation of monoclonal antibody which blocks vaccinia virus infection. *Journal of Virology*. 69: 517-522.
- Clark C., McIntyre P.G., Evans A., McInnes C.J., and Lewis-Jones S., (2005), Human sealpox resulting from a seal bite : confirmation that sealpox virus is zoonotic. *British Journal of Dermatology*. 152: 791-793.
- Cottone R., Buttner M., McInnes C.J., Wood A.R., Rziha H.J. (2002). Orf virus encodes a functional dUTPase gene. *Journal of General Virology*. 83: 1043-1048.
- Cottone R., Buttner 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 Research*. 56: 53-67.

- Crumbie A. (1998). The Orf virus: a disease of the farming community. *Community nurse*. 6: 44-45.
- Czerny C.P., Waldmann R., Scheubeck T. (1997). Identification of three distinct antigenic sites in parapoxvirus. *Archives of Virology*. 142: 807-821.
- Da Silva M., Upton C. (2005). Host-derived pathogenicity islands in poxviruses. *Virology Journal*. 2 (30): 1-11
- 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(12):4843-52.
- Dashtseren T., Solovjev B.V., Varejka F., Khokhoo A. (1984). Camel contagious ecthyma (pustular dermatitis). *Acta Virologica*. 28: 122-127.
- Davidson A.J. and Moss B. (1989) The structure of vaccinia virus late promoters. *Journal of Molecular biology*. 210: 749-784.
- De Clercq E. (2003). Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert review antiviral infectious therapy*. 1(1): 21-43.
- 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. *Journal of Virology*. 74: 1313-1320.
- Degraeve C., De Coninck A., Senneseael J., Roseeuw D. (1999). Recurrent contagious ecthyma (Orf) in an immunocompromised host successfully treated with cryotherapy. *Dermatology*. 298:162-163.
- 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. *Journal of Virology*. 78: 168-177.
- de la Concha-Bermejillo A., Guo Z., Zhang Z., Waldron D. (2003). Severe persistent orf in young goat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 15: 423-443.
- Duprè A., Christol B., Lassere J., (1981), Atopic dermatitis and poxvirus superinfections. *Annual of dermatology and Venereology*. 108(11): 829-834.
- Ferrando M.F., Leaute-Labreze C., Fleury H., Taieb A. (1997). Orf and erythema multiforme in a child. *Pediatric Dermatology*. 14(2): 154-155
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-789.

- Felsestein J. (2001). PHYLIPS: phylogenetic interference Package 3.6 (alpha3). *Distributed by the Author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, W.A.*
- 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., Lyttle D.J., Sullivan T.J., Mercer A.A., Robinson A.J. (1995). Genomic analysis of transposition-deletion variant of orf reveals a 3.3 kb region of non-essential DNA. *Journal of General Virology*. 76: 2969-2978.
- 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. *Journal of Virology*. 71: 4857-4861.
- Fleming S.B and Mercer A.A. (2007). Genus *Parapoxvirus*. In AA. Mercer, Schmidt and Weber editors: Poxviruses. Birkhäuser Basel *press*. 127-165.
- Gallina L., Galligioni V., Prospero S., Scagliarini A. (2007). Inattivazione per contatto di Parapoxvirus: metodi per il campionamento e la valutazione della carica virale. *II Workshop nazionale di Virologia Veterinaria*, Bologna, 7-8 Giugno.
- Gallina L, Scagliarini A, Ciulli S, Prospero S.(2004). Cloning and expression of the Orf virus F1L gene: possible use as a subunit vaccine. *Veterinary Research Communication*. 28(1):291-3.
- Gallina L, Dal Pozzo F, Mc Innes CJ, Cardeti G, Guercio A, Battilani M, CiulliS, Scagliarini A.(2006). A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *Journal of Virological Methods*. 134:140-5.
- Gassmann U., Wyler R., Wittek R. (1985). Analysis of Parapoxvirus genomes. *Archives of 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. *Journal of Medicine Virology*. 64: 543-549.
- Geerlings, E. (2001). Sheep husbandry and Ethoveterinary knowledge of Raika sheep pastoralis in Rajasthan, India. Animal Production Systems, Wageningen University, Deventer, The Netherlands.
- 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.
- Gitao C.G. (1994). Outbreaks of contagious ecthyma in camels (*Camelus dromedarius*) in the Turkana district of Kenya. *Review in Science Technology*. 13: 939-945.
- 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.
- Graham-Bonnalie, F.E. (1951). Treatment of Orf. *Br. Med. J.* 2: 1256.
- 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. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 137: 404-410.
- Groves R.W., Wilson-Jones E., MacDonald D.M. (1991). Human orf and milkers' nodule: a clinicopathologic study. *Journal of American Academy of Dermatology*. 25: 706-711.
- Grünewald K., Cyrklaff M., (2006). Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryotomography. *Current Opinion in Microbiology*. 9:437-442.
- 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. *Journal of Dermatology*. 32: 306-308.
- Guarda F. (1959). Contributo allo studio anatomo-istopatologico dell'ectima contagioso dei camosci e stambecchi. In: *Torino: Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*. 1959 pag. 18.
- Gubser C., Hue S., Kellman P., Smith G.L., (2003). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*. 85: 105-117.
- 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.
- 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.
- Guo J., Rasmussen J., Wunschmann A., de la Concha-Bermejillo A. (2004). Genetic characterization of a orf virus isolated from various ruminant species of a zoo. *Veterinary Microbiology*. 99: 81-92.
  - Gurel M.S., Ozardali I., Bitiren M., San I., Zeren H. (2002). Giant orf on the nose. *European Journal of Dermatology*. 12(2):183-5.
  - Haig D.M., Mercer A.A. (1998). Orf. *Veterinary Research*. 29 :311-326.
  - Haig D.M., Thomson J, McInnes C., McCaughan C., Imlach W., Mercer A., Fleming S. (2002). Hosti virus immunomodulation end host immuno response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87:395-399.
  - 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.
  - Hansen E., Nyfors A., Naess A., Sjiursen H. (1984). Erythema multiforme major (Stevens-Johnson syndrome) caused by orf virus infection. *Tidsskrift for den Norske laegeforening*. 104: 978-979
  - Hartung J. (1980). Contagious ecthyma of sheep (cases in man, dog, alpaca and camel). *Tieraerztl Prax*. 8:435-438.
  - Hiramatsu Y., Uno F., Yoshida M., Hatano Y. And Nii S. (1999). Poxvirus virion: their surface ultrastructure and interaction with the surface membrane of host cells. *Journal of Electron microscopy*. 48(6): 937-946.
  - 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.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 Thechnique. *Journal of Comparative Patology*. 106: 2,153-158
  - Housawi F.M.T., Roberts G.M., Gilray J.A., Pow I., Reid H.W., Nettleton P.F., Sumption K.J., Hibma M.H., Mercer A.A. (1998). The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominante proten. *Archives of Virology*. 143: 2289-2303.
  - Huskaar, S. (1986). Giant orf in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Dermatology*. 114: 631-634.

- Inoshima Y., Morooka A., Sentsui H., (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 84(2):201-208.
- Kahn, D.; Hutchinson, E.A., (1980). Generalized bullous Orf. *International Journal of Dermatology*. 19: 340-341.
- Klein J., Tryland M. (2005). Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domestic reindeer (*Rangifer tandarum tandarum*). *Virology Journal*. 2:79
- 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. *Journal of Virological Methods*. 134: 119-124.
- Kummeneje K., Kosgrud J. (1979). Contagious Ecthyma (Orf) in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Veterinary Record*. 105: 60-61.
- Lard S.L., (1991). Differentiation of Parapoxvirus by application of orf virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 28: 247-258.
- Leavel 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. *Journal of American Medical Association*. 204(8).
- 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. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 26 (8): 740-744.
- Lederman ER, Green GM, DeGroot HE, Dahl P, Goldman E, Greer PW, Li Y, Zhao H, Paddock CD, Damon IK.(2007). Progressive ORF virus infection in a patient with lymphoma: successful treatment using imiquimod. *Clinical Infectious Disease*. 44(11):100-103
- Lewis C. (1996). Update on Orf. *In Practice*, 9: 376-381.
- Lin C.L., Chung C.S., Heine H.G., Chang W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of Virology*. 74:3353-3365.
- Livingstone C.W., Hardy W.T. (1960). Longevity of contagious ecthyma virus. *Journal of the American Veterinary Association*. 137: 651.

- Margalit H., Spouge J.L., Cornet J.L., Cease K.B., DeLisi C., Berzofsky J.A.(1987). Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from primary sequence. *Journal of Immunology*. 138: 2213-2229.
- 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.
- McInnes C. J., Wood A. R., Mercer A.A. (1998). Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L. *Virus Genes*. 22:141-150
- McInnes C.J., Haig M. (2002). Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Research*. 88: 3- 16.
- McInnes C. J., Wood A.R., Thomas K., Sainsbury A., Gurnell J., Dein J.F., Nettleton P.F. (2006). Genomic characterisation of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK. *Journal of General Virology*. 87: 2115-2125.
- McIntosh A.A. and Smith G.L. (1996). Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *Journal of Virology*. 70: 7415-7419.
- McKeever D.J., Jenkinson D.M., Hutchinson G., Reid H.W. (1988). Studies on the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 99: 317-328.
- McKeever D.J., Reid H.W., Inglis N.F., Herrig A.J. (1987). A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Veterinary Microbiology*. 15:229-241.
- 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. *Journal of Comparative Pathology*. 99: 317-328.
- McKelvey TA, Andrews SC, Miller SE, Ray CA, Pickup DJ. (2002). Identification of the orthopoxvirus p4c gene, which encodes a structural protein that directs intracellular mature virus particles into A-type inclusions. *Journal of Virology*. 76(22):11216-25.
- Mercer A.A., Yirrel D.L., Whelan E.M., Nettleton P.F., Gilray J.A., Nettleton P.F.,, Robinson A.J. (1997a). A novel strategy for determining protective antigens of the parapoxvirus, orf virus. *Virology*. 229(1): 193-200.

- Mercer A.A., Fleming S.B., Robinson A.J., Nettleton P.F., Reid H.W. (1997b). Molecular genetic analysis of parapoxviruses pathogenics for humans. *Archives of Virology*. 13: 25-34.
- 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., Lyttle D.J., Whelan E.M., Fleming S.B., Sullivan T.J. (1995). The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses. *Virology*. 212: 698-704.
- Mercer, A.A.; Yirrell, D.L.; Reid, H.W.; Robinson, A.J. (1994). Lack of cross-protection between vaccinia virus and orf virus in hysterectomy-procured, barrier-maintained lambs. *Veterinary Microbiology*. 41: 373-382.
- Mercer AA, Ueda N, Friederichs SM, Hofmann K, Fraser KM, Bateman T, Fleming SB. (2005). Comparative analysis of genome sequences of three isolates of Orf virus reveals unexpected sequence variation. *Virus Research*. 116(1-2):146-58.
- Moriello, K.A. and Cooley, J. (2001). Difficult dermatologic diagnosis. Contagious viral pustular dermatitis (orf), goatpox, dermatophilosis, dermatophytosis, bacterial pyoderma, and mange. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 1 : 218(1):19-20.
- 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.
- Naase M., Nicholson B.H., Fraser K.M., Mercer A.A., Robinson A.J. (1991). An orf virus sequence showing homology to the 14K “fusion” protein of Vaccinia virus. *Journal of General Virology*. 72: 1177-1181.
- 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.
- 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.
- Nollens H. H., Gulland F. M. D., Jacobson E.R., Hernandez J.A., Klein P.A.,

- Walsh M.T., Condit R.C. (2006). Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus. *Virology*. 349(2):316-24.
- 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.).
  - Reid H.W. (1994). The changing face of Orf. *Proceedings of the sheep veterinary society*. 18: 173-174.
  - 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., Balassau T.T. (1981). Contagious pustular dermatitis (Orf). *Veterinary Bulletin*. 51: 771-781.
  - Robinson A.J., Mercer A.A. (1988). Orf virus and vaccinia virus do not cross protect in sheep. *Archives of Virology*. 101: 255-259.
  - 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. *American Journal of Veterinary Research*. 44(5): 875-878.
  - Rosliakov A.A. (1972). Comparative ultrastructure of viruses of camel pox, poxlike disease of camels (Auzduk) and contagious ecthyma of sheep. *Voprosi Virusol.* 17: 26-30.
  - Rziha H.J., Henkel M., Cottone R., Meyer M., Dehio C., Buttner M. (1999). Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *Journal of Biotechnology*. 73:235-242.
  - Sainsbury A.W., Gurnell J.(1995). An investigation into health and welfare of red squirrel, *Sciurus vulgaris*, involved in reintroduction studies. *Veterinary Record*. 137: 367-370.
  - Sanderson J. (1976). Treating orf. *Veterinary Record*. 99:56.
  - Savage J. and 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. *Journal of Virology*. 74(22): 10699-10706.

- Scagliarini A., Peli A., Franchi A. (2001). Infezione da Orf virus nell'uomo: revisione della letteratura. *Esperienze dermatologiche*. 3: 431-436.
- 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., 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., F. Dal Pozzo, L. Gallina, A. Guercio, E. De Clercq, R. Snoeck and G. Andrei.(2005). Ovine Skin Organotypic Cultures Applied to the Ex vivo Study of Orf Virus Infection. *Veterinary Research Communication*. 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, McInnes CJ, Gallina L, Dal Pozzo F, Scagliarini L, Snoeck R, Prosperi S, Sales J, Gilray JA, Nettleton PF.(2007). Antiviral activity of HPMPC (cidofovir) against orf virus infected lambs. *Antiviral Research*. 73(3):169-74.
- 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.
- 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 viroreceptors. *Proceeding of National academy of Science USA*. 100 (25): 15137-15142.
- Sentsui H., Murakami K, Inoshima Y., Shibahara T., Yokomizo Y. (1999). Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon- $\gamma$ . *Veterinary Microbiology*. 70:143-152.
- Sette A., Buus S., Appella E., Smith J.A., Chesnut R., Miles C., Colon S.M., Grey H.M. (1989). Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *Proceedings National Academy of Science, USA*. 86:3296-3300.
- Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. (2002)T. he formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*. 83:2915-31.

- Spehner D., De Carlo S., Drillien R., Weiland F., Mildner K., Hanau D., Rziha H.J. (2004). Appearance of the Bona Fide Spiral Tubule of Orf Virus Is Dependent on an Intact 10-Kilodalton Viral Protein. *Journal of Virology*. 78(15):8085-8093 .
- Spillmann D. (2001). Heparan sulfate: anchor for viral intruders ? *Biochemie*. 83:811-817.
- Sullivan J.T., Mercer A.A., Fleming S.B., Robinson A.J. (1994). Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope protein antigen p37K. *Virology*. 202: 968-973.
- Sullivan J.T., Mercer A.A., Fleming S.B., Robinson A.J. (1995). Sequence and transcriptional analysis of near-terminal region of the orf virus genome. *Virus Genes*. 11:21-29.
- Tan S.T., Blake G.B., Chambers S. (1991). Recurrent orf in immunocompromised host. *Britain Journal of Plastic Surgery*. 44: 465-467.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibbson D.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight metrics choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Tikkanen M.K., McInnes C.J., Mercer A.A., Buttner M., Tuimala J., Hirvela-Koski V., Neuvonen E., Huovilainen A. (2004). Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. *Journal of General Virology*. 85:1413-1418.
- Turner G.S., Squires E.J., (1971). Inactivated smallpox vaccine: immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus. *Journal of General Virology*. 13: 19-25.
- Ueda N., Wise L.M., Stacker S.A., Fleming S.B. and Mercer A.A. (2003). Pseudocowpox virus encodes a homolog of vascular endothelial growth factor. *Virology*. 305: 298-309.
- Upton C., Slack S., Hunter A.L., Ehlers A., Roper R.L. (2003) Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *Journal of Virology* . 77(13):7590-7600.
- Uzel, M.; Sasmaz, S.; Ozkul, A.; Cetinus, E.; Bilgic, E.; Karaoguz, A. (2004). Swan-neck deformity and paresthesia following giant orf. *Journal of Dermatology*. 31(2):116-8.
- Van Asseldonk, T. and Beijer, H. (2006). Herbal folk remedies for animal health in the Netherlands. *Proceedings of the IV<sup>th</sup> International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*. 257-263.

- 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.
- Watson, P., (2004). Differential diagnosis of oral lesions and FMD in sheep. *In Practice*. 26: 182-191.
- 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.
- Wilkinson J.D. (1977) Orf: a family with unusual complications. *British Journal of Dermatology*. 97: 447.
- Wilson T., Cheville M., Karstad L., (1969), Seal pox. *Bulletin of wild disease association*. 5: 412-418.
- Wittek R., Kuenzle C.C., Wyler R. (1979) High G+C content in paramyxovirus DNA. *Journal of General Virology*. 43:231-234.
- Yeruham I., Nyska A., Abraham A. (1994) Parapox infection in a gazelle kid. (*Gazella gazella*). *Journal of wildlife disease*, 30: 260-262.
- Yirrel D.L., Vestey J.P., Norval M. (1994) Immune responses of patients to Orf virus infection. *British Journal of dermatology*. 130: 438-443.
- Yuen L. and Moss B. (1987) Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus genes. *Proceedings of national Academy of Science*. 84: 6417-6421.
- 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.
- Zinoviev V.V., Tchikaev N.A., Chertov O.Y., Malygin E.G. (1994). Identification of the gene encoding Vaccinia virus immunodominant protein p35. *Gene*. 147: 209-214.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il Dott. Antonio Lavazza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna per il processamento dei campioni di Orf virus delecto in microscopia elettronica. L'analisi delle osservazioni sperimentali e le foto che il Dott. Lavazza mi ha fornito hanno portato un contributo determinante ai risultati di questa tesi.

Ringrazio il Dott. Colin McInnes per avermi fornito gli anticorpi monoclonali 2E5.

Ringrazio le Dottoresse Giulia D'Intino e Stefania Pirondi del laboratorio della Dottoressa Laura Calzà, Dipartimento di Morfofisiologia e Anatomia degli Animali Domestici, per lo svoglimento della prova di Immunoistochimica. Mi hanno fornito un supporto fondamentale con estrema gentilezza e disponibilità.

Un ringraziamento profondo e sentito va infine alla Dottoressa Scagliarini per avermi guidato con pazienza, competenza ed estrema disponibilità in ogni parte di questo lavoro. La sua guida mi ha permesso di crescere professionalmente e dal punto di vista personale.

Un ringraziamento va anche agli insostituibili colleghi ed amici Francesca Vaccari, Viola Galligioni, Elena Galletti, Andrea Bonato.

Un ringraziamento a Tommaso per essermi sempre accanto e per aver scelto di esserlo anche in il futuro.

Un ringraziamento alla mia Famiglia.

