



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FISILOGICHE, BIOCHIMICHE E CELLULARI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN:  
“BIOCHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI”  
(XX CICLO)**

**Allestimento di un vaccino a DNA  
contro *Mycoplasma agalactiae***

*Coordinatore: Prof. Bruno Masala*

*Tutor: Prof. Marco Pittau*

*Tesi di dottorato del  
Dott. Bernardo Chessa*

*Anno Accademico 2007-2008*

# Indice

## Introduzione

### *Capitolo 1*

#### ***I Mycoplasmi***

1.1 - Generalità e tassonomia

1.2 - Generalità e tassonomia

1.3 - Invasività e patogenicità

1.4 - Diagnosi delle infezioni sostenute da micoplasmi

### *Capitolo 2*

#### ***Mycoplasma agalactiae e Agalassia Contagiosa***

### *Capitolo 3*

#### ***Vaccini a DNA***

3.1 - Generalità sui vaccini

3.2 - Cosa sono e come funzionano i vaccini a DNA

3.3 - Immunogenicità indotta dai vaccini a DNA

3.4 - Vantaggi e svantaggi dei vaccini a DNA

3.5 - I vaccini a DNA in medicina veterinaria

### *Capitolo 4*

#### ***Scopo del lavoro***

## *Capitolo 5*

### ***Materiali e metodi***

- 6.1- Terreni e reagenti
- 6.2- Costruzione dei plasmidi di espressione
- 6.3- Espressione del gene p48 nelle cellule transfettate
- 6.4- Immunizzazione dei topi
- 6.5- Espressione e purificazione dell'antigene P48
- 6.6- SDS-PAGE e Western blot
- 6.8- Saggio per la proliferazione degli splenociti e la secrezione delle citochine
- 6.9- ELISA antigene-specifico
- 6.10- Valutazioni statistiche

## *Capitolo 6*

### ***Risultati***

- 7.1- Costruzione ed espressione dei plasmidi contenenti il gene p48
- 7.2- Valutazione della risposta immunitaria umorale alla vaccinazione
- 7.3- Proliferazione delle cellule mononucleate nella milza
- 7.4- Ricerca degli mRNA specifici di alcune citochine in cellule mononucleate

## *Capitolo 7*

### ***Discussione e conclusioni***

### ***Bibliografia***

# Introduzione

L'Agalassia Contagiosa (AC) è una malattia cosmopolita ad andamento epidemico che colpisce i piccoli ruminanti. L'agente eziologico è il *Mycoplasma agalactiae*. La malattia provoca mastiti, con brusche riduzioni della produzione di latte, artriti e cheratocongiuntiviti, a seconda del momento in cui avviene l'infezione si possono evidenziare anche episodi di polmonite, infezioni urogenitali e aborto. I danni economici provocati dalla malattia all'interno degli allevamenti sono molto rilevanti soprattutto in quelle aziende nelle quali il patogeno fa la sua comparsa per la prima volta. La patologia per la sua gravità è compresa nella lista delle malattie soggette a denuncia nel regolamento di polizia veterinaria.

A causa dei notevoli danni economici provocati dall'Agalassia Contagiosa in numerosi paesi sono in atto piani di eradicazione e di controllo. Purtroppo a tutt'oggi non esistono ancora degli strumenti di tipo profilattico e/o terapeutico in grado di riuscire ad eliminare con certezza la patologia. La profilassi vaccinale attualmente consiste nell'utilizzo di vaccini spenti che sono efficaci per ridurre la sintomatologia clinica, ma presentano tutti gli svantaggi dei vaccini spenti ed inoltre non prevencono l'infezione. E' necessario quindi migliorare la profilassi vaccinale contro *M.agalactiae* facendo ricorso anche ai vaccini di nuova generazione.

In questo lavoro è stato prodotto un vaccino a DNA codificante il gene per la proteina P48 di *M.agalactiae* in un vettore basato sul plasmide di espressione eucariotico pVAX1. L'antigene prescelto è una lipoproteina di membrana che fa parte di un complesso ABC transporter e che presumibilmente ha attività di *solute binding protein*. La proteina P48 è stata identificata come antigene immunodominante, viene espressa in misura maggiore rispetto alle altre proteine e viene precocemente riconosciuta in sieri di animali naturalmente infetti o infettati sperimentalmente (Rosati et al., 1999). Grazie alla sua immunodominanza, all'assenza di variabilità intraclonale e alla sua costante espressione in tutte le fasi dell'infezione, la proteina P48 rappresenta un candidato ideale per la produzione di un vaccino contro *M agalactiae*. Inoltre è già utilizzata per l'allestimento di un kit diagnostico basato sulla sua forma ricombinante (espressa in *E. coli*) (Rosati et al., 2000).

# *Capitolo 1*

## *I Mycoplasmi*

### 1.1- Generalità e tassonomia

I micoplasmi appartengono alla classe dei *Mollicutes* e sono i più semplici procarioti capaci di vivere autonomamente e di auto-replicarsi al di fuori di un'altra cellula. Essi sono largamente diffusi in natura come parassiti di uomini, mammiferi, rettili, pesci, artropodi e piante (Razin S., 1992). Il numero conosciuto degli ospiti che albergano Mycoplasmi è in continuo aumento, così come il numero delle specie di microrganismi appartenenti alla classe *Mollicutes*, che annovera per ora circa 180 specie. E' largamente accettata l'opinione che i *Mollicutes* finora isolati, caratterizzati e definiti dal punto di vista tassonomico siano solamente una piccola parte del totale dei *Mollicutes* viventi in natura (Razin S., 1998). Particolarmente interessante è risultata la comparazione delle sequenze dell'RNA ribosomiale 16S che ha recentemente

dimostrato la stretta correlazione dei micoplasmi con i generi *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, finora ritenuti vicini alle rickettsie (Razin, 1991).

A fronte di questa ampia distribuzione nell'ambiente naturale, i micoplasmi mostrano usualmente un ristretto spettro d'ospite ed una specificità verso i tessuti bersaglio.

Il progenitore ancestrale dei micoplasmi si staccò dal ramo filogenetico *Streptococcus* circa 600 milioni di anni fa, e probabilmente era un organismo con un genoma di circa 2.000 kb; da esso ebbe origine l'albero filogenetico dei micoplasmi, che prese circa 150 milioni di anni dopo due diverse direzioni a partire da un organismo di ormai 1.700-2.000 kb: il primo ramo (ramo AAA) portò alle linee evolutive di *Asteroleplasma*, *Anaeroplasma*, *Acholeplasma*, mentre l'altro ramo (ramo SEM) diede origine ai rami *Spiroplasma*, *Entomoplasma* e *Mycoplasma*. I *Phytoplasma* originarono successivamente dalla linea *Acholeplasma*, mentre il ramo *Ureaplasma* si staccò dalla branca *Mycoplasma*.

Come già accennato, i micoplasmi, sono microrganismi di piccole dimensioni (0.2-0.8  $\mu\text{m}$ ) e sono considerati i più piccoli e semplici organismi in grado di auto replicarsi (Carter & Chengappa, 1991). La struttura consiste essenzialmente di una membrana cellulare cui sono adese sacche di materiale protoplasmatico con ribosomi, ed una molecola di ds-DNA, per la semplicità della loro struttura i micoplasmi sono stati fin dall'inizio utilizzati come modello per studi

riguardanti la struttura e le funzioni della membrana cellulare, sfruttando il fatto che in essi si può in modo semplice manipolare la composizione dei lipidi costituenti la membrana plasmatica, quindi si può facilmente intuire come per gli studiosi delle membrane biologiche essi rappresentino un ideale oggetto di studio (Razin S., 1998).

L'assenza di una rigida parete cellulare rende i micoplasmi pleomorfi. La loro forma dominante è quella sferica, anche se molti esibiscono una grande varietà di forme: a pera, a fiasca con un "tappo" terminale, ad anello, elicoidali, ad Y, filamentose (la denominazione *Mycoplasma* si riferisce proprio alla somiglianza con le ife dei miceti) (Farina & Scattozza, 1998; Razin et al., 1998).

Da un lato la mancanza di parete cellulare ben si abbina alla varietà di forme assunte dai Micoplasmi, dall'altro ancora non spiega come questi microrganismi riescano a mantenere una particolare forma data appunto l'assenza di una struttura esterna rigida; questo potrebbe indicare la presenza di una sorta di citoscheletro all'interno delle cellule, capace di conferire la rigidità necessaria al mantenimento della forma assunta dal microrganismo ma anche in grado di permettergli di variarla liberamente quando necessario.

Inoltre, per ciò che riguarda la capacità di passare da una forma all'altra, si ipotizza la presenza all'interno dei micoplasmi di proteine con capacità contrattili simili a filamenti di actina; queste stesse proteine potrebbero essere responsabili anche dell'abilità di scivolare su superfici solide mostrata da alcuni

micoplasmi (Razin et al., 1998), ad oggi comunque la presenza di proteine actino simili nei *Mollicutes* non è ancora stata dimostrata con certezza.

Per concludere si può dire che nella fase logaritmica di crescita si osservano generalmente forme filamentose, mentre nelle vecchie colonie sono più frequentemente presenti forme coccoidi: i filamenti sono forme transitorie e vengono ricondotti ad una elevata velocità di crescita che causa una replicazione del DNA non seguita dalla divisione del citoplasma; solo in un secondo tempo (colture più vecchie) si completerà il processo, con la formazione di catenelle di elementi coccoidi che poi si separeranno.

Legato alla mancanza di parete cellulare risulta anche essere il tipico aspetto delle colonie di Mycoplasmi su terreno di coltura solido; così come gli sferoplasti ed altri microrganismi sperimentalmente privati della parete cellulare, i micoplasmi necessitano di un punto di fissazione all'interno dello spessore dell'agar perché abbia inizio la loro moltiplicazione. A partire da questo punto si avrà un'espansione radiale della colonia, che scivola sulla superficie del terreno di coltura e viene così ad assumere il tipico aspetto "ad uovo fritto", con un centro granuleggiante chiamato "centro di approfondimento", circondato da un anello piatto e traslucido simile ad un velo (Rottem & Kahane, 1993, Timoney et al., 1992).

La modalità di riproduzione dei micoplasmi non differisce molto da quella degli altri procarioti, che si dividono in genere per scissione binaria.

Già si è detto come la divisione citoplasmatica possa ritardare rispetto alla replicazione del genoma, dando origine a filamenti multinucleati; la trasformazione di questi filamenti in catenelle di elementi coccoidi avviene attraverso la formazione di una serie di costrizioni del citoplasma, poste ad eguale distanza l'una dall'altra.

Dato che questo processo negli eubatteri è mediato da costituenti della parete batterica, non è ancora chiaro come esso possa venire coordinato in organismi privi di questa struttura; finora la più importante scoperta in grado di poter spiegare questo fenomeno è il ritrovamento nei Mycoplasmi del gene *ftsZ*. Negli eubatteri la proteina FtsZ è un polimero con elementi simil tubulari idrolizzante il GTP, localizzato a livello del sito di divisione del citoplasma e che va a formare un anello di costrizione (anello Z) fra le due future cellule figlie. Degli altri geni associati con la divisione cellulare negli eubatteri (*ftsA*, *ftsH*, *ftsI*, *ftsQ*, *ftsW*, *ftsW*, *ftsY*), *ftsH* è stato ritrovato in *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma capricolum*, mentre *ftsY* è stato identificato in *Mycoplasma genitalium*, *M.pneumoniae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Non è stata quindi ancora fatta luce del tutto su questo argomento, così come non è stato ancora esaminato approfonditamente il meccanismo di replicazione e divisione del DNA nelle cellule figlie in nessuna specie appartenente ai *Mollicutes* (Razin S. 1998).

Il genoma dei mycoplasmi è costituito da una molecola di dsDNA con un peso di circa  $5 \times 10^8$  Da e una lunghezza che va dalle 580 kb per il *M.genitalium* alle 1380 kb per il *M.mycooides subs mycooides LC* (Razin et al 1972). Questa estrema variabilità nelle dimensioni del genoma, riscontrabile sia all'interno del genere che della specie, è data dalla presenza di elementi di inserzione e ripetuti, costituiti da segmenti di sequenze codificanti che differiscono per numero e lunghezza nelle varie specie (Razin, 1984; Ladefoged et. al., 1992; Rink et. al., 1992; Carle et. al., 1995; Huang et. al., 1995; Himmelreich et. al., 1996).

Guardando ai *Mollicutes* nel loro complesso si nota come i generi *Acholeplasma* e *Spiroplasma*, considerati filogeneticamente degli “antichi” *Mollicutes*, abbiano un genoma di dimensioni superiori a quello dei generi *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, considerati *Mollicutes* filogeneticamente più recenti (ad esempio in *Spiroplasma* spp. le dimensioni del genoma variano dai 780 ai 2.220 kb).

Questo è in linea con il concetto che i *Mollicutes* si siano evoluti attraverso un fenomeno di evoluzione “riduttiva” o “degenerativa”, che ha portato a consistenti perdite di sequenze genomiche (Razin S.,1998).

Il genoma dei micoplasmi possiede inoltre un'altra caratteristica peculiare: il contenuto in Guanina e Citosina è decisamente più basso di quello osservabile negli altri eubatteri, e si assesta intorno al 24-33 mol% . La distribuzione di G+C varia nelle diverse parti del genoma e più equilibrati rapporti tra GC vs. AT sono mantenuti nelle regioni codificanti, mentre le regioni intergeniche tendono ad

essere più ricche in A+T (Timoney et al., 1992; Behrens et. al., 1994; Carle et. al., 1995; Tully & Razin, 1996; Razin et al., 1998). Inoltre, come avviene anche in altri procarioti, alcuni residui di adenina e citosina possono essere metilati (Razin, 1985; Maniloff, Dybvig et. al., 1992; Dybvig & Voelker, 1996).; dato che in molti micoplasmi si ha la metilazione dell'adenina nel sito GATC mentre in altri è la citosina ad essere metilata, è stato proposto di utilizzare il tipo di base metilata, l'estensione della metilazione e la specificità della sequenza metilata, come markers per la tassonomia dei Mollicutes (Razin, 1992).

Una diretta conseguenza della costituzione in basi del genoma dei micoplasmi è l'uso dei codoni che favorisce l'utilizzo di sinonimi con A e T. Analogamente i micoplasmi hanno un numero inferiore dei codoni GGN, CCN, GCN, e CGN con conseguente contenuto inferiore in glicina, prolina, alanina e arginina (Razin, 1992). La pressione selettiva verso un alto contenuto in A e T (Razin *et al.*, 1998; Muto & Osawa, 1987), è considerato la causa dello shift nella funzione del codone UGA che codifica, come nel DNA mitocondriale, per il triptofano e non rappresenta un codone di stop come nel codice genetico universale. Quest'ultima caratteristica rende difficoltosa l'espressione dei geni di micoplasmi clonati in *Escherichia coli* (Smiley & Minion, 1993).

Non tutti i *Mollicutes* hanno questa particolarità, in quanto i filogeneticamente più antichi *Acholeplasma* e *Phytoplasma* usano il convenzionale codone UGG per il triptofano e UGA come stop codon. I filogeneticamente più recenti

*Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Mesoplasma* hanno evoluto UGA come nuovo codone per il triptofano, insieme ad un nuovo tRNA capace di leggere UGA come “triptofano”, in ragione della pressione di mutazione AT-orientata; questo fatto si riscontra anche negli *Spiroplasma*, anche se essi sono filogeneticamente più antichi del genere *Mycoplasma*.

Nella Tab.1 sono riassunte schematicamente le caratteristiche fin qui illustrate e la tassonomia della classe *Mollicutes*, mentre nella Tab.2 vengono confrontate le caratteristiche principali dei *Mollicutes* e degli altri eubatteri.

Nelle tabelle 3-8 vengono indicate le principali specie di micoplasmi riscontrati negli animali domestici.

Classificazione	Specie conosciute (n°)	Genoma (Kb)	Mol% G+C	Richiesta colesterolo	Habitat
<b>Ordine I:</b>					
<i>Mycoplasmatales</i>					
Famiglia I: <i>Mycoplasmataceae</i>					
Genere I: <i>Mycoplasma</i>	102	580-1350	23-40	+	Uomini, animali
Genere II: <i>Ureaplasma</i>	6	760-1160	27-30	+	Uomini, animali
<b>Ordine II:</b>					
<i>Entomoplasmatales</i>					
<b>Famiglia I :</b>					
<i>Entomoplasmataceae</i>					
Genere I : <i>Entomoplasma</i>	5	790-1140	27-29	+	Insetti, piante
Genere II : <i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	27-30	-	Insetti, piante
<b>Famiglia II :</b>					
<i>Spiroplasmataceae</i>					
Genere I : <i>Spiroplasma</i>	33	780-2220	24-31	+	Insetti, piante
<b>Ordine III :</b>					
<i>Acholeplasmatales</i>					
<b>Famiglia I :</b>					
<i>Acholeplasmataceae</i>					
Genere : <i>Acholeplasma</i>	13	1500-1650	26-36	-	Animali, insetti, piante
<b>Ordine IV :</b>					
<i>Anaeroplasmatales</i>					
<b>Famiglia:</b>					
<i>Anaeroplasmataceae</i>					
Genere I : <i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	29-34	+	Rumine di bovini, ovini
Genere II : <i>Asteroleplasma</i>	1	1500	40	-	
Stato tassonomico non ancora definito					
Phytoplasma	Non definito	640-1185	23-29	Non conosciuto	Insetti, piante

**Tab.1— Caratteristiche principali e tassonomia della classe Mollicutes (riadattata da Razin S. et al)**

Proprietà:	<i>Mollicutes</i>	Altri eubatteri
Parete cellulare	Assente	Presente
Membrana plasmatica	Colesterolo presente quasi in tutte le specie	Colesterolo assente
Filtrabilità (450 nm)	+	-
Dimensioni genoma	580-2220 kb	1050-10000 kb
Contenuto G+C del genoma	23-40 mol%	25-75 mol%

**Tab.2—** Proprietà che distinguono i *Mollicutes* dagli altri eubatteri (riadattata da Bisping W. et Amtsberg G. e da Razin S. et al)

Specie	Ospite	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. anatis</i>	Anatra	-	Sinusite ; commensale del tratto respiratorio e della cloaca
<i>M. cloacae</i>	Tacchino	-	Commensale della cloaca
<i>M. columbinasale</i>	Piccione	-	Malattia respiratoria; commensale del tratto respiratorio superiore
<i>M. columbinum</i>	Piccione	-	Malattia respiratoria; commensale del tratto respiratorio superiore
<i>M. columborale</i>	Piccione	-	Malattia respiratoria; commensale del tratto respiratorio superiore
<i>M. gallisepticum</i>	Pollo, tacchino ed altri uccelli	+	Sacculite, sinusite, artrite, sinovite, encefalite
<i>M. iowae</i>	Tacchino	+	Sacculite, mortalità embrionale
<i>M. meleagridis</i>	Tacchino	+	Sacculite, artrite, sinovite, salpingite
<i>M. synoviae</i>	Pollo, tacchino	+	Sinovite, bursite (borse sottocutanee sternale e tarsale), possibile diarrea

**Tab. 3 —** principali micoplasmi che colpiscono le specie avicole

Specie	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. flocculare</i>	(+)	Polmonite; commensale oculare e respiratorio
<i>M. hyorhinis</i>	(+)	Polmonite, artrite, polisierosite; commensale della mucosa delle vie aeree superiori che opportunisticamente può invadere il polmone
<i>M. hyosinoviae</i>	+	Poliartrite non suppurativa; commensale nasofaringeo
<i>M. hyopneumoniae</i>	++	Polmonite enzootica

**Tab.4 — principali micoplasmi che presenti nel suino**

Specie	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. equigenitalium</i>	?	Ritrovato in canale cervicale, seme
<i>M. equirhinis</i>	?	Ritrovato nel tratto respiratorio
<i>M. fastidiosum</i>	?	Ritrovato nel tratto respiratorio
<i>M. felis</i>	?	Ritrovato nel tratto respiratorio
<i>M. subdolum</i>	?	Ritrovato in canale cervicale e feti abortiti

**Tab. 5 — principali micoplasmi presenti nella specie equina**

Specie	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. alkalescens</i>	(+)	Artriti (vitelli), mastiti; commensale a livello del prepuzio
<i>M. alvi</i>	-	Nessuna malattia descritta; commensale intestinale e vaginale
<i>M. arginini</i>	-	Commensale respiratorio, congiuntivale, vaginale
<i>M. bovigentialium</i>	(+)	Mastite, vescicolite seminale, artriti nei vitelli; commensale prepuziale
<i>M. bovirhinis</i>	-	Mastite; commensale respiratorio
<i>M. bovis</i>	+	Grave mastite, artrite, polmonite dei vitelli; commensale respiratorio
<i>M. bovoculi</i>	+	Congiuntivite, cheratocongiuntivite
<i>M. californicum</i>	+	Mastite acuta
<i>M. canadense</i>	(+)	Artriti (vitelli), mastiti; commensale respiratorio e prepuziale
<i>M. dispar</i>	(+)	Bronchiolite ed alveolite; commensale respiratorio
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo SC	+	Pleuropolmonite contagiosa bovina (CBPP)
<i>M. verecundum</i>	-	Congiuntivite nei vitelli; commensale prepuziale

**Tab. 6 — principali micoplasmi presenti nel bovino**

Dott. Bernardo Chessa, Allestimento di un vaccino a DNA contro *Mycoplasma agalactiae*.  
Tesi di dottorato in Biochimica, Biologia e Biotecnologie molecolari, Università degli studi di Sassari.

Specie	Ospite	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. arginini</i>	Ampio spettro d'ospite	-	Commensale mucosale
<i>M. agalactiae</i>	Pecora, capra	+	Agalassia contagiosa, artrite, vulvovaginite, congiuntivite, polmonite
<i>M. capricolum</i>	Pecora, capra	+	Mastite, poliartrite, setticemia
<i>M. conjunctivae</i>	Pecora, capra, camoscio	(+)	Cheratocongiuntivite
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Capra	+	Pleuropolmonite contagiosa caprina
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo LC	Pecora, capra	+	Setticemia, poliartrite, mastite, cheratocongiuntivite
<i>M. ovipneumoniae</i>	Pecora, capra	-	Polmonite cronica in associazione con <i>Pasteurella haemolytica</i>
<i>M. putrefaciens</i>	Capra	(+)	Mastite
<i>Mycoplasma</i> strain F38	Capra	+	Setticemia, pleuropolmonite contagiosa caprina

**Tab.7 — principali micoplasmi degli ovi - caprini**

Specie	Ospite	Virulenza	Malattia prodotta (se presente)
<i>M. bovis genitalium</i>	Bovino, cane	+	Mastite, vaginite, polmonite, commensale del tratto urogenitale
<i>M. cynos</i>	Cane	(+)	Polmonite, ritrovato nel tratto urogenitale, respiratorio, digerente
<i>M. edwardii</i>	Cane		Ritrovato nel tratto urogenitale, respiratorio
<i>M. feliminutum</i>	Cane, gatto		Ritrovato nel tratto respiratorio
<i>M. felis</i>	Gatto	(+)	Congiuntivite, polmonite, ritrovato nel tratto urogenitale
<i>M. gateae</i>	Cane, gatto		Ritrovato nel tratto urogenitale
<i>M. maculosum</i>	Cane		Ritrovato nel tratto urogenitale, respiratorio
<i>M. molare</i>	Cane		Ritrovato nel tratto urogenitale, respiratorio
<i>M. spumans</i>	Cane	(+)	Polmonite, ritrovato nel tratto urogenitale, respiratorio

**Tab.8 — principali micoplasmi presenti nel cane e nel gatto**

I micoplasmi hanno subito, nel corso di milioni di anni, un'evoluzione degenerativa che ha portato ad una riduzione della dimensione del genoma, così che ai giorni nostri risultano essere batteri con una minima quantità di materiale genomico. Viene quindi da domandarsi cosa sia stato eliminato dal genoma durante il processo evolutivo e come ciò sia compatibile con il normale svolgimento di tutti i processi biochimici e le funzioni di questi microrganismi. Nel corso della loro evoluzione i micoplasmi hanno perduto apparentemente tutti i geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi e delle vitamine, ed un ulteriore "risparmio" di geni si è attuato a livello dei geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi: mentre alcuni micoplasmi sintetizzano essi stessi i fosfolipidi di membrana ed i glicolipidi a partire però da acidi grassi esogeni, altri non possiedono neppure queste vie metaboliche e sono costretti ad incorporare nella propria membrana plasmatica fosfolipidi preformati derivanti dai tessuti dell'ospite (Razin S., 1998).

Si è osservato anche che nei micoplasmi scarseggiano i geni codificanti per gli enzimi deputati alla sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche, precursori degli acidi nucleici, di conseguenza, il fabbisogno di basi azotate viene soddisfatto grazie alla presenza di potenti nucleasi capaci di degradare DNA e RNA delle cellule dell'ospite. I geni coinvolti nella replicazione, trascrizione e traslazione del materiale genetico, pur se in valore assoluto molto inferiori numericamente rispetto ad altri batteri, sono in percentuale (sul totale del genoma) addirittura

superiori ai valori presenti in batteri del genere *Haemophilus*, sottolineandone il ruolo biologico essenziale; la delezione genetica evolutiva ha quindi risparmiato questo gruppo di geni limitandone la distruzione (Razin S., 1998). Il numero di geni coordinanti alcuni processi cellulari, quali i geni *fts* associati alla divisione cellulare, la sintesi delle heat shock proteins e la secrezione delle proteine, è considerevolmente inferiore se paragonato ad altri eubatteri.

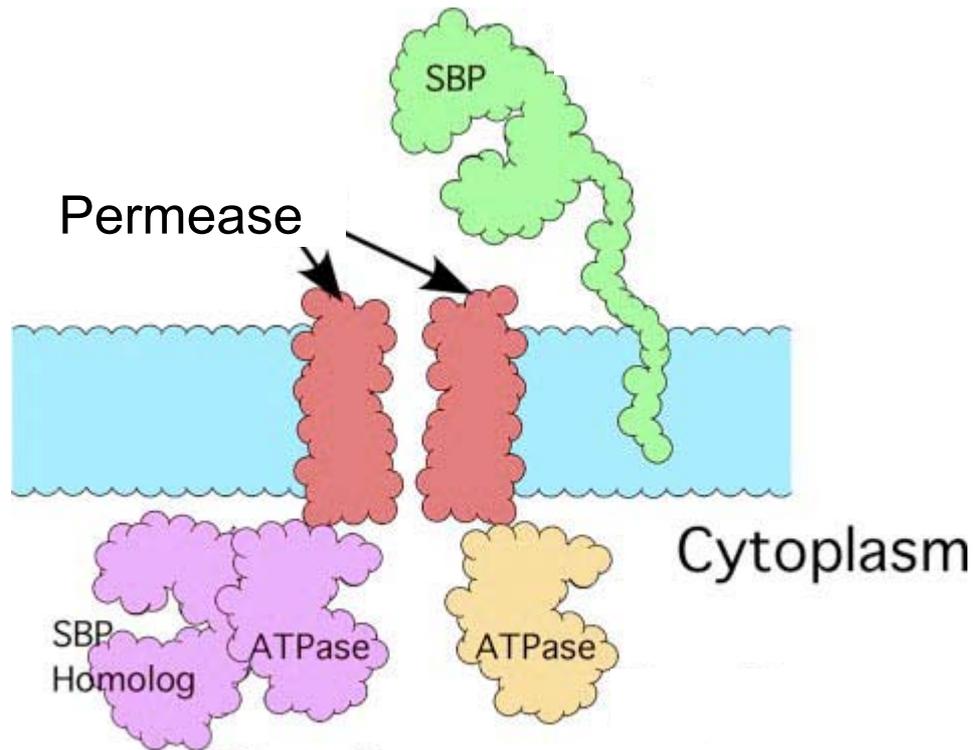
Notevole è il risparmio genetico che si è avuto anche a riguardo dei geni coinvolti nel metabolismo energetico: quello che colpisce è la perdita di tutti i principali sistemi di produzione di energia, tranne la glicolisi, che viene effettuata normalmente; in nessun micoplasma è stato possibile ritrovare infatti il ciclo degli acidi tricarbossilici né i citocromi, facenti parte del sistema della cascata di elettroni. La spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che scarse sono le richieste di ATP in una cellula come quella dei micoplasmi, dove sono stati fortemente ridotti tutti i principali processi biosintetici, che richiedono energia (Razin S., 1998).

I micoplasmi dipendono quindi fortemente da un apporto esogeno dei principali nutrienti: si potrebbe quindi pensare che i sistemi di trasporto siano enormemente sviluppati in questi microrganismi, più di quanto non lo siano invece in batteri che riescono autonomamente a provvedere alla maggior parte dei propri fabbisogni. Le ricerche svolte su questo argomento hanno però subito smentito questa possibilità (Razin S., 1998), dimostrando come il numero di

sistemi di trasporto sia alquanto limitato nei micoplasmi, in contraddizione con ogni logica aspettativa, e questo appare ancora più sorprendente se paragonato alle 281 proteine di trasporto e binding proteins di *Escherichia coli* K-12 o alle oltre 400 di *Bacillus subtilis*.

Una possibile spiegazione del ridotto numero di sistemi di trasporto nei micoplasmi potrebbe essere innanzitutto la presenza di una sola barriera di permeabilità, dato che essi sono privi della parete cellulare; inoltre l'apparente bassa specificità di substrato di alcuni sistemi di trasporto dei micoplasmi, come quello per gli aminoacidi, contribuirebbe all'importante risparmio di geni che la pressione evolutiva ha attuato anche in questa categoria.

Alcuni dei sistemi di trasporto dei micoplasmi sono però stati studiati e quindi sono conosciuti con una certa sicurezza; il primo di questi è il sistema dell'ABC transporter, Fig1.



**Fig. 1: organizzazione di un ABC transporter nei micoplasmi**

Gli ABC transporter sono coinvolti nell'importazione o esportazione di una grande varietà di substrati, quali zuccheri, peptidi, proteine e tossine. Il sistema consiste in due domini leganti l'ATP, due canali di membrana e un dominio legante il substrato; questi differenti domini sono spesso presenti su polipeptidi separati. A differenza dei sistemi ABC presenti negli altri batteri, che possiedono delle substrate binding proteins specifiche per le differenti molecole, negli ABC transporter dei micoplasmi non è stato possibile ritrovare queste particolari proteine. Un'ipotesi è quella che non siano state trovate perché molto differenti da quelle osservate negli altri batteri, ma la recente caratterizzazione di un sistema ABC di *Mycoplasma fermentans* (Razin S., 1998) ha fatto

parzialmente luce sulla questione: uno dei componenti del sistema di trasporto era una lipoproteina di superficie, che probabilmente serviva a legare i substrati. Questa lipoproteina superficiale era soggetta a variazioni di fase che le conferiva una variabile specificità di substrato e funzione di trasporto, perfettamente in linea con il principio del risparmio di geni che si è potuto constatare nella classe *Mollicutes*.

Un altro importante sistema di trasporto ritrovato nei micoplasmi è il sistema PTS (Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase Transport System), identificato nei *Mollicutes* parecchi anni or sono, e deputato al trasporto di zuccheri.

Infine un terzo sistema di trasporto (a parte il già citato sistema di trasporto non specifico degli aminoacidi) consiste nella diffusione facilitata dei vari composti grazie a proteine transmembrana, che si comportano come veri e propri carriers specifici per i diversi substrati (Razin S., 1998).

I micoplasmi hanno perduto anche altri geni non ritenuti essenziali, come alcuni di quelli coinvolti nei processi di riparazione del DNA. Si è visto che ad esempio *E.coli* possiede circa 100 geni deputati ad assolvere questa importantissima funzione (Blattner et al 1997), mentre *M.genitalium* e *M.pneumoniae* ne hanno solo 13 (Himmelreich et al 1996). Si presume quindi che i pochi geni deputati a questa funzione trovati nei micoplasmi, tra i quali

uracil DNA glycosylasi, l'esonucleasi ABC ed il gene recA, siano i soli essenziali negli organismi viventi per i processi di riparazione del genoma.

Il processo di traduzione e l'apparato per la sintesi proteica invece appaiono molto conservati in tutta la classe degli Eubatteri, indicando un successo del modello durante l'evoluzione. L'estrema conservazione dei geni della traduzione, dei ribosomi e dei geni della sintesi del tRNA si riflette anche nel contenuto di G+C degli Eubatteri (Razin et al 1998).

Molto ridotti risultano essere i geni per la sintesi proteica, motivo questo che rende molto più lenti i micoplasmi durante la replicazione rispetto all'*E.coli*. La lentezza nella replicazione non deve essere considerata come un processo deficitario, ma anzi come un escamotage organizzato dai micoplasmi per riuscire a vivere nell'ospite il più a lungo possibile; infatti una replicazione rapida come quella degli altri batteri porterebbe rapidamente a morte sia l'ospite ma soprattutto il micoplasma, che essendo un parassita obbligato andrebbe incontro a una sorta di suicidio non garantendo quindi la continuità alla specie (Razin et al 1998).

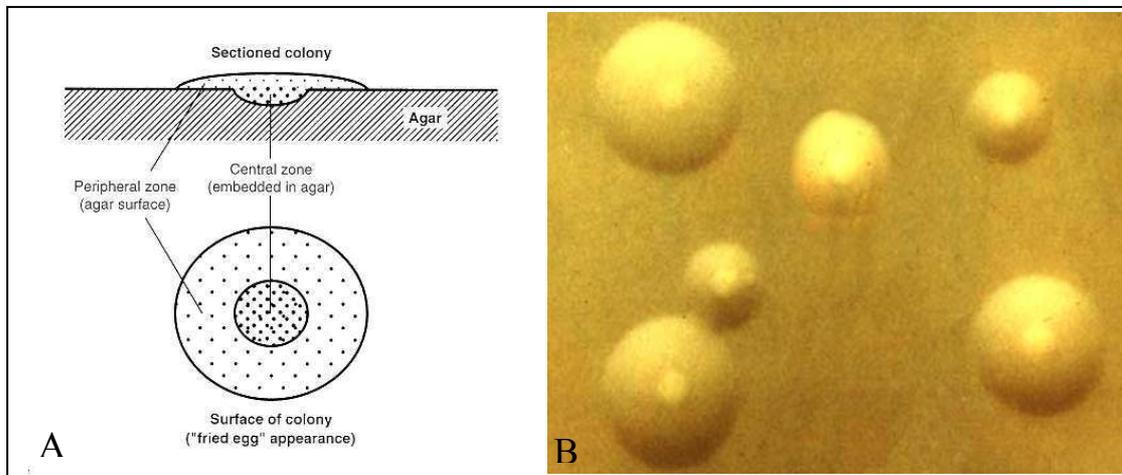
Da quanto detto sinora si può desumere che un'eccessiva riduzione del patrimonio genetico porta a una maggiore dipendenza dall'ospite per le risorse e quindi ad uno stile di vita strettamente parassitario.

## 1.2- Coltivazione in vitro dei micoplasmi:

Il maggiore impedimento nello studio e nella diagnosi delle micoplasmosi da parte dei laboratori sta nelle difficoltà che si incontrano nella coltivazione in vitro di questi batteri. A causa del loro genoma piuttosto ridotto infatti i micoplasmi sono incapaci di sintetizzare diversi metaboliti necessari per la loro sopravvivenza per cui vivono in una situazione di parassitismo obbligato. In particolar modo hanno esigenza di assumere colesterolo ed acidi grassi per andare a costituire la loro membrana cellulare.

Generalmente il terreno di coltura contiene un estratto di carne, peptone, estratto di lievito e del siero con vari supplementi (Razin et al 1991).

Alcuni membri della classe dei Mollicutes possono essere coltivati in laboratorio solamente in co-coltura con linee cellulari eucariotiche (Jensen et al 1996). In coltura su terreno solido (in condizioni di aerobiosi, a 37 °C e ad un pH compreso tra 7.6 e 7.8), i micoplasmi necessitano di un punto di ancoraggio nello spessore dell'agar per iniziare la replicazione; a partire da questo punto si verifica un'espansione radiale delle colonie, che assumono un aspetto tipico a "fried egg", ovvero a "uovo fritto" (Rottem & Kahane, 1993). Queste colonie presentano un centro chiamato "centro di approfondimento", circondato da un anello piatto e traslucido simile ad un velo (Farina & Scattozza, 1998; Timoney et al., 1992), Fig 2.



**Fig 2: (A) Rappresentazione schematica di una colonia di micoplasma in terreno solido, (B) Colonie di *Mycoplasma agalactiae* su terreno solido**

### 1.3- Invasività e patogenicità

L'importante riduzione del genoma che ha interessato i *Mollicutes* nel corso della loro evoluzione può essere compatibile con la vita degli stessi microrganismi solo tramite l'adozione di un sistema di vita essenzialmente parassitario. La possibilità di acquisire la maggior parte dei nutrienti dai tessuti dell'ospite ha portato alla perdita di tutta una serie di geni coinvolti in molteplici processi metabolici; in conseguenza di questo i micoplasmi sono strettamente dipendenti dal proprio ospite, come può essere anche constatato

dall'impossibilità di coltivare in laboratorio la maggior parte dei micoplasmi senza fornir loro tutta una serie di composti addizionati al terreno di coltura.

Il parassitismo è dunque una condizione necessaria per i micoplasmi, questa scelta evolutiva è resa possibile da sofisticati meccanismi che permettono loro di colonizzare i tessuti dell'ospite e di sfuggire al sistema immunitario. Riguardo al processo patogenetico viene spontaneo chiedersi come un microrganismo tanto fragile ed esigente riesca ad essere persistente ed estremamente diffuso in natura e causare spesso gravi forme patologiche, anche mortali in tutte le specie viventi, animali e vegetali.

Di seguito sono descritte le principali strategie utilizzate dai micoplasmi per colonizzare i tessuti bersaglio e le modalità attraverso le quali questi microrganismi interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite.

### 1.3.1— Fattori di virulenza

Il parassitismo è reso possibile da sofisticati meccanismi che permettono ai micoplasmi di colonizzare i tessuti dell'ospite sfuggendo al sistema immunitario.

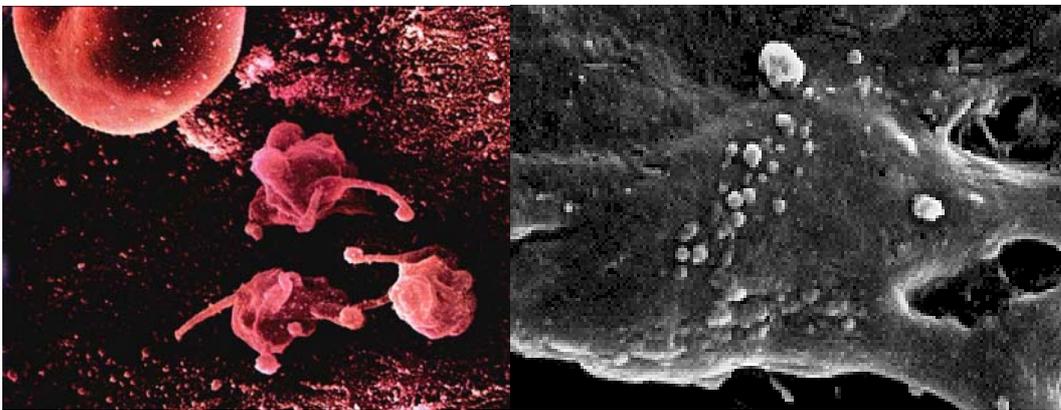
I fattori di patogenicità dei micoplasmi sono in gran parte sconosciuti. Inoltre la virulenza di una specie patogena è estremamente variabile da ceppo a ceppo e

oscillante nel tempo. Le infezioni causate da micoplasmi seguono in genere un andamento di tipo cronico e raramente di tipo acuto. In quest'ottica i micoplasmi potrebbero essere considerati “parassiti ideali” in quanto generalmente vivono in “armonia” con l'ospite.

Le basi molecolari della patogenicità dei micoplasmi rimangono ancora poco chiare, il quadro clinico delle infezioni umane e animali causate dai micoplasmi è da attribuire maggiormente ai danni causati dalla risposta immunitaria e infiammatoria dell'ospite, piuttosto che ai diretti effetti tossici delle componenti micoplasmatiche. Tra questi, i perossidi di H<sub>2</sub> e altri radicali ossigenati, frutto del metabolismo del micoplasma, possono alterare il movimento delle ciglia e danneggiare la membrana della cellula ospite. Non sono stati individuati enzimi o tossine.

Notevole importanza per la patogenesi hanno le strutture di adesione, veri organuli che fuoriescono dal corpo del micoplasma come braccia, riscontrate *nel M.pneumoniae, M.gallisepticum, M.hominis e M.hyopneumoniae* (Fig 3). Alcune di queste strutture sono state identificate e sono stati sequenziati i geni che codificano per esse. Ad esempio due adesine appartenenti al *M.pneumoniae* ed al *M.genitalium*, denominate P1 and MgPa sono state confrontate tra loro; molto simili tra loro, sono costituite da delle proteine di membrana che possiedono sulla superficie cellulare dei siti di ancoraggio per specifici recettori posti sulla cellula dell'ospite. Il sequenziamento dei geni di queste due adesine

ha messo in evidenza la presenza di numerose sequenze ripetute in una percentuale che va dal 4,7% all'8% dell'intero genoma a seconda del micoplasma considerato. Apparentemente questa presenza di sequenze ripetute prive di significato contrasta con l'idea di genoma ridotto al minimo essenziale dei micoplasmi; si è invece scoperto che queste sono fondamentali per il microorganismo quando è sottoposto a pressione immunitaria, in quanto grazie ad esse si può realizzare un riassortimento genetico casuale (Fraser et al 1995, Himmelreich et al 1996, Himmelreich et al 1997) che determina l'espressione di nuovi epitopi che permettono al micoplasma di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario.



**Fig. 3: Strutture di adesione presenti in *Mycoplasma hominis***

I micoplasmi mostrano una specificità piuttosto stretta nei confronti dell'ospite, dovuta probabilmente alle loro richieste nutrizionali alle quali la vita parassitaria li obbliga; esistono, comunque numerosi esempi della loro presenza in ospiti e tessuti diversi dai loro normali habitat.

I tessuti elettivi dei micoplasmi parassiti dell'uomo e degli animali sono le superfici mucose dei tratti respiratori e urogenitali, gli occhi, il canale alimentare, le ghiandole mammarie e le articolazioni, la loro localizzazione può essere anche intracellulare.

Infatti, anche se per un periodo ridotto, la localizzazione intracellulare può proteggere il micoplasma dagli attacchi del sistema immunitario e degli antibiotici e ciò può spiegare la grande difficoltà che si incontra nell'eradicare i micoplasmi dalle colture di cellule infette.

Un esempio di localizzazione intracellulare è dato dal *Mycoplasma penetrans*, dal *M.genitalum*, e dal *M.hominis*: essi sono, infatti capaci di penetrare all'interno delle cellule umane sia in vivo sia in vitro, attraverso l'interazione con molecole di clatrina. In seguito all'ingresso dei micoplasmi nella cellula ospite si verifica un riarrangiamento del citoscheletro mediato dai vari segnali.

La gran parte dei micoplasmi umani e animali aderiscono tenacemente allo strato epiteliale dei tratti respiratorio e urogenitale, invadendo raramente i tessuti, per questo motivo sono considerati parassiti di superficie.

L'attacco dei micoplasmi alla cellula ospite si esplica attraverso una combinazione di legami idrofobici e ionici. La natura plastica della membrana permette di adattare la loro forma a quella della superficie dell'ospite e proteggersi dalla fagocitosi.

Il meccanismo di invasione cellulare non è ancora chiaro, però è noto che il *M.penetrans* e il *M.genitalum*, tra i più studiati perché patogeni umani, utilizzano particolari strutture di ancoraggio che sono state rinvenute anche in altri. Si pensa che il contatto tra i micoplasmi e la membrana della cellula ospite sia così stretto da dare origine o ad una fusione delle 2 membrane, oppure al passaggio tramite "iniezione" del contenuto citoplasmatico del micoplasma nella cellula ospite. Una fusione tra la membrana del micoplasma e quella della cellula ospite è teoricamente possibile, ma non ci sono ancora dati sperimentali che supportano questa teoria. La fusione delle 2 membrane potrebbe portare ad un'alterazione nella composizione e nella permeabilità della membrana della cellula ospite e permette il diretto ingresso di enzimi idrolitici del parassita all'interno dell'ospite (Razin 1993).

L'adesione dei Mollicutes alle cellule ospiti è considerato un prerequisito per la colonizzazione e l'infezione; la perdita della capacità di adesione in mutanti porta ad una perdita dell'infezione, il ritorno al fenotipo di citoaderenza è accompagnato da un ritorno dell'infettività e della virulenza (Razin 1991).

L'intima interazione dei micoplasmi con la superficie delle cellule ospiti determina in queste ultime reazioni in grado di alterare le funzioni di alcuni geni; è noto che i micoplasmi inducono la produzione di alcune citochine, che possono effettivamente mediare un vasto range di azioni, come la proliferazione e differenziazione cellulare.

Nonostante le sopra menzionate citoadesine giochino un ruolo prioritario nella cito-adesione, il processo appare multi-fattoriale, includendo anche un certo numero di proteine di membrana accessorie; queste proteine di membrana accessorie agiscono in concerto con gli elementi del citoscheletro per facilitare il movimento laterale e la concentrazione delle molecole di adesina nel punto di attacco. Le prime adesine scoperte sono state quelle dei *M.penetrans* e *M.genitalium*, il contatto con la cellula può alterare e interferire con i meccanismi di trasporto della cellula ospite, per esempio, si sa che la distruzione dei canali per il potassio (k<sup>+</sup>) delle cellule ciliate dell'epitelio bronchiale, causata dal *M.hiopneumoniae*, depolarizza la membrana cellulare, con la conseguente stasi delle ciglia.

La membrana della cellula ospite risulta vulnerabile anche da parte di sostanze tossiche rilasciate da micoplasmi adesivi (*M.necroiticum*) il loro ingresso nell'ospite intacca l'integrità cellulare e le sue funzioni, infatti, la presenza del micoplasma può esporre il nucleo e il citoplasma all'azione di enzimi idrolitici, proteasi, nucleasi e fosfolipasi micoplasmiche.

I prodotti tossici del metabolismo dei micoplasmi, come il perossido di idrogeno e i radicali superossido, sono responsabili degli effetti distruttivi riscontrati nelle cellule.

### 1.3.2- Interazione dei micoplasmi con il sistema immunitario

I micoplasmi hanno evoluto complicati sistemi sia per evadere che per modulare a proprio vantaggio la risposta immunitaria dell'ospite.

La capacità di eludere le difese immunitarie dell'ospite è possibile grazie alla continua variazione del sistema antigenico di superficie (Kelley & Wise, 2002; Robertson & Meyer, 1992; Rosengarten & Wise, 1990; Yogev et al., 1991).

I micoplasmi, come tutti i microrganismi, sono coinvolti in una sfida contro le continue variazioni dell'ambiente esterno, e rispondono a questa sfida con meccanismi adattativi e strategie atte a rilevare e rispondere ai cambiamenti ambientali, adattandosi così alla nuova situazione. Per questo i micoplasmi hanno evoluto degli ottimi sistemi adattativi, il primo dei quali è senza dubbio la variabilità antigenica superficiale, che entra a far parte di un meccanismo normalmente conosciuto come "plasticità fenotipica" (Razin S., 1998). La plasticità fenotipica è stata definita come l'abilità di un singolo genotipo a produrre più di una forma alternativa per ciò che concerne la morfologia, lo stato fisiologico ed il comportamento adottato in risposta alle condizioni ambientali.

La variazione antigenica è una delle vie più diffuse per attuare questa plasticità e consiste nella capacità di alterare le caratteristiche antigeniche dei propri componenti di superficie in modo da aumentare la colonizzazione ed evadere il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

In assenza di una parete cellulare e di uno spazio periplasmico, la maggior parte delle proteine di superficie coinvolte nel processo di variabilità antigenica sono lipoproteine di membrana; questi componenti superficiali, ancorati saldamente alla membrana plasmatica tramite catene di gruppi acilici, sono i principali antigeni immunodominanti, e la loro presenza nella membrana cellulare dei micoplasmi è notevole (Razin S., 1998),

Alla base della variazione osservate sulla superficie degli antigeni sono stati evidenziati 2 fenomeni: i microbi percepiscono i segnali dell'ambiente esterno e vi rispondono con l'espressione di geni della virulenza che portano alla sintesi di prodotti necessari per la sopravvivenza nell'ospite.

Oppure, la popolazione microbica può spontaneamente e casualmente generare diverse popolazioni cellulari con differenti fenotipi antigenici, degli "eterotipi" che sopravviveranno alle specifiche risposte dell'ospite capaci normalmente di eliminare il fenotipo predominante. La frequenza di queste variazioni genetiche è decisamente alta rispetto alla normale frequenza di mutazioni spontanee; la presenza quindi di un largo spettro di varianti antigeniche permette al patogeno di sopravvivere, grazie alla generazione della particolare variante richiesta per

l'improvviso cambio delle condizioni ambientali o per sfuggire al sistema immunitario.

Nei micoplasmi, l'apparente scarsità di geni regolatori funzionanti da sensori per gli stimoli ambientali suggerisce che l'adattamento di questi microrganismi alle variazioni ambientali non sia una risposta ai segnali ma che si attui principalmente tramite questo sistema di mutazioni genetiche casuali e spontanee (Razin S., 1998).

La strategia utilizzata per mantenere questa abilità è la presenza di molteplici geni variabili raggruppati in famiglie; infatti l'oscillazione di un singolo gene fra ON e OFF, unita all'abilità di ciascun gene di produrre differenti varianti in dimensioni dello stesso prodotto porta ad avere un grande repertorio di varianti antigeniche di superficie.

Queste famiglie di antigeni superficiali è formata da lipoproteine variabili di superficie chiamate Vsps, che vanno incontro ad una alta frequenza non coordinata di variazioni di fase (stato ON–OFF) e dimensioni.

In aggiunta a quanto finora detto, è stato osservato che i differenti ceppi di *Mycoplasma bovis* isolati in campo possiedono un complesso di geni *vsp* diverso fra i vari ceppi; la scoperta che *Mycoplasma bovis* possiede differenti versioni della stessa famiglia di geni *vsp*, fatto responsabile di una ancor maggiore amplificazione delle possibilità di varianti fenotipiche, sottolinea ulteriormente

come i micoplasmi riescano ad utilizzare in modo efficiente il loro limitato materiale genetico per aumentare le proprie capacità adattative.

La variabilità antigenica di superficie non è il solo meccanismo con cui i micoplasmi interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite, essi sono infatti in grado di grado intervenire direttamente determinando fenomeni di immunosoppressione e di immunostimolazione.

La capacità dei micoplasmi di indurre in vivo la produzione di citochine in grado di modulare la risposta immunitaria dell'ospite contribuisce alle loro proprietà patogene ed è responsabile di molte delle patologie osservate. Le principali modificazioni indotte dai micoplasmi sulla risposta immunitaria includono: la soppressione e la stimolazione policlonale dei linfociti T e B; l'induzione della produzione di citochine; l'aumento della citotossicità dei macrofagi, cellule natural killer e linfociti T e l'attivazione del complemento. Dati recenti hanno stabilito che, sia in vivo sia in vitro, i micoplasmi stimolano i linfociti in maniera non specifica. L'induzione della produzione di citochine è il maggiore fattore di virulenza per molti batteri. Le citochine indotte hanno un'ampio spettro di effetti sulle cellule eucariotiche e sono riconosciute come importanti mediatori delle patologie tessutali nelle malattie infettive. Sebbene i micoplasmi eludano la fagocitosi, sembra che interagiscano con i fagociti mononucleati e polimorfonucleati, inibendoli o stimolandoli, per mezzo di effetti mediati, direttamente o indirettamente, da citochine; molti micoplasmi

inducono la produzione di citochine da parte delle cellule T (come le IL-2, IL-4 o l'interferone gamma). Queste citochine esercitano diversi effetti su fagociti e linfociti e spezzano l'equilibrio tra le popolazioni Th1 e Th2 dei linfociti CD4 (+), influenzando la direzione delle fasi effettrici della risposta immunitaria ed aumentando l'attività delle cellule natural killer (NK). La capacità di sincronizzare la produzione di citochine, nonché quella di certe specie di micoplasmi di indurre citochine sottoregolanti, gioca indubbiamente un ruolo importante nell'infiammazione micoplasma indotta e contribuisce all'instaurarsi di influenze sinergiche o antagoniste sulle cellule del sistema immunitario dell'ospite. Le molecole e i mediatori rilasciati dalle cellule in risposta ai componenti micoplasmatici o ai loro derivati, aumentano l'espressione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e II e l'adesione di costimolatori cellulari ai linfociti e alle cellule endoteliali, inducendo la "corsa" leucocitaria nel sito di infezione e causando danni tissutali. La modulazione dell'attività di monociti/macrofagi è stata dimostrata in vitro nell'attività tumorale mediata dal TNF- ALFA (fattori di necrosi tumorale) in diverse linee di cellule tumorali.

Alcuni Mycoplasmi, che possiedono il sistema arginina-diidrolasi, producono nell'organismo ospite una deplezione di questo aminoacido, fatto che si è mostrato responsabile di un certo grado di immunodepressione. La deplezione della L-arginina, aminoacido essenziale, ha provocato infatti in cellule in vitro

un effetto immunodeprimente molteplice, che si è annullato aggiungendo arginina nel mezzo di coltura. In vivo la questione deve essere ancora esaminata approfonditamente, e per ora si è osservata una difficoltà nella riproduzione e nella sopravvivenza di linfociti umani localizzati in tessuti poveri di questo aminoacido come conseguenza di una precedente infezione sostenuta da Mycoplasmi idrolizzanti l'arginina.

Altri micoplasmi hanno dimostrato invece degli effetti tossici verso le cellule linfoidi; come già illustrato in precedenza alcuni micoplasmi sono in grado di provocare morte apoptotica dei linfociti.

Nell'ultima decade si è sviluppata una certa attenzione per le infezioni sostenute da Mycoplasmi nei malati di AIDS: si è parlato di un loro possibile ruolo come cofattori nella patogenesi dell'AIDS, ma di certo si sa che *M.fermentans* e *M.penetrans*, i due Mycoplasmi associati alla Sindrome da Immunodeficienza Acquisita, sono in grado di provocare una morte delle cellule linfoidi che sembra di tipo apoptotico, in quanto si osserva frammentazione del DNA e cromatinolisi. In particolare è stato osservato che *M.fermentans* è capace di aderire e di invadere vari tipi di cellule umane ed animali; il microorganismo può entrare nel citoplasma dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e nei monociti umani causando effetti citopatici variabili, probabilmente dipendenti dalla natura della linea cellulare infetta.

Un esempio che fa capire la complessa rete di relazioni che si possono instaurare fra micoplasmi e cellule del sistema immunitario è portato da *M.hyorhina*; il microrganismo è in grado di rilasciare nel surnatante di una coltura cellulare infettata con questo patogeno della specie suina un fattore sensibile alle proteasi capace di inibire il rilascio dell'Interleuchina 2 (IL-2) da parte dei linfociti T; l'IL-2 viene normalmente rilasciata dai linfociti T in risposta ad un antigene estraneo all'organismo. Lo stesso fattore soppressivo rilasciato da *M.hyorhina* si è anche dimostrato inibitorio nei confronti dei linfociti B di ratto stimolati con LPS di *E.coli*.

Ancora, l'abilità di certi micoplasmi di stimolare la produzione di una serie di citochine down-regulating quali l'IL-10, l'IL-13 e forse il TGF- $\beta$  contribuisce all'evasione dei meccanismi immunitari dell'ospite attraverso il perturbamento delle funzioni dei macrofagi e dei fagociti, la diminuzione della produzione delle citochine proinfiammatorie e la proliferazione delle cellule T, deprimendo quindi il sistema immunitario su molteplici fronti.

Oltre agli effetti immunodepressivi, i micoplasmi possiedono anche un'attività stimolante il sistema immunitario: alcuni micoplasmi, detti mitogenici, sono in grado infatti di stimolare la replicazione delle cellule immunitarie sia in vitro che in vivo.

La stimolazione mitogenica policlonale dei linfociti non è limitata solamente ai linfociti del proprio ospite naturale, così che linfociti umani possono venire

stimolati da Mycoplasmi animali e viceversa. I Mycoplasmi hanno dimostrato di esplicare questa attività mitogenica nei confronti dei linfociti B, linfociti T, cellule NK, monociti ed anche cellule polimorfonucleate.

La stimolazione delle cellule immunitarie dell'ospite da parte dei micoplasmi avviene in modo diretto o tramite la secrezione di fattori solubili, che giocano il ruolo più importante nelle interazioni fra questi batteri e le cellule del sistema immunitario; così come si è visto per le citochine down-regulating, è presente quindi anche una stimolazione della secrezione di citochine up-regulating capaci di stimolare il sistema immunitario.

Queste citochine proinfiammatorie come l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, il TNF- $\alpha$  sono responsabili, oltre che della stimolazione del sistema immunitario, anche della comparsa di forti risposte infiammatorie sistemiche e locali quali anche cachessia, febbre, rilascio di proteine di fase acuta, malessere generale, shock settico e necrosi emorragica delle cellule tumorali.

Comunque, al momento attuale non si sono ancora identificati i componenti cellulari micoplasmatici capaci di indurre il rilascio delle citochine up-regulating; si è solamente osservato che il rilascio di queste sostanze è indotto sia da microrganismi viventi che da batteri morti o da frazioni della membrana plasmatica.

Il sistema immunitario è quindi coinvolto nello sviluppo di lesioni e nell'esacerbazione dell'infiammazione e della malattia indotta dai micoplasmi;

l'abilità mostrata da questi microrganismi nello stimolare linfociti e macrofagi o comunque di turbare l'omeostasi del sistema immunitario, può portare allo sviluppo di patologie autoimmuni.

## 1.4- Diagnosi delle infezioni sostenute da micoplasmi

La visita clinica degli animali infetti, rende improbabile che si possa effettuare una diagnosi certa di micoplasmosi; l'enorme varietà di sintomi che caratterizzano le patologie causate da questi microrganismi rendono necessari esami di laboratorio specifici per arrivare ad una diagnosi. Vari sono i metodi utilizzati:

### **Coltura in vitro**

Si allestisce a partire da tamponi oculari, auricolari, nasali etc, latte, prelievi di fluido articolare in caso di artriti e talvolta anche sangue. La coltivazione in vitro dei micoplasmi è resa difficoltosa dalle già accennate esigenze nutritive di questi batteri. Si effettua su terreno liquido o su terreno solido una temperatura costante di 37°C. Generalmente occorrono 36-48 ore affinché il terreno inizi a diventare torbido, segno inequivocabile della crescita batterica.

le colonie si iniziano a vedere ad occhio nudo dopo circa 72 h, il diametro max. è di circa 1 - 2 mm. Su terreno solido possono presentare più centri di approfondimento. In 4°-5° giornata è caratteristica la presenza di “films and spots”, un'esile pellicola di grassi sulla superficie della piastra e piccoli punti scuri (sali precipitati) nello spessore dell'agar.

L'isolamento rappresenta il metodo elettivo di diagnosi, ma purtroppo sono molto frequenti le contaminazioni dei terreni da parte di altri microrganismi o di altri micoplasmi.

### **Identificazione biochimica:**

è una procedura piuttosto lunga perché deve essere preceduta dall'isolamento di alcune colonie su terreno solido; è possibile utilizzare come marker metabolico per *M.bovis* il piruvato (Megrid et al., 2001): *M.bovis* è in grado di utilizzare questa sostanza, provocando un abbassamento del pH e quindi il viraggio dell'indicatore (solitamente rosso fenolo) dal rosso al giallo-arancio.

- Catabolismo del glucosio
- Idrolisi dell'arginina
- Riduzione del sale di tetrazolo
- Inibizione della crescita, inibizione metabolica e inibizione della formazione di film(Hill, 1977; Thorns, 1978; Boothby et al., 1981)
- Immunofluorescenza e immunoistochimica, che permettono di evitare le contaminazioni (Muenster et al., 1979; Knudtson et. al., 1986; Gourlay et al., 1989; Reilly et al., 1993; Adegboye et al., 1995)

**ELISA**: permette il rilevamento degli antigeni tramite l'utilizzo di un siero immune di coniglio o di anticorpi monoclonali (Nielsen et al., 1987; Brown et al., 1990; Heller et al., 1993; Ball et al., 1994); è possibile effettuare anche la ricerca di anticorpi specifici nel sangue o nel latte (Byrne et al., 2000)

- Dot immunoblotting su membrana (Ter Laak & Noordergraaf, 1987 ; Poumarat et al., 1991; Poumarat et al., 1992)
- Fissazione del complemento
- Ibridazione di DNA probes, utilizzata spesso per *M.gallisepticum* (Dohms et al., 1993), *M.hyopneumoniae* (Stemke, 1989) e *M.genitalium* (Hyman et al., 1987; Risi et. al., 1988) e PCR, solitamente utilizzate nella ricerca, sono sempre più utilizzate anche nella diagnostica di routine; per quanto riguarda la PCR, una delle regioni bersaglio più utilizzate è costituita dal gene per l'rRNA 16S (Chavez & Gonzales, 1995)
- Western immunoblot: non è molto utilizzato nella diagnostica di routine, ma rappresenta un ottimo strumento per la ricerca, perché permette di confrontare i pattern di diversi campioni o diversi stipiti
- Emoagglutinazione indiretta (Poumarat et al., 1987)
- Emolisi radiale (Howard et al., 1977)

E' importante sottolineare che gli anticorpi monoclonali conferiscono una maggiore specificità ai test immunologici, evitando molti problemi legati alla cross-reattività dei sieri policlonali (Poumarat et al., 1991; Ball et al., 1994a; Ball et al., 1994b; Brank et al., 1999); nonostante questo vantaggio, alcuni autori (Poumarat et al., 1996) suggeriscono l'uso di sieri policlonali vista la variabilità antigenica dei micoplasmi e di *M.bovis* in particolare.

La ricerca degli anticorpi risulta meno laboriosa delle classiche tecniche colturali, ma la sensibilità non è molto alta e, inoltre, le infezioni non possono essere rilevate nel periodo di incubazione (Thorns, 1978; Poumarat et al., 1996).

**PCR:** sicuramente è la tecnica più sensibile e più specifica per la diagnosi.

Utilizzata generalmente dopo l'isolamento su terreno liquido o solido del micoplasma, essa consente di effettuare oltre alla diagnosi, delle indagini biomolecolari mirate, volte a mettere in evidenza ad esempio determinati sottotipi di un micoplasma.

## Capitolo 2

### ***Mycoplasma agalactiae e Agalassia Contagiosa***

*Mycoplasma agalactiae* è l'agente eziologico responsabile dell'Agalassia Contagiosa dei piccoli ruminanti.

L'Agalassia Contagiosa è una patologia conosciuta da almeno 2 secoli, come riportato da Zavagli (1951); fu descritta per la prima volta da Metaxa in Italia nel 1816 e venne chiamata "Agalassia Contagiosa" da Brusasco nel 1871 (Madanat A et al. 2001).

Dal 1996 ad oggi è stata denunciata la presenza della malattia in 31 paesi in 4 continenti. L'unico continente nel quale pare non essere presente è l'Oceania (Corrales et al 2007). L'Agalassia Contagiosa è endemica nelle regioni che si affacciano sul mediterraneo (Bergonier et al., 1997; Lambert, 1987), in Africa e Asia, mentre in America, con eccezione degli Stati Uniti è descritta come sporadica (Corrales et al 2007).

L'Agalassia Contagiosa determina notevoli danni economici soprattutto in quelle aree dove è praticato l'allevamento ovi-caprino a prevalente attitudine lattifera.

I primi casi in Sardegna sono stati segnalati attorno ai primi anni 80, probabilmente la malattia è stata importata dalla Sicilia con l'acquisto di alcuni arieti.

L'agente eziologico responsabile di questa patologia è stato isolato per la prima volta da Bridre e Donatien nel 1923, ed è stata la seconda specie di micoplasma isolato, chiamato all'inizio "Anulomices agalaxie", venne poi chiamato *Mycoplasma agalactiae* da Freundt nel 1957. *M.agalactiae* è segnalato particolarmente nelle pecore come classico agente di Agalassia Contagiosa (Bergonier 1977). Tuttavia simili danni possono essere causati nelle capre da altre specie di micoplasmi (Sarris 1996, Bergonier 1997, Nicholas 1996) inclusi nel cluster micoides, come ad es. *M. mycoides subsp. Mycoides large colony* (LC), *M. capricolum subsp. Capricolum*, *M. mycoides subsp. Capri*. Nelle capre una patologia con identiche manifestazioni cliniche è causata da *M. putrefaciens*.

*M. agalactiae* è un batterio polimorfo che misura 120- 250 nm, similmente ad altri micoplasmi ha un genoma molto piccolo di 877,438 bp (Pascal S.P. et al. 2007), nella tabella xx sono riportate alcune caratteristiche del genoma del *M.agalactiae*, ed è privo di parete cellulare. Come tutti i micoplasmi non è sensibile alla penicillina e suoi analoghi ma è sensibile allo shock osmotico e agli effetti dei detergenti. Cresce in laboratorio in terreni ricchi sia solidi che

liquidi e previa aggiunta di colesterolo, il suo sviluppo è favorito da condizioni di aerobiosi.

*M.agalactiae* non fermenta il glucosio e idrolizza arginina e urea Per lungo tempo è stato considerato dal punto di vista antigenico come un microorganismo uniforme, la sua eterogeneità antigenica è stata riportata soltanto poco tempo fa (Bergonier, 1996; Solsona, 1996; Tola 1996).

Features <sup>a</sup>	MA	MYPU	MMOB	MHP	MCAP	MmmSC
Genome size (bp)	877,438	963,879	777,079	892,758	1,010,023	1,211,703
GC content (%)	29.7	26.7	24.9	28.6	23.77	24.0
Gene density (%)	88	90	90	91	90	81
Total number of CDS	751	782	635 (633) <sup>b</sup>	692 (691)	827	985 (1016)
HP	166	204	33 <sup>c</sup>	127	56	266
CHP	136	92	17 <sup>c</sup>	261	104	138
CDSs with predicted function	404	486	463	304	367	581
Pseudogenes <sup>d</sup>	45	ND	ND	ND	ND	ND
Average protein length (aa)	343	371	370	388	365	324
Proteins with predicted MW > 300 kDa	3	2	2	3	0	0
Start codon usage (%)						
AUG	93	78	93	87	94	77
UUG	4	14	4	8	3	12
GUG	3	6	2	3	2	10
Other	0	2	0	2	1	0
Stop codon usage (%)						
UAA	75	86	85	82	74	71
UAG	25	14	15	18	23 <sup>e</sup>	29
rRNA sets	2	1	1	1	2	2
tRNA	34	29	28	30	31	30
Tryptophan codon usage (%)						
UGA	89	91	92	73	94	95
UGG	11	9	8	23	6	5

<sup>a</sup>Data previously published [23, 26–28] with the exception of the average protein length, the high molecular weight protein prediction, and the start and stop codon usages that were obtained from the MollGen Web site (<http://cbl.labri.fr/outils/molligen>).

<sup>b</sup>Number of CDS indicated in the NCBI database are mentioned when different from that published.

<sup>c</sup>During annotation of the *M. mobile* genome (MMBO), several HP and CHP were documented as “expressed proteins” based on proteomic data [28] and therefore these values are lower than those reported for the other genomes.

<sup>d</sup>Each part of a pseudogene is counted.

<sup>e</sup>TGA, ATA, or AGT have been chosen as stop codon for 15 CDSs from *M. capricolum* subsp. *capricolum* (MCAP) CDS, coding sequence; CHP, conserved hypothetical protein; HP, hypothetical protein; HP, hypothetical protein; MA, *M. agalactiae* PG2; MCAP, *M. capricolum* subsp. *capricolum*; MHP, *M. hyopneumoniae* 232; MmmSC, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC PG1; MMOB, *M. mobile* 163K; MW, molecular weight; MYPU, *M. pulmonis* UAB CTIP; and ND, not determined.

doi:10.1371/journal.pgen.0030075.t001

**Tab 9: caratteristiche generali genoma del *M. agalactiae* (MA) comparate con quelle di altre specie di micoplasma dello stesso gruppo filogenetico (MYPU, MMOB, MHP) e di altri micoplasmi dei ruminanti filogeneticamente molto lontani (MCAP and MmmSC). (Da:Pascal S.P. et al. 2007)**

*M. agalactiae* è sensibile alle alte temperature, viene infatti inattivato in 5 min a 60°C e in 1min a 100°C sopravvive invece per 4 mesi a 8°C e per 8 9 mesi a -20°C, è sensibile anche agli uv.i normali disinfettanti sono in gradodi distruggerlo in 15 -20 min come cloro formalina (Bergonier, 1997; Tsaknakis, 1992).

L'Agalassia Contagiosa è una malattia ad andamento acuto, subacuto o cronico. Il germe ha un triplo tropismo: mammario, articolare, oculare, ma sono possibili anche forme respiratorie. Si contagia da animale ammalato ad animale sano principalmente per contatto diretto, attraverso il latte, la secrezione lacrimale e secondariamente tramite le urine e le feci di animali con sintomatologia clinica manifesta, e attraverso il contatto con portatori asintomatici che fungono da serbatoio del patogeno anche per diversi anni. Altro mezzo di contagio, possibile ma non frequente, è il sangue soprattutto in casi di interventi chirurgici, di marchiatura o tosatura e forse per mezzo di artropodi ematofagi. Nei portatori sani la principale localizzazione è nei condotti uditivi esterni, oltre a vulva, tonsille, bocca, naso. Le fonti di infezione ambientali sono meno importanti vista la scarsa resistenza dei microrganismi all'ambiente esterno (sensibili al calore e all'essiccamento): alimenti, erba dei pascoli, strumenti e oggetti che vengono a contatto con le mucose.

*M.agalactiae* si impianta sulla mucosa orofaringea (frequentemente al momento della suzione), oculocongiuntivale, mammaria e probabilmente respiratoria e

genitale. La via di infezione più frequente rimane comunque la intracanalicolare mammaria durante il processo di mungitura sia essa manuale che meccanica. La diffusione varia nell'ambito dello stesso gregge a seconda della localizzazione primaria. Se l'infezione avviene durante la lattazione il contagio si propaga in breve tempo, se invece, ha luogo per altre vie (durante l'asciutta), il contagio tra animali avviene lentamente per diffondersi velocemente durante la lattazione. L'infezione può passare anche da un gregge all'altro normalmente per contatto diretto o in seguito all'introduzione di nuovi capi, in particolare riproduttori (Farina e Scatozza 1998).

L'insorgenza della malattia all'interno dell'allevamento è legata ad alcuni fattori:

- fattori legati all'animale: specie ospite (AC più grave nei caprini rispetto agli ovini), età (i giovani, soprattutto capretti, più sensibili degli adulti), sesso e stato fisiologico (femmine gravide o in lattazione sono più sensibili), stato immunitario (è presente un certo grado di resistenza alle reinfezioni).
- Fattori legati all'ambiente: mungitrice meccanica difettosa, stabulazione (tipo, ambiente, igiene)
- fattori climatici: stress ambientali, tosatura precoce, stress alimentari

Più in generale l'aumento di prevalenza in un gregge è dovuto allo stadio fisiologico delle femmine, e ai movimenti degli animali.

L'Agalassia Contagiosa raramente si presenta in forma iperacuta con febbre elevata, anoressia, arresto della ruminazione, aborto, solitamente morte per setticemia (Villalba et al 1992), nelle forme acute e subacute si ha ipogalassia seguita da agalassia, poliartriti e cheratocongiuntivite, aborto. Le forme croniche, in cui si osservano lesioni mammarie e o articolari, conseguono generalmente a forme acute e subacute. Possono inoltre esservi forme "atipiche" (pleuropolmonite della capra) e forme asintomatiche.

La persistenza clinica di AC in un gregge è generalmente di diversi mesi, se non si attua un intervento radicale. L'evoluzione presenta un carattere di cronicità per l'animale e il gregge colpito. Non è raro notare una ricorrenza clinica alla lattazione successiva sugli stessi animali o su nuovi capi.

Al primo contatto di un gregge con il *Mycoplasma agalactiae* si manifestano rapidamente i sintomi clinici della malattia; normalmente essi appaiono durante il periodo dei parti e l'inizio della lattazione (Gil et al 2003, Real et al 1994, Szeredi et al 2003). In alcune greggi la malattia può rimanere asintomatica (Corrales et al 2004, Gil et al 1999).

I sintomi clinici persistono nel gregge per settimane o mesi (DaMassa et al 1987, Gil et al 2003, Sanchis et al 2000), la terapia medica nei confronti del patogeno non determina l'eliminazione microbiologica dello stesso, così nuovi casi clinici possono presentarsi nella lattazione successiva (Villalba et al 1992). Alcuni allevamenti ovini sono stati monitorati per sette anni consecutivi, nei quali il

patogeno alternava dei periodi in cui si manifestava con segni clinici ad altri nei quali non si riusciva ad isolarlo (Corrales et al 2007). Il pericolo, dal punto di vista epidemiologico, giunge proprio da questo comportamento che il microrganismo possiede; la sua apparente scomparsa, con esplosione anche dopo vari anni di nuove vere e proprie epidemie.

I sintomi clinici sono caratterizzati generalmente dalla triade artrite, mastite e cheratocongiuntive. Non sempre essi sono gli unici e raramente si manifestano simultaneamente su uno stesso animale. Inizialmente gli animali presentano sintomi clinici aspecifici che spesso passano inosservati tra i quali: debolezza, calo dell'appetito, febbre, lievi problemi neurologici, diarrea. Essi possono anche portare ad uno stato di emaciazione l'animale e condurlo fino alla morte senza far pensare ad un'infezione da mycoplasmi (Gil et al 2003, Sanchis et al 1998 e 2000, Szeredi et al 2003).

Tra i sintomi mammari inizialmente si ha un calo della produzione lattea che può essere da modesto a totale, il latte prende un colorito giallastro a causa della leucocitosi e presenta dei grumi che possono anche ostruire completamente il capezzolo. A volte l'aspetto è normale, altre diviene acquoso o ha tracce di sangue. La mastite generalmente è bilaterale, le mammelle sono calde e dolenti al tatto durante la fase acuta con ipertrofia dei linfonodi mammari. In fasi avanzate si ha la sclerosi del parenchima con indurimento e presenza di noduli (Gil et al 1999 e 2003, Hasso et al 1994, Sanchis et al 2000), Fig 4 e Fig 5.



Fig. 4. Lesioni cliniche causate dopo inoculazione con *Mycoplasma agalactiae*: (a) Severe enlargement and swelling of the right half of the right mammary gland. (b) Cut surface of the right mammary gland showing the presence of purulent exudates in the milk ducts. (c) Cut surface of the inoculated mammary gland exhibiting severe interstitial fibrosis and the absence of an inflammatory exudate. (d) Severe atrophy of the inoculated right mammary gland. (da: Castro-Alonso A. et al. 2008)

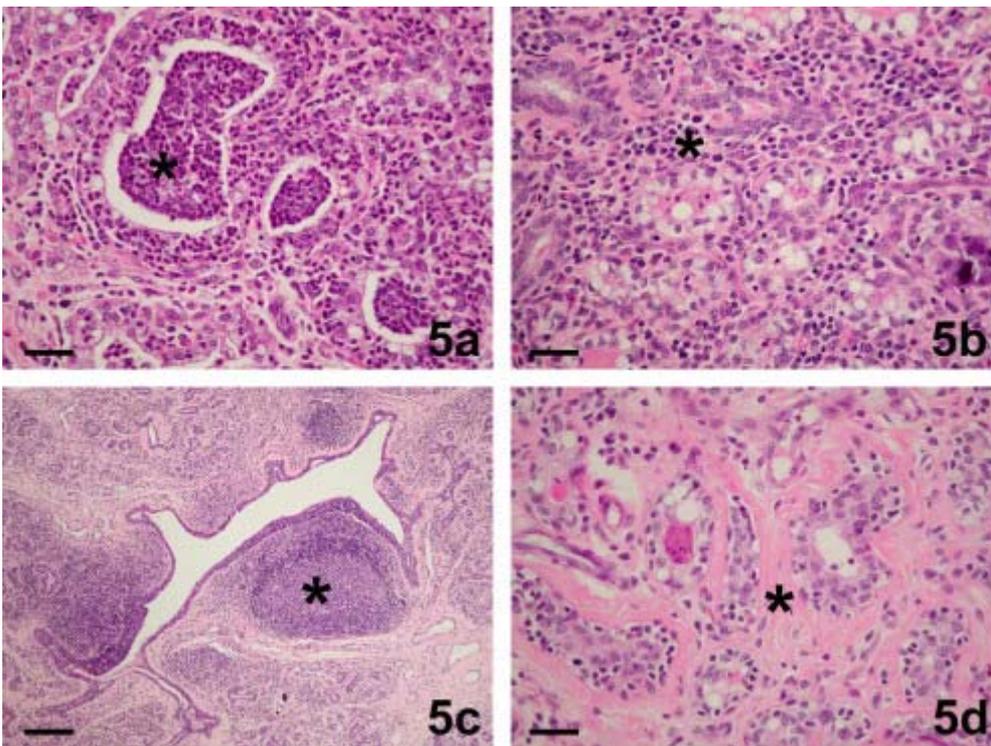
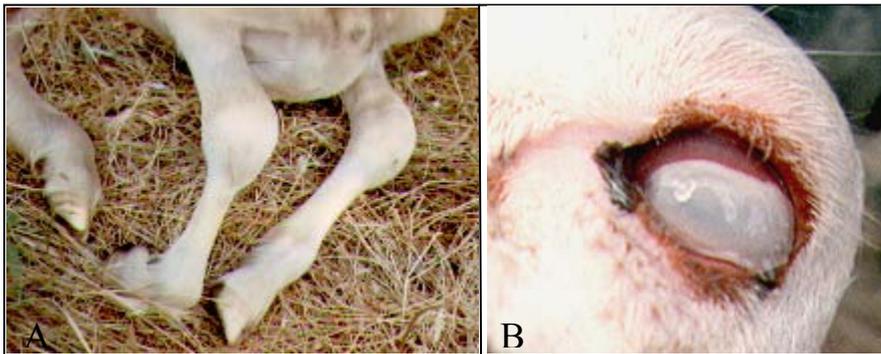


Fig. 5. Histopathological analysis of an experimentally-inoculated mammary gland: (a) 5 dpi. Diffuse, purulent mastitis composed of neutrophils and macrophages affecting the glandular acini and intralobular ducts (asterisk). The acinar epithelium shows degeneration, necrosis and neutrophilic exocytosis, H&E, bar = 45 µm. (b) 15 dpi. Severe, diffuse intralobular lymphoplasmacytic mastitis associated with discrete intralobular fibrosis and acinar atrophy (asterisk), H&E, bar = 40 µm. (c) 45 dpi. Chronic galactophoritis in which the subepithelial mononuclear inflammation is organized as lymphoid follicles (asterisk), H&E, bar = 80 µm. (d) 45 dpi. Severe acinar atrophy and fibrosis (asterisk) associated with discrete interstitial, periacinar, lymphoplasmacytic inflammation, H&E, bar = 40 µm. (da: Castro-Alonso A. et al. 2008)

Sintomi articolari variano da rigidità articolare a claudicazione fino ad animali che non riescono a camminare o a rimanere in stazione. Carpo, tarso e articolazione del ginocchio sono le più colpite da artriti o poliartriti, Fig 6(A) . Le articolazioni si presentano calde, gonfie e dolenti per un eccesso di produzione di liquido sinoviale; quasi mai nel processo infiammatorio è coinvolta la cartilagine (DaMassa et al 1987, Gil et al 2003, Hasso et al 1994, , Szeredi et al 2003), Fig 6 (B) .



**Fig 6: artrite (A) e congiuntivite (B) in pecore con infezione da *Mycoplasma agalactiae***

A carico dell'occhio si osserva congiuntivite o cheratocongiuntivite mono o bilaterale, che può condurre anche a cecità.

La malattia può coinvolgere anche il sistema respiratorio con semplici episodi di tosse fino a vere e proprie polmoniti fatali soprattutto nei giovani. Negli adulti spesso i sintomi respiratori non vengono osservati perché mascherati dalla

gravità della malattia a carico di altri apparati. Tamponi bronchiali o liquido di lavaggio bronchiolo alveolare, consentono l'isolamento del *M.agalactiae* anche in animali clinicamente sani provenienti da greggi infetti (Real et al 1994, Szeredi et al 2003, Villalba et al 1992)

L'aborto è un evento sporadico ma segnalato; le femmine che hanno abortito spesso presentano lesioni genitali (DaMassa et al 1987, Gil et al 1999, Villalba et al 1992, Szeredi et al 2003).

A causa della sua elevata morbilità e delle grosse perdite economiche che essa provoca, l'Agalassia Contagiosa è stata inserita nella lista B delle malattie dall'O.I.E. Oltre alle perdite di produzione latte si associano perdite economiche dovute alle terapie e al costo che spesso devono sostenere gli allevatori per acquistare capi da rimonta. È infatti su questa categoria di animali, soprattutto se è la prima volta che la malattia compare in allevamento, che si hanno i danni maggiori; spesso le artriti e le cheratocongiuntiviti colpiscono in maniera tale che costringono l'allevatore ad abbattere gli animali in quanto non si riesce a recuperarli con la terapia. Il patogeno risulta sensibile ad antibiotici della classe dei macrolidi e delle tetracicline. Tuttavia la terapia è efficace solo ad attenuare i sintomi clinici, ma non è sufficiente ad eradicare il patogeno. Gli anticorpi compaiono 10-15 giorni dopo l'infezione, l'acme si ha dopo 4-6 settimane e persistono con titoli elevati per oltre 3 mesi.

## **Strategie di controllo dell'Agalassia Contagiosa**

Il controllo dell'agalassia contagiosa, dovrebbe essere molto rigoroso soprattutto nelle aree dove la malattia è endemica. Purtroppo invece, a causa delle caratteristiche della patologia, che si presenta ad ondate anche a distanza di anni una dall'altra, fa sì che moltissimi allevamenti “convivano” con la malattia per molti anni pur risultandone ufficialmente indenni. Per questi motivi la prevalenza della malattia risulta essere sottostimata in quasi tutto il mondo (Corrales et al 2007).

Piani di controllo organizzati dovrebbero essere predisposti nelle regioni più colpite, in modo da riuscire ad avere dati certi sulla reale prevalenza della malattia, e conseguentemente poter organizzare piani strategici di intervento.

La messa a punto di sistemi diagnostici efficaci è il primo passo per mettere in evidenza quella che è la vera consistenza della malattia in una regione. La vaccinazione dovrebbe essere la misura di controllo raccomandata, ma essa salvo rari casi (Greco et al., 2002), non è in grado di evitare la patologia, ma solo di attenuarne la sintomatologia clinica, o al massimo di ridurre la circolazione del patogeno (Tola et al., 1999).

Quando *M.agalactiae* compare per la prima volta in un gregge, determina dei danni enormi, e spesso irreversibili. La strategia di controllo in questo caso si

potrebbe orientare verso due direzioni: nel caso in cui la malattia si presenti in zona ufficialmente indenne sarebbe meglio effettuare l'abbattimento dell'intero gregge e la disinfezione dei locali; nel caso in cui invece il gregge colpito si trovi in un'area endemica, le possibilità di controllo sono varie, in primis la terapia e poi la vaccinazione. Purtroppo però dopo trattamento antibiotico, alla remissione dei sintomi nelle greggi non fa seguito la scomparsa del patogeno; si creano anzi tutti i presupposti affinché la malattia si mantenga in forma subclinica, e quindi non più eliminabile se non con interventi radicali di stamping out. Fondamentale risulta la scelta dell'antibiotico, la modalità e i tempi di somministrazione. In un gregge colpito per la prima volta il trattamento dev'essere fatto su tutti gli animali e non solo su quelli sintomatici, per fare in modo che il mycoplasma circoli in maniera attiva nel gregge per il minor tempo possibile. Gli antibiotici di elezione per la terapia dell'agalassia contagiosa sono rappresentati dai macrolidi, come la tilosina, eritromicina e la spiramicina, i lincosamidi, la lincomicina, i chinoloni, l'enrofloxacin, e le tetracicline (Loria et al., 2003). L'uso combinato di antibiotici e farmaci antinfiammatori steroidei e non, permette una drastica riduzione dei sintomi clinici ed un quasi completo recupero della produzione di latte. Animali colpiti severamente, con scarsi recuperi post terapia dovrebbero essere abbattuti o perlomeno isolati dal resto del gregge. Simultaneamente ai trattamenti antibiotici, tutta l'azienda dovrebbe essere disinfettata per ridurre anche la carica ambientale dei mycoplasmi. Una

volta che controllata l'infezione acuta, bisogna avere molta cura nel management degli animali, soprattutto riguardo alle operazioni di mungitura, in quanto una delle modalità preferite dal mycoplasma per infettare la pecora, è proprio quella di passare da un capo malato ad uno sano proprio durante quest'operazione. Particolari attenzioni devono essere poste nel lavaggio della macchina mungitrice, nel dipping post mungitura, e nel controllo dei parametri di funzionamento della mungitrici (vuoto e pulsazioni), per evitare microtraumi mammari.

Da quanto esposto sopra, ci si rende conto di come l'agalassia contagiosa possa essere presente in un allevamento per anni senza rendersi manifesta se non con sporadici episodi di mastite, che il più delle volte vengono attribuiti ad altri patogeni in quanto non diagnosticati in laboratorio. Queste sono le situazioni più pericolose dal punto di vista epidemiologico, in quanto possono determinare un abbassamento del livello di guardia da parte dell'allevatore e del veterinario. Inconsapevoli dei rischi spesso gli allevatori movimentano gli animali o addirittura li vendono ad altri allevatori andando ad ampliare il raggio d'azione del patogeno. In allevamenti nei quali la malattia è cronica sono indispensabili alcune pratiche di routine, quali un trattamento antibiotico profilattico nei confronti del mycoplasma al momento della messa in asciutta degli animali e uno nel *post partum*. Andrebbero evitate anche le infezioni nella rimonta; al momento attuale l'unica soluzione per evitare la malattia nei giovani è la

vaccinazione. Vaccinare gli animali con i vaccini attualmente presenti in commercio però rappresenta un problema qualora si voglia fare un piano di eradicazione, in quanto la vaccinazione non consente poi di fare uno screening sierologico che differenzi gli animali infettatisi naturalmente da quelli vaccinati (Corrales et al 2007).

L'impatto socioeconomico per un allevamento infetto sporadicamente all'interno di zone enzootiche, a causa delle caratteristiche epidemiologiche della AC, è molto alto, in quanto ancora non esiste alcun mezzo di lotta realmente efficace.

Al momento, i vaccini sembrano rappresentare il principale strumento di lotta per il controllo della malattia. La profilassi vaccinale rappresenta infatti un fondamentale mezzo per la prevenzione delle malattie infettive e, se correttamente applicata, un'importante premessa per la loro eradicazione. Attualmente vengono impiegati per la vaccinazione contro *Mycoplasma agalactiae* vaccini spenti preparati a partire da ceppi isolati da allevamenti infetti, quindi incapaci di replicarsi nell'ospite ma con potere immunogeno conservato, e adiuvati con idrossido di alluminio. Questi vaccini inducono una risposta immunitaria di breve durata (4-5 mesi) e soltanto di tipo umorale. Tuttavia affinché un vaccino sia in grado di indurre un'immunizzazione durevole, specifica ed efficace è essenziale la capacità di stimolare anche una reazione di tipo cellulare. Inoltre l'impossibilità di distinguere un animale

vaccinato da uno infetto rende incompatibile la pratica vaccinale basata sui vaccini tradizionali come quelli spenti con l'eradicazione dell'infezione. Per questa ragione sarebbe opportuno percorrere nuove strade, rappresentate ad esempio dai vaccini di nuova generazione, che rendano compatibile la pratica della vaccinazione con l'eradicazione della patologia.

# Capitolo 3

## ***Vaccini a DNA***

### 3.1- Generalità sui vaccini

I vaccini rappresentano probabilmente il più grande successo della medicina moderna : hanno debellato il vaiolo, quasi azzerato l'incidenza della poliomielite e salvato milioni di persone da tifo, tetano, rosolia, epatite A, B e altre pericolose infezioni. In medicina veterinaria rivestono notevole importanza: sia economica, in quanto grazie ad essi è possibile il controllo di numerose patologie che renderebbero impossibile l'allevamento degli animali, sia di sanità pubblica in quanto permettono il controllo di quelle patologie che possono essere trasmesse dagli animali all'uomo.

Il principio della vaccinazione è quello di insegnare al sistema immunitario a reagire contro i microorganismi patogeni. Questo si ottiene ingannando il sistema immunitario ed inducendolo a comportarsi come se l'organismo fosse già invaso da un microorganismo in rapida moltiplicazione.

I vaccini quindi sfruttano la proprietà del sistema immunitario di riconoscere le molecole che non appartengono al nostro organismo e sono proprie di un agente

infettivo, al riconoscimento segue la neutralizzazione e distruzione dell'organismo invasore da parte del sistema immunitario attivato. Una volta sconfitta la prima infezione, le cellule che hanno prodotto i meccanismi di difesa vengono mantenute come memoria dell'infezione passata e sono capaci di reagire in maniera più rapida ed efficiente se questa dovesse ripresentarsi.

I vaccini hanno la capacità di creare la memoria contro agenti infettivi prima che l'organismo abbia avuto contatti con essi. Questo viene fatto provocando nell'organismo un'infezione simulata, utilizzando per questo scopo l'agente infettivo vivo ma reso incapace di causare malattia, oppure ucciso o ancora utilizzando solo parti di esso purificate.

La prima esperienza di vaccinazione fu fatta dal medico inglese Jenner nel 1796, egli inoculò il virus del vaiolo bovino in una persona che poi risultò essere immune all'infezione causata dal virus del vaiolo umano. Pasteur, circa cento anni dopo, fece la seconda prova di vaccinazione, questa volta contro la rabbia. Tuttavia la vaccinazione vera e propria, cioè quella che coinvolse gran parte della popolazione, ebbe inizio solo dopo il 1930, in seguito alla scoperta di metodi semplici e riproducibili in grado di inattivare o uccidere batteri e virus, come ad esempio, il trattamento di questi con formolo. Alla fine degli anni cinquanta Sabin sviluppò un vaccino contro la poliomelite costituito da virus vivi ma resi incapaci di dare malattia. Usando le tecnologie sopra descritte

vennero prodotti numerosi vaccini in grado di combattere gravi malattie sia nell'uomo che negli animali.

Dopo i rapidi progressi degli anni Trenta-Sessanta, lo sviluppo dei vaccini raggiunse una fase di stallo. Infatti, tutti i vaccini che si potevano preparare con le tecniche a disposizione erano già stati sviluppati mentre quelli ancora da produrre erano tecnicamente impossibili. L'avvento dell'ingegneria genetica alla fine degli anni Settanta eliminò tutti i limiti. Oggi non esiste vaccino che in teoria non sia fattibile e non esiste patologia infettiva, ma non solo, che in teoria non possa essere affrontata con la vaccinazione. Il primo vaccino prodotto con l'ingegneria genetica è stato quello contro l'epatite B nel 1986.

Prima dello sviluppo delle tecniche di ingegneria genetica, i vaccini utilizzati erano fondamentalmente di due tipi: vaccini inattivati o spenti e vaccini vivi attenuati.

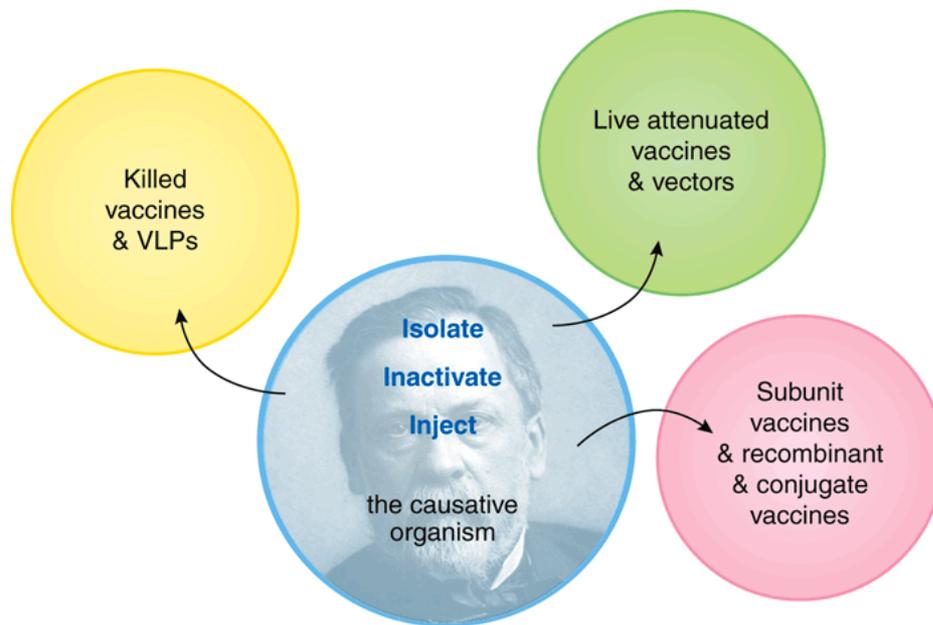
I vaccini inattivati sono costituiti da microorganismi coltivati in vitro e inattivati con diversi metodi chimico-fisici che uccidono il microorganismo senza alterare il mosaico antigenico: trattamento chimico (formaldeide, acetone, fenolo, ecc...), calore, crescita in condizioni avverse. Questo tipo di formulazione risulta molto sicura perché i microorganismi non possono infettare le cellule dell'ospite e il vaccino è stabile anche in condizioni operative non ottimali, ma in alcuni casi non è in grado di indurre una sufficiente risposta immunitaria

perché l'inattivazione può causare la perdita di alcuni determinanti antigenici e possono essere richieste più somministrazioni di richiamo.

I vaccini vivi attenuati sono invece costituiti da patogeni coltivati in vitro e attenuati con diversi metodi (per esempio attraverso coltivazione su ospite eterologo) che causano la perdita della virulenza ma lasciano inalterato il quadro immunogenico. I microorganismi sono comunque vivi e resta quindi possibile una reversione e il ritorno alla virulenza. Inoltre i vaccini vivi attenuati sviluppati per virus a genoma segmentato (per es. Bluetongue virus e virus influenzali) hanno la possibilità di riassortire con virus correlati generando nuove varianti anche altamente patogene. Questi vaccini conferiscono un elevato grado di protezione e solitamente è sufficiente un'unica inoculazione, ma spesso richiedono particolari condizioni di conservazione, non sempre adottabili in campo veterinario.

Negli ultimi anni l'avvento della tecnologia del DNA ricombinante ha permesso lo sviluppo di nuovi vaccini che sembrano rispondere con maggiore sicurezza ed efficacia alle malattie infettive come mostrato schematicamente in figura 7. Tra questi possiamo ricordare per esempio: i vaccini peptidici costituiti da singoli antigeni o epitopi in grado di indurre la risposta immunitaria, che vengono purificati dal microorganismo intero oppure sono prodotti artificialmente con tecniche di ingegneria genetica. Questi vaccini sono molto sicuri ma in alcuni casi non è possibile ottenere il corretto folding dei peptidi al di fuori

dell'ambiente originale e l'uso di un singolo determinante antigenico può non essere sufficiente ad indurre immunità protettiva.



**Fig. 7: Schema rappresentante i principali vaccini sviluppati con tecniche di ingegneria genetica;** da: Nature Biotechnology 25, 1361 - 1366 (2007)

Grazie alle tecniche di ingegneria genetica è possibile produrre dei vettori in grado di esprimere geni eterologhi codificanti per antigeni di altri microorganismi. Questo tipo di vaccino presenta tutti i vantaggi dei vaccini vivi ma non è possibile la reversione, quindi sono piuttosto sicuri, anche se non possono essere utilizzati in pazienti immunodepressi.

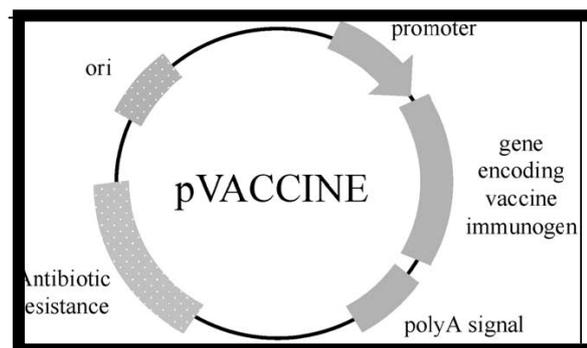
Alcuni di questi inconvenienti possono essere aggirati utilizzando i vaccini a DNA, costituiti da vettori di espressione eucariotici in cui vengono clonati geni codificanti proteine immunogeniche. In questo modo si risolvono diversi problemi legati alla replicazione in vitro, che per alcuni patogeni è difficile o molto costosa, e legati alla residua patogenicità dei microorganismi.

### 3.2- Che cosa sono e come funzionano i vaccini a DNA

I primi tentativi di trasferimento di DNA nudo nelle cellule di un mammifero vennero fatti nel 1960 da Ito. L'idea che il DNA potesse essere usato come vaccino invece è stata molto più recente e alquanto casuale. Cohen nel 1993, riuscì a mettere in evidenza la produzione di proteine da parte di topi che avevano ricevuto iniezioni intramuscolari di DNA. Ulmer et al sempre nel 1993 confermarono mediante un modello sperimentale sull'influenza che dei plasmidi contenenti DNA iniettati ai topi erano capaci di stimolare il sistema immunitario degli animali e quindi si sarebbero potuti utilizzare come dei vaccini. Questi studi dimostrarono quindi che l'inoculazione diretta del DNA codificante per un antigene estraneo, può indurre risposte immuni protettive. I vaccini a DNA rappresentano quindi una delle più recenti innovazioni nel campo della profilassi immunizzante. Tipicamente consistono in un gene estraneo, codificante per una

proteina antigenica di interesse, clonato in un plasmide batterico che può essere iniettato nel soggetto da vaccinare per via intramuscolare, sottocutanea o eventualmente veicolato direttamente all'interno delle cellule tramite Gene-Gun (Fig 8). L'espressione del gene di interesse nelle cellule di mammifero è controllata da un promoter eucariotico, in genere il promotore del CMV o RSV, che presentano alti livelli di espressione in un ampio range di cellule eucariotiche. Un importante componente dei vaccini a DNA è rappresentata dalle sequenze immunostimolatorie (ISS) presenti nel DNA plasmidico. Queste sequenze consistono di Citosina-fosfato-Guanosina (CpG) non metilate, e sono estremamente rare nei genomi degli eucarioti mentre sono spesso rappresentate nei genomi batterici. Le ISS svolgono un ruolo fondamentale nella stimolazione del sistema immunitario, attraverso il riconoscimento da parte dei Toll-like receptor cellulari che mediano l'innescamento della risposta immunitaria innata e adattativa (azione adiuvante endogena antigene indipendente, attivazione delle cellule presentanti l'antigene, attivazione dei linfociti b ecc). L'esatto meccanismo attraverso il quale i vaccini a DNA inducono la risposta immunitaria non è completamente conosciuto. Le cellule potenziali bersaglio della transfezione sono rappresentate da cellule somatiche (es miociti e keratinociti) e da cellule presentanti l'antigene (APC, in particolare le cellule dendritiche). Le cellule somatiche possono potenzialmente stimolare il sistema immunitario attraverso la presentazione di epitopi antigenici esposti in

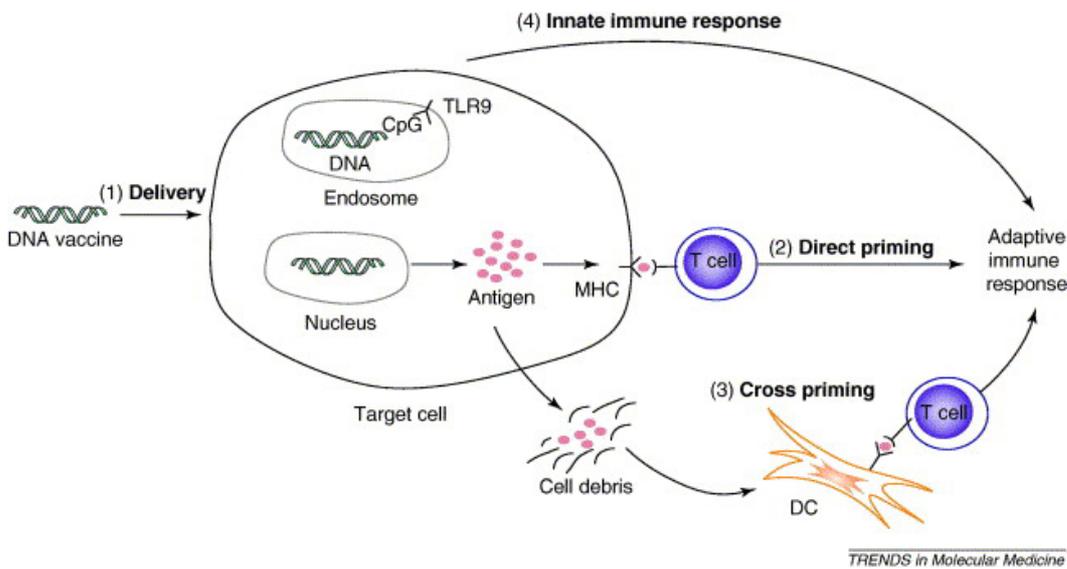
associazione con il MHC di classe I, in maniera del tutto simile a quanto avviene nelle cellule naturalmente infette. Questo meccanismo non è però sufficiente per indurre una risposta immunitaria duratura ed efficiente. E' necessario infatti che vi sia una transfezione delle APC, capaci di presentare l'antigene in associazione con MHC-II ai linfociti T vergini dai quali dipende l'innescò e la modulazione di una efficiente risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata.



**Fig 8: Struttura di un vaccino a DNA (da Dunham S.P 2002).**

### 3.3- Risposta immunitaria indotta dai vaccini a DNA

L'esatto meccanismo con cui viene stimolata la risposta immunitaria mediante i vaccini a DNA non è ancora completamente conosciuto ed è oggetto di controversie e studi da parte della comunità scientifica (Shedlock and Weiner2000). (Fig 9)



**Fig. 9: meccanismo di azione dei vaccini a DNA**

Gli obiettivi potenziali della vaccinazione genetica sono le cellule somatiche dell'ospite (es: miociti, cheratinociti etc) e le cellule presentanti l'antigene professionali (APC's). La transfezione delle cellule somatiche non è in grado da sola di stimolare adeguatamente la risposta immunitaria, in quanto queste sono capaci di esporre gli antigeni solo attraverso il sistema maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), per cui è necessario che si verifichi l'ingresso del plasmide contenente il gene codificante per l'antigene contro cui si vuole vaccinare anche e soprattutto nelle (APC's). Diversi studi hanno infatti dimostrato che le APC's, in particolare le cellule dendritiche, svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria, sia che vengano transfettate direttamente, sia che esse vengano solamente in contatto con proteine sintetizzate all'interno e poi esposte in superficie dalle cellule somatiche. Nel secondo caso, non fa differenza, che le proteine vengano esposte direttamente sulle cellule o vengano rilasciate dopo apoptosi delle cellule somatiche stesse.

Le cellule dendritiche attivate sono capaci di presentare gli epitopi sia ai linfociti T-CD4+ attraverso l'MHC-II, sia ai linfociti T-CD8+ attraverso l'MHC-I, e anche stimolare la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. I vaccini a DNA sono quindi capaci di stimolare sia una risposta immunitaria di tipo umorale, che una risposta di tipo cellulo-mediato.

Il tipo e l'intensità della risposta immunitaria non è legata esclusivamente all'antigene, ma è anche in stretta relazione con il metodo e la via di somministrazione.

Generalmente i vaccini a DNA vengono inoculati per via intramuscolare (IM) o sottocutanea (SC) o in alternativa con l'utilizzo di uno strumento chiamato "gene-gun" che consente di "sparare" delle particelle d'oro colloidale attorno alle quali si lega il DNA direttamente dentro le cellule.

La quantità di DNA necessaria per stimolare il sistema immunitario varia molto a seconda della via di somministrazione prescelta. Con la somministrazione intramuscolare si è visto che in un topo sono necessari almeno 10-100µg di plasmide e 0,5-2,5 mg nei grossi animali, mentre con la gene-gun si utilizzano solamente 0,1-1µg di plasmide, cioè dosi circa 100 volte inferiori per avere una risposta immunitaria sovrapponibile. La differenza di quantità di DNA plasmidico tra questi due metodi di somministrazione riflette l'efficienza di ingresso del plasmide nella cellula una volta inoculato. Infatti il plasmide somministrato mediante gene-gun, avvolto attorno a delle particelle d'oro che ne impediscono quasi totalmente la degradazione, penetra direttamente all'interno di cellule somatiche dell'ospite o di cellule presentanti l'antigene (APC) con una efficienza molto superiore all'inoculazione per via IM o SC (Dunham S.P 2002). La via di somministrazione del vaccino influenza anche il tipo di risposta immunitaria che si otterrà dopo la vaccinazione.

Infatti la somministrazione intramuscolare induce una risposta prevalente di tipo Th1, caratterizzata dalla produzione di interferon- $\gamma$  da parte dei linfociti T-helper e dalla secrezione di anticorpi della classe IgG2a (Robinson and Torres 1997). In contrasto la somministrazione mediante gene-gun tende a promuovere una risposta di tipo Th2, con produzione prevalente di IL4 da parte dei linfociti T-helper e una secrezione di immunoglobuline della classe IgG. È necessario tener conto di queste peculiarità al momento della progettazione dei vaccini a DNA contro un determinato microorganismo.

Altri metodi di somministrazione sono stati utilizzati per aumentare l'efficienza dei vaccini genetici, sono stati utilizzati, per esempio, dei sistemi di iniezione privi di ago (van Rooij et al 1998), l'elettroporazione in vivo, (Mir et al 1999), e diversi dispositivi di rilascio del plasmide a livello mucosale (Barnes et al 2000). Nessuno dei metodi di somministrazione descritti può essere definito universale, in quanto ognuno trova delle applicazioni specifiche a seconda del patogeno contro cui si vuole vaccinare e del tipo di immunità che si vuole indurre.

### 3.4- Vantaggi e limiti dei vaccini a DNA

I vaccini a DNA possono in teoria mantenere tutti gli aspetti positivi dei vaccini esistenti, evitandone i rischi. Pur attivando entrambe le modalità di azione del sistema immunitario, essi sono incapaci di causare infezione perché privi dei geni necessari alla replicazione del patogeno. Sono facili da progettare e da produrre grazie alla tecnologia del DNA ricombinante, e sono stabili come gli altri vaccini. Se prodotti su scala industriale risultano essere anche economici.

Inoltre, il fatto di poter essere ingegnerizzati per trasportare geni codificanti antigeni appartenenti a diversi ceppi di uno stesso microorganismo, sono potenzialmente in grado di fornire immunità contro più ceppi contemporaneamente: una caratteristica che potrebbe rivelarsi molto utile quando si voglia vaccinare contro patogeni altamente variabili.

E' possibile anche inserire all'interno del plasmide codificante l'antigene, sequenze geniche che fungono da veri e propri adiuvanti biologici, come ad esempio i geni codificanti per alcune citochine (es. granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon- $\gamma$  e interleuchine), chemochine e fattori di co-stimolazione (es. B7.1, B7.2). Generalmente la produzione di queste citochine induce una migliore attivazione della risposta immunitaria generata dal vaccino a DNA, amplificando l'intensità sia della risposta umorale, che della risposta cellulo-mediata. Questo avviene perché lo sviluppo di una

buona risposta immunitaria richiede l'intervento di molteplici segnali di stimolazione. Il primo segnale arriva dall'antigene, in secondo luogo poi intervengono o le citochine o dei fattori di co-stimolazione. Nel corso di una risposta immunitaria protettiva nei confronti di un patogeno, i segnali secondari vengono prodotti da cellule del sistema immunitario quali i linfociti T-helper CD4+ e dalle APCs.

Nei vaccini tradizionali la funzione principale degli adiuvanti è di far aumentare la produzione di co-stimolatori da parte di queste cellule. Nei vaccini a DNA si ha una capacità intrinseca del plasmide di indurre la risposta immunitaria, grazie alla presenza nel plasmide di origine batterica utilizzato per veicolare il gene codificante per l'antigene di sequenze CpG non metilate che sono in grado di stimolare il sistema immunitario a produrre un gran numero di citochine, inclusa l'interleuchina 12 (IL-12). Questa capacità intrinseca del vaccino come abbiamo visto può essere amplificando inserendo nel vaccino geni codificanti per diverse citochine. Quando i meccanismi d'azione delle citochine e delle chemochine verranno meglio compresi, sarà possibile combinare all'interno del plasmide che codifica per l'antigene o in plasmidi separati, geni che codificano per particolari citochine o chemochine, che permetteranno così di modulare sia il tipo che l'entità della risposta immunitaria evocata.

La maggior parte degli studi in questo campo sono stati compiuti sui topi, mentre ancora risultano scarsi i dati riguardo all'uomo e agli animali da reddito.

Alcune prove sono state fatte utilizzando geni che codificano per GM-CSF (Femenia et al 1994), Interferon- $\gamma$  (Hosie et al 1998), interleuchina-2 (Nobiron et al 2000), interleuchina -12 (Hanlon et al 2001, Boretti et al 2000, Glansbeek et al 2002) e interleuchina -18 (Hanlon et al 2001) e da esse risulta evidente un miglioramento della risposta vaccinale.

Un altro metodo che permette di aumentare l'efficacia di questi vaccini è il prime-boost. In sostanza si effettua una prima vaccinazione con il vaccino a DNA, poi dopo un paio di settimane si somministra il booster costituito da un antigene (subunità proteica, microrganismo inattivato, vettore virale). In genere seguendo un protocollo simile si è visto che la risposta immunitaria è superiore rispetto a quella che si avrebbe se si facesse il booster con lo stesso vaccino a DNA (Ramshaw and Ramsay 2000, Gurunahan et al 2000).

Oltre a questi innumerevoli vantaggi però i vaccini a DNA presentano comunque ancora un gran numero di problemi, per esempio: ad un mese dalla somministrazione del vaccino a DNA la maggior parte delle cellule transfettate smette di produrre l'antigene. E' necessario quindi trovare un sistema che permetta di migliorare la produzione di antigene da parte delle cellule transfettate che porterebbe ad una migliore risposta immunitaria, evitando però di favorire le aggressioni nei confronti dei tessuti sani. Un altro problema è legato alla bassa efficienza di trasformazione delle cellule in vivo, probabilmente questo aspetto verrà migliorato quando si stabiliranno quali siano

le esatte dosi efficaci di vaccino da inoculare e quali le vie e i metodi di somministrazione più vantaggiosi.

## Capitolo 4

### ***Scopo del lavoro***

Il *Mycoplasma agalactiae* è l'agente causale dell'Agalassia Contagiosa (AC), una grave infezione che colpisce le pecore e le capre. La AC è largamente distribuita in Europa, Asia, Africa, e particolarmente nell'area del bacino del Mediterraneo dove è molto diffuso l'allevamento di ovini con prevalente attitudine per la produzione lattea. E' caratterizzata clinicamente da mastite, artrite, cheratocongiuntivite e occasionalmente aborto. Si trasmette per contatto diretto tra animale ammalato ad animale sano, attraverso il latte di animali con sintomatologia clinica manifesta, e attraverso il contatto con portatori asintomatici che fungono da serbatoio del patogeno anche per diversi anni. La malattia, per l'alto impatto economico che riveste, è inclusa dall'O.I.E. (organizzazione internazionale delle epizoozie) nella lista B; è infatti stimato che nei paesi colpiti essa arrechi annualmente danni per svariati milioni di dollari a causa del calo della produzione lattea e dell'aumento della mortalità neonatale nei soggetti infetti. La terapia antibiotica, efficace per ridurre la sintomatologia clinica, non è in grado di eliminare completamente i portatori, per cui il micoplasma può continuare a circolare per diverso tempo anche nelle aree apparentemente risanate. A causa delle caratteristiche epidemiologiche della

AC, al momento, i vaccini sembrano rappresentare il principale strumento di lotta per il controllo della malattia. La profilassi vaccinale rappresenta infatti un fondamentale mezzo per la prevenzione delle malattie infettive e, se correttamente applicata, un'importante premessa per la loro eradicazione. Attualmente vengono impiegati per la vaccinazione contro *Mycoplasma agalactiae* vaccini spenti preparati a partire da ceppi isolati da allevamenti infetti, quindi incapaci di replicarsi nell'ospite ma con potere immunogeno conservato, e adiuvati con idrossido di alluminio. Questi vaccini inducono una risposta immunitaria di breve durata (4-5 mesi) e soltanto di tipo umorale. Tuttavia affinché un vaccino sia in grado di indurre un'immunizzazione durevole, specifica ed efficace è essenziale la capacità di stimolare anche una reazione di tipo cellulare. Inoltre l'impossibilità di distinguere un animale vaccinato da uno infetto rende incompatibile la pratica vaccinale basata sui vaccini tradizionali come quelli spenti con l'eradicazione dell'infezione.

Per ovviare a queste ed altre limitazioni dei vaccini classici abbiamo avviato studi che mirano alla progettazione di vaccini innovativi in grado di superare l'ostacolo legato alla variabilità antigenica dei micoplasmi e di discriminare tra l'immunizzazione naturale e quella artificiale e quindi capaci di combattere più efficacemente l'infezione sostenuta dal *Mycoplasma agalactiae*.

I vaccini a DNA da questo punto di vista potrebbero essere i candidati ideali per vari motivi:

determinano una risposta immunitaria completa, sia umorale che cellulo-mediata; utilizzano uno o pochi antigeni permettendo la distinzione di animali vaccinati da quelli naturalmente infetti; sono stabili anche in condizioni operative non ottimali; sono economici.

Scopo di questo lavoro è stato quello di allestire un vaccino a DNA codificante il gene per la proteina P48 di *M.agalactiae*. L'antigene prescelto è una lipoproteina di membrana che fa parte di un complesso ABC transporter e che presumibilmente ha attività di *solute binding protein*. La proteina P48 è stata identificata come antigene immunodominante, viene espressa in misura maggiore rispetto alle altre proteine e viene precocemente riconosciuta in sieri di animali naturalmente infetti o infettati sperimentalmente (Rosati et al., 1999). Grazie alla sua immunodominanza, all'assenza di variabilità intraclonale e alla sua costante espressione in tutte le fasi dell'infezione, la proteina P48 rappresenta un candidato ideale per la produzione di un vaccino contro *M agalactiae*. Inoltre è già utilizzata per l'allestimento di un kit diagnostico basato sulla sua forma ricombinante (espressa in *E. coli*) (Rosati et al., 2000).

L'utilizzo del vaccino a DNA basato sull'antigene P48 permetterebbe quindi di differenziare i capi naturalmente infetti, che presenteranno anticorpi verso tutti gli antigeni del micoplasma, da quelli vaccinati, che invece avranno solo anticorpi specifici per la P48.

La risposta immunitaria indotta dal vaccino è stata valutata in topi Balb-C.

# Capitolo 5

## Materiali e metodi

### 5.1- Terreni e reagenti

Le quantità riportate si riferiscono alla preparazione di un litro di soluzione

▪ PBS 10X:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g

La soluzione viene portata a pH 7.4.

▪ TBS 1X:

Tris	2.42 g
NaCl	29.24 g

Portare a pH 7.5 con HCl.

▪ TTBS 1X:

Tween-20	0.5 ml
TBS	1 litro

▪ Blocking Solution

Gelatina	30 g
TBS	1 litro

Scaldare a 37°C per sciogliere e conservare in stufa.

▪ Antibody Buffer

Gelatina	10 g
TBS	1 litro

▪ HRP Substrates for Blotting  
CN/DAB 10X                      10 ml  
Stable Peroxide Substrate Buffer    90 ml

▪ Terreno LB liquido:  
NaCl                                      10 g  
Tryptone                                10 g  
Yeast extract                         5 g  
H<sub>2</sub>OMQ                                 a volume  
La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

▪ Terreno LB agar:  
NaCl                                      10 g  
Tryptone                                10 g  
Yeast extract                         5 g  
Agar batteriologico europeo    14 g  
H<sub>2</sub>OMQ                                 a volume  
La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

▪ Tampone TAE 1X:  
Tris acetato                            0.04 M  
EDTA                                      1 mM

▪ TE buffer:  
Tris HCl                                 10 mM pH 8.0  
EDTA                                      0.1 mM pH 8.0



Per la reazione di PCR è stato utilizzato il kit HotMaster Taq (eppendorf) allestendo una reazione con un volume finale di 50 µl:

Reagente	Quantità utilizzata	Concentrazione finale
Buffer 10 X	5 µl	1X
dNTP 10 mM	1 µl	200 µM
Primer F 10 mM	1 µl	0.2 µM
Primer R 10 mM	1 µl	0.2 µM
Taq 5U/ml	0.25 µl	1.25 U
pGEX-2T/P48 (15 mg/ml)	1 µl	15 ng

Il termal-cycler è stato impostato con il seguente programma:

1 ciclo a 94°C per 2 minuti, 35 cicli a 94°C per 30", 65°C per 20", 72°C per 90" e infine 1 ciclo a 72°C per 10".

Il prodotto di PCR è stato controllato in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% ed in seguito è stato purificato con GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) secondo il seguente protocollo:

- 1. collocare La colonnina con il filtro dentro la provetta, aggiungere 500 µl di Column preparation Solution e centrifugare a 12000 x g per 1 minuto*
- 2. aggiungere 5 volumi di Binding Solution per 1 volume di prodotto di PCR, miscelare e centrifugare a 16000 x g per 1 minuto*
- 3. aggiungere 500 µl di Wash Solution e centrifugare due volte a 16000 x g per 1 minuto*
- 4. trasferire la colonnina in una nuova provetta e aggiungere 50 µl di Elution Solution e lasciare in eluizione per 1 minuto a temperatura ambiente; centrifugare la spin column a 16000 x g per 1 minuto*
- 5. recuperare l'eluato e quantificare allo spettrofotometro*
- 6. L'amplificato così purificato è stato digerito con gli enzimi di restrizione BamHI ed EcoRI.*

I vettori plasmidici prescelti sono stati digeriti con gli stessi enzimi di restrizione ed in seguito sono stati defosforilati con il kit Alkaline Phosphatase (Roche) per ridurre il tasso di ricircularizzazione dei vettori digeriti da un solo enzima. La defosforilazione è stata condotta aggiungendo alla soluzione contenente i vettori:

Reagente	Quantità utilizzata
Dephosphorilation Buffer 10X	5 µl
Alkaline Phosphatase	4 µl
H <sub>2</sub> OMQ sterile	21 µl

I campioni sono stati lasciati ad incubare un'ora a temperatura ambiente.

I prodotti di digestione sono stati separati su gel d'agarosio al 2%; le bande sono state tagliate e vettori ed inserto digeriti sono stati purificati con il kit Perfectprep® Gel Cleanup procedure (Eppendorf) seguendo il protocollo allegato, in breve:

- 1. tagliare la banda dal gel e pesarla*
- 2. aggiungere 3 volumi di Binding Buffer per ogni volume di gel e incubare a 50°C per 5-10 minuti, vortexando ogni 2-3 minuti*
- 3. aggiungere un volume di isopropanolo e miscelare bene per inversione*
- 4. aggiungere il campione alle spin column, centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto ed eliminare l'eluato*
- 5. aggiungere 750 µl di Wash Buffer alla spin column, centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto ed eliminare l'eluato*
- 6. centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto, per eliminare il Wash Buffer residuo, ed eliminare l'eluato*
- 7. mettere la spin column in una provetta pulita, aggiungere 30 µl di Elution Buffer e centrifugare a 6000-10000 x g per un minuto*
- 8. eliminare la spin column e recuperare l'eluato*

I prodotti di PCR purificati e digeriti sono stati quindi clonati nei vettori prescelti con il kit Rapid DNA Ligation Kit, secondo il seguente protocollo:

- 1. diluire l'inserto ed il vettore nel DNA Dilution Buffer 1X fino ad un volume finale di 10  $\mu$ l*
- 2. aggiungere 10  $\mu$ l di T4 DNA Ligation Buffer e miscelare accuratamente*
- 3. aggiungere 1  $\mu$ l di T4 DNA Ligase e miscelare accuratamente*
- 4. incubare per 5 minuti a 15-25°C*

Il ceppo di E.coli JM105 è stato trasformato con i plasmidi costruiti mediante shock termico:

- 1. aggiungere 4  $\mu$ l del plasmide ricombinante in una provetta contenente E. coli competenti*
- 2. incubare in ghiaccio per 30 minuti*
- 3. incubare a 42°C per 30 secondi*
- 4. trasferire immediatamente la provetta con le cellule in ghiaccio*
- 5. aggiungere 900  $\mu$ l di LB a temperatura ambiente*
- 6. incubare su agitatore a 37°C per 1 ora*
- 7. piastrare su LB agar addizionato con kanamicina (50  $\mu$ g/ml) ed incubare o/n*

Le colonie ricombinanti antibiotico-resistenti sono state selezionate, messe in crescita in 3 ml di LB con kanamicina (50  $\mu$ g/ml) e incubate o/n; il giorno seguente è stata effettuata una estrazione miniprep con il kit Plasmid DNA isolation Miniprep kit (Qiagen):

- 1. pellettare i batteri*
- 2. risospendere il pellet in 250  $\mu$ l di Buffer P1 e trasferire in una provetta da microcentrifuga*
- 3. aggiungere 250  $\mu$ l di Buffer P2 e miscelare invertendo la provetta 4-6 volte*
- 4. aggiungere 350  $\mu$ l di Buffer N3 e miscelare bene invertendo la provetta 4-6 volte finché la soluzione non risulta omogenea*
- 5. centrifugare per 10 minuti >12000 x g*

6. *prelevare il surnatante e caricarlo nella spin column*
7. *centrifugare per 1 minuto >12000 x g ed eliminare l'eluato*
8. *lavare la spin column aggiungendo 750 µl di PE Buffer e centrifugare per un minuto a 12000 x g*
9. *eliminare l'eluato e centrifugare nuovamente la spin column per 1 minuto >12000 x g*
10. *mettere la spin column in una provetta pulita ed aggiungere 50 µl di Elution Buffer*
11. *lasciare 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto >12000 x g*
12. *recuperare l'eluato e quantificare allo spettrofotometro*

I plasmidi purificati sono stati sottoposti a digestione di controllo con BamHI ed EcoRI. Le colonie trasformate con il plasmide ricombinante sono state rimesse in coltura in 300 ml di terreno LB addizionato con kanamicina (50 µg/ml) e incubate a 37°C o/n; le colture batteriche sono state utilizzate per ottenere preparazioni maxiprep con il kit Plasmid DNA Isolation Maxiprep kit (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

1. *pellettare la coltura batterica*
2. *risospingere il pellet in 10 ml di Buffer P1*
3. *aggiungere 10 ml di Buffer P2, miscelare invertendo vigorosamente 4-6 volte e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti*
4. *aggiungere 10 ml di Buffer P3, miscelare vigorosamente invertendo 4-6 volte e incubare in ghiaccio per 20 minuti*
5. *centrifugare a 20000 x g per 30 minuti a 4°C*
6. *equilibrare le colonne con 10 ml di Buffer QBT e lasciar eluire per gravità*
7. *aggiungere il surnatante dello step 5 alla colonna equilibrata e lasciare eluire per gravità*
8. *lavare la colonna con 60 ml di Buffer QC e lasciare eluire per gravità*
9. *eluire il DNA con 15 ml di Buffer QF*
10. *precipitare il DNA aggiungendo 10.5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente e centrifugare a >15000 x g per 30 minuti a 4°C*

11. *eliminare delicatamente il surnatante e lavare il pellet di DNA con 1 ml di etanolo 70% a temperatura ambiente*
12. *trasferire in una provetta da micro centrifuga e centrifugare per 10 minuti alla massima velocità*
13. *eliminare il surnatante e asciugare il DNA all'aria*
14. *risospendere in 100 µl di TE*

In questo modo sono stati costruiti i plasmidi ricombinanti pcDNA3.1/P48, pVAX1/P48, e pCMV-Script/P48 da utilizzare come vaccini a DNA, mentre il vettore pGEX-2T/P48 è stato utilizzato per esprimere l'antigene da utilizzare in immunoblotting ed ELISA.

### **5.3- Sequenziamento dei plasmidi ottenuti**

I costrutti sono stati sequenziati con ABI PRISM BigDye Terminator Sequencing Kit 2.0

### **5.4- Espressione del gene *p48* nelle cellule transfettate**

Sono state allestite colture di cellule HEK (Human Embryonic Kidney) 293 in terreno di coltura supplementato con 10% FBS, a 37°C in incubatore con 5% CO<sub>2</sub>. Le colture cellulari sono state transfettate alternativamente con i vettori pcDNA3.1/P48, pVAX1/P48 e pCMV-Script/P48, utilizzando come controlli negativi pcDNA3.1, pVAX1 e pCMV-Script, rispettivamente. Per la

transfezione è stato usato il kit CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech)

secondo il seguente protocollo:

1. *piastrare le cellule il giorno prima della transfezione*
2. *30 minuti-3 ore prima della transfezione sostituire il terreno di coltura con medium fresco*
3. *per ogni esperimento di transfezione preparare la soluzione A e la soluzione B indicato:*

SOLUZIONE A:

2-4 µg di plasmide  
H<sub>2</sub>O sterile a volume  
12.2 µl soluzione di calcio 2M  
100 µl volume totale

SOLUZIONE B:

100 µl 2X HBS

1. *vortexare con attenzione la soluzione B e contemporaneamente aggiungere la soluzione goccia a goccia*
2. *incubare la soluzione di transfezione a temperatura ambiente per 20 minuti*
3. *vortexare con attenzione la transfezione cellulare e aggiungere goccia a goccia nelle piastre con le colture cellulari*
4. *incubare le piastre per 2-12 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>*
5. *rimuovere la soluzione di transfezione e lavare le piastre con medium fresco o PBS 1X*
6. *aggiungere terreno fresco ed incubare a 37°C*
7. *effettuare i test per l'espressione dei geni esogeni o la selezione 24-72 ore dopo la transfezione*

Dopo 48 ore le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS ed è stato estratto l'RNA totale con Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) con il seguente protocollo:

1. aggiungere 1 ml di Trizol<sup>®</sup> reagent direttamente nelle piastre (di diametro di 3.5 cm) con le colture cellulari e miscelare bene con la pipetta per lisare le cellule
2. incubare il campione per 5 da 15 minuti a 30°C per ottenere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici
3. aggiungere 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di Trizol<sup>®</sup> reagent e miscelare vigorosamente per 15 secondi; incubare da 15 a 30°C per 2-3 minuti
4. centrifugare i campioni a 12000 x g per 15 minuti a 2-8°C
5. recuperare la fase acquosa (surnatante) contenente l'RNA e trasferirla in una nuova provetta
6. per precipitare l'RNA aggiungere 0.5 ml di alcool isopropilico per ogni ml di Trizol<sup>®</sup> reagent utilizzato e incubare da 15 a 30°C per 10 minuti
7. centrifugare a 12000 x g per 10 minuti a 2-8°C
8. rimuovere il surnatante e lavare il pellet di RNA con 1 ml di etanolo 75% per ogni ml di Trizol<sup>®</sup> reagent utilizzato inizialmente, vortexare e centrifugare a 7500 x g per 5 minuti a 2-8°C
9. rimuovere l'etanolo, asciugare il pellet all'aria e risospendere in acqua RNAsi-free

Il cDNA è stato sintetizzato con il sistema SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen) secondo il seguente protocollo:

1. miscelare bene i campioni di RNA e centrifugarli brevemente
2. preparare il mix di RNA/primers in una provetta sterile come segue:

<u>Component</u>	<u>Sample</u>	<u>No RT Control</u>	<u>Control RNA</u>
up to 5 µg total RNA	n µl	n µl	—
Control RNA (50 ng/µl)	—	—	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl	1 µl	1 µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
		<b>or</b>	
2 µM GSP	1 µl	1 µl	—
DEPC-treated water	to 10 µl	to 10 µl	to 10 µl

3. *incubare ogni campione a 65°C per 10 minuti e poi mettere in ghiaccio per 1 minuto*
4. *preparare il seguente mix di reazione aggiungendo ogni componente nell'ordine indicato:*

<u>Component</u>	<u>Each Rxn</u>	<u>4 Rxns</u>
10X RT buffer	2 µl	8 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl	16 µl
0.1 M DTT	2 µl	8 µl
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 µl	4 µl

5. *aggiungere 9 µl di questo mix alla miscela RNA/primer, miscelare gentilmente e centrifugare brevemente*
6. *incubare a 42°C per 2 minuti*
7. *aggiungere 1 µl (50 U) di SuperScript™ II RT ad ogni provetta campione, eccetto il “no RT control”; miscelare ed incubare a 42°C per 50 minuti*
8. *terminare la reazione a 70°C per 15 minuti ed in seguito raffreddare in ghiaccio*
9. *aggiungere 1 µl di RNasi H ad ogni campione ed incubare per 20 minuti a 37°C*
10. *preparare il mix di amplificazione in una nuova provetta, utilizzando i primer MagP48/BamHI/K/ATG/F and MagP48/ECO/R*
11. *miscelare gentilmente e avviare il programma di PCR*

<u>Component</u>	<u>Volume (µl)</u>	
	<u>1 Rxn</u>	<u>10 Rxns</u>
10X PCR buffer minus Mg	5	50
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5	15
10 mM dNTP mix	1	10
10 µM sense primer	1	10
10 µM antisense primer	1	10
Taq DNA Polymerase (5 units/µl) or Platinum® Taq DNA Polymerase (5 units/µl)	0.4	4
cDNA (from the first-strand reaction)	2	20
autoclaved, distilled water	<u>38.1</u>	<u>381</u>
final volume	50	500

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1%.

Il grado di espressione della proteina P48 è stato valutato in immunoblotting ripetendo l'esperimento tre volte. L'SDS-PAGE e il blotting sono stati condotti secondo le indicazioni del produttore, mentre per la rivelazione è stato seguito il seguente protocollo:

1. *immergere la membrana in almeno 100 ml di Blocking Solution e incubare a 37°C 30-60 minuti*
2. *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
3. *aggiungere la soluzione con il primo anticorpo (1:3000 in Antibody Buffer) e mettere in agitazione per un'ora*
4. *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
5. *aggiungere la soluzione con la proteina-G (0.5µl/ml in Antibody Buffer) e mettere in agitazione per un'ora*
6. *effettuare due lavaggi in TTBS per 5 minuti in oscillatore*
7. *lavare una volta con TBS per 5 minuti ponendo in agitazione nell'oscillatore, per eliminare il Tween-20*
8. *aggiungere il substrato per visualizzare il legame*
9. *lavare due volte con acqua distillata per bloccare la reazione*

## **5.5- Immunizzazione dei topi**

In questo esperimento sono state utilizzate 12 femmine di topo BALB/c di 6 settimane, secondo le linee guida dell'Unione Europea. Gli animali sono stati divisi in due gruppi da 6 individui; ad un gruppo sono stati iniettati intramuscolo con 50 µg (1 µg/µl) del costrutto pVAX/P48 (gruppo vaccinato) ed all'altro

sono stati somministrati 50 µg (1 µg/µl) di pVAX (gruppo di controllo) in ciascuno degli arti posteriori. Le preparazioni iniettate sono state formulate in PBS sterile contenente bupivacaina cloridrato al 0.5%. Ad ogni animale è stata somministrata una dose di richiamo dopo 15 e 30 giorni dalla prima somministrazione. Sono stati prelevati dei campioni di siero prima dell'immunizzazione (T<sub>0</sub>) e ogni 14 giorni per 8 settimane (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>f</sub>); i campioni sono stati utilizzati in Western blotting per verificare qualitativamente la produzione di anticorpi anti-P48, mentre la valutazione quantitativa è stata effettuata in P48-ELISA.

## **5.6- Espressione e purificazione dell'antigene P48**

Il ceppo di *E. coli* JM105 è stato trasformato con il plasmide pGEX2T/P48 come descritto in precedenza. Le colonie trasformate sono state selezionate per la resistenza all'antibiotico codificata dai plasmidi; queste colonie sono state messe in coltura su piccola scala. Da queste colture sono stati estratti i plasmidi con il Plasmid DNA isolation Miniprep kit (Qiagen), come descritto in precedenza. I plasmidi estratti sono stati digeriti con gli enzimi *Bam*HI ed *Eco*RI per verificare la presenza dell'inserto ed i prodotti di digestione sono stati visualizzati in elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. Le colonie trasformate stabilmente con il plasmide pGEX2T/P48 sono state messe in coltura su scala maggiore in terreno

LB con ampicillina (50 µg/ml). Quando le colture hanno raggiunto la fase logaritmica precoce, è stata indotta l'espressione della rP48 mediante l'aggiunta di IPTG alla concentrazione finale di 0.5 mM. Dopo due ore dall'induzione, i batteri sono stati centrifugati e lisati con i convenzionali metodi fisico-chimici e la proteina di fusione è stata recuperata dalla frazione solubile e purificata con cromatografia d'affinità. Il tag di GST è stato tagliato mediante digestione con la trombina. La resa e la purezza della rP48 sono state valutate in SDS-PAGE e con il metodo di Bradford.

### **5.7- SDS-PAGE e Western blot**

La proteina rP48 purificata è stata utilizzata per verificare la presenza di anticorpi specifici nei topi vaccinati e in quelli di controllo. Sia la rP48 che il BenchMark™ Pre-stained Ladder (Invitrogen, Italia) sono stati fatti correre su NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Zoom Gels (Invitrogen) nella XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) secondo le indicazioni operative del produttore. Il trasferimento elettroforetico nella membrana di nitrocellulosa (Hybond-ECL; Amersham Pharmacia Biotech) è stato eseguito con un sistema mini-Trans-Blot electrophoretic cell system (Bio-Rad). La membrana è stata fissata incubandola per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione di skim milk al 5% in TBS. I sieri dei topi diluiti 1:100 in TTBS (TBS con 0,05% tween 20 e 1% skim

milk) e sono stati aggiunti alla membrana e il tutto è stato messo ad incubare per un'ora a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione, la membrana è stata lavata tre volte con TTBS e messa ad incubare per un'ora a temperatura ambiente con la soluzione contenente l'anticorpo secondario (diluito 1:500 in TTBS) costituito da un anticorpo anti-mouse di capra coniugato con perossidasi (Sigma). La membrana è stata nuovamente sottoposta a tre lavaggi con TTBS e trattata per la rivelazione con il CN/DAB substrate kit (Pierce).

#### **5.8- Saggio per la proliferazione degli splenociti e la secrezione delle citochine**

Le cellule mononucleate della milza dei topi sono state isolate e preparate come descritto in letteratura (Xiao *et al.*, 2004) e sono state coltivate in una piastra 96-wells con il fondo piatto alla densità di  $2 \times 10^5$  cellule/well. Sono stati poi aggiunti in ogni pozzetto 100  $\mu$ l di medium con o senza la rP48 (15  $\mu$ g/ml), mentre il controllo positivo era costituito dalla concanavalina A (5  $\mu$ g/ml). Ogni campione di splenociti è stato piastrato in triplicato e la risposta proliferativa è stata valutata con il Cell Titer 96 AQueous one solution cell proliferation assay (Promega) secondo il seguente protocollo:

*1. scongelare il CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent in un bagno termostato a 37°C*

2. aggiungere 20  $\mu$ l di CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent in ogni pozzetto con la coltura cellulare (contenente 100  $\mu$ l di medium) e miscelare bene
3. incubare la piastra per 1-4 ore in un incubatore umidificato a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
4. misurare l'assorbanza a 490 nm

L'indice di stimolazione (SI) è stato calcolato come il rapporto tra l'OD media dei pozzetti contenenti cellule stimulate dall'antigene e l'OD dei pozzetti contenenti solo le cellule con il medium. Da queste cellule è stato estratto l'RNA totale con il Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) seguendo il protocollo precedentemente riportato; in seguito è stato sintetizzato il cDNA usando il SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen), seguendo la metodica già discussa. Sono state allestite delle reazioni di PCR per valutare la funzionalità di alcuni oligonucleotidi e per stabilire la presenza di diversi livelli di espressione di citochine nei topi vaccinati e in quelli di controllo. Sono state selezionate dalla letteratura coppie di primers per le citochine di topo e per il fattore di trascrizione T<sub>h</sub>: IFN- $\gamma$  e IL-2 (Ramos-Payan *et al.*, 2003); IL-12p40 e IL-4, (Liu *et al.*, 2005); T-bet (Liu *et al.*, 2003); gata3 (Ise *et al.*, 2002). Gli stessi primers sono stati utilizzati in real-time PCR per valutare le quantità relative di ogni citochina/fattore di trascrizione negli animali di controllo e in quelli vaccinati. In base ai risultati della RT-PCR tradizionale, i primers prescelti per IFN- $\gamma$  sono stati sostituiti con oligonucleotidi di nuova progettazione

IFN- $\gamma$ /MOUSE/F: 5'TACTGCCACGGCACAGTCAT 3'  
IFN- $\gamma$ /MOUSE/R: 5' TCCTTTTGCCAGTTCCTCCA 3'

Il gene per la  $\beta$ -actina è stato scelto come controllo interno per normalizzare l'espressione genica ed i primers prescelti (Ramos-Payan *et al.*, 2003) sono stati utilizzati sia per la PCR tradizionale che per la RT-PCR. Le amplificazioni in real-time PCR (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biotechnologies) sono state realizzate utilizzando il Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Promega) seguendo le indicazioni fornite dal produttore e utilizzando il seguente programma:

1 ciclo a 95°C per 2 minuti, 40 cicli a 95°C per 15", 60°C per 20".

I segnali di PCR sono stati analizzati con utilizzando l'opzione "relative quantification DDCT" del software SDS 2.2.2. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte.

## 5.9- ELISA antigene-specifico

I sieri sono stati analizzati per la ricerca di anticorpi specifici contro l'rP48. Le piastre microplate (Nunc maxysorp) sono state sensibilizzate mettendo ad incubare i pozzetti tutta la notte a 37°C con 100 µg/well di rP48. Dopo quattro lavaggi con PBS le piastre sono state bloccate con 150 µl/well di PBS contenente 2.5% di caseina (Sigma) e messe nuovamente in incubazione per un'ora a 37°C; trascorso il tempo di incubazione sono state sottoposte a 4 lavaggi e sono stati aggiunti i campioni di siero (100 µl/well) diluiti 1:20 con una soluzione di PBS contenente 1.25% di caseina. Le piastre così preparate sono state messe ad incubare per due ore a 37°C. In seguito sono state nuovamente lavate e incubate con anticorpi di capra anti-mouse IgG (Sigma), anti-mouse IgG1-HRP (Santa Cruz) o anti-mouse IgG2a-HRP (Santa Cruz) marcati con perossidasi (100 µl/ml). Dopo i lavaggi finali, la reazione enzimatica è stata sviluppata con *p*-nitrofenilfosfato in soluzione di 3,3',5,5'-tetrametil-benzoidina (Zymed Labs) e bloccata dopo 5 minuti mediante l'aggiunta di acido solforico 0.2 M ed è stata letta a 450 nm.

Sono stati ottenuti box-plot di assorbanza dell'ELISA per i topi appartenenti al gruppo vaccinato e a quello di controllo contemporaneamente grazie all'uso di Minitab.

## **5.10- Valutazioni statistiche**

La significatività statistica delle differenze delle medie tra i due gruppi è stata valutata per ogni citochina con il test non parametrico Mann-Whitney e con Anova (Minitab release 13.0). Tutte le conclusioni sono basate su un livello di significatività di  $P < 0.05$ .

## *Capitolo 6*

### ***Risultati***

#### **6.1- Costruzione dei plasmidi contenenti il gene *p48***

L'induzione dell'immunità umorale e cellulare determinata dall'immunizzazione genetica è stata riportata in modelli di diverse malattie infettive (Lowe *et al.*, 2006). Per verificare il gene per l'antigene P48 di *M.agalactiae* fosse in grado di indurre una risposta immunitaria sono stati costruiti i plasmidi pcDNA3.1/P48, pVAX1/P48, e pCMV-Script/P48. Il gene *p48* di *M.agalactiae* è stato amplificato mediante PCR dal vettore pGEX-2T/P48; il prodotto di PCR è stato visualizzato in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% (Fig. 11) ed in seguito è stato digerito, purificato e clonato nei vettori pcDNA3.1, pVAX1 e pCMV-Script digeriti in precedenza con gli stessi enzimi di restrizione e purificati.

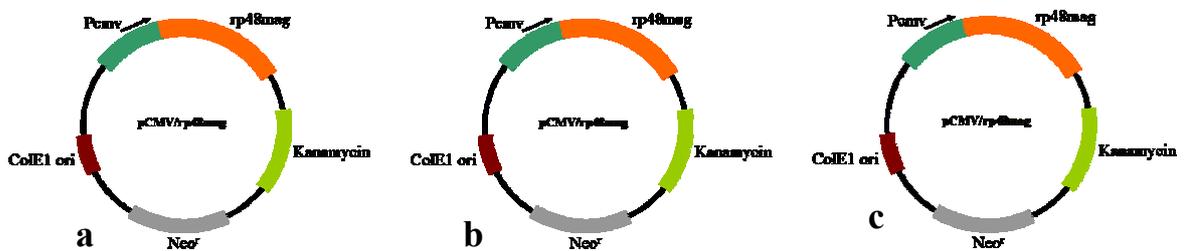
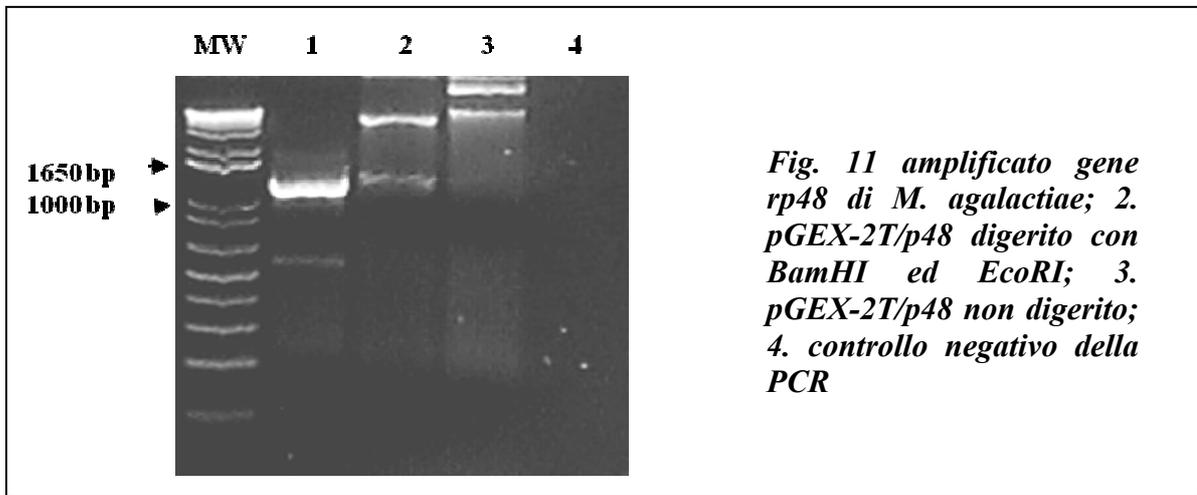
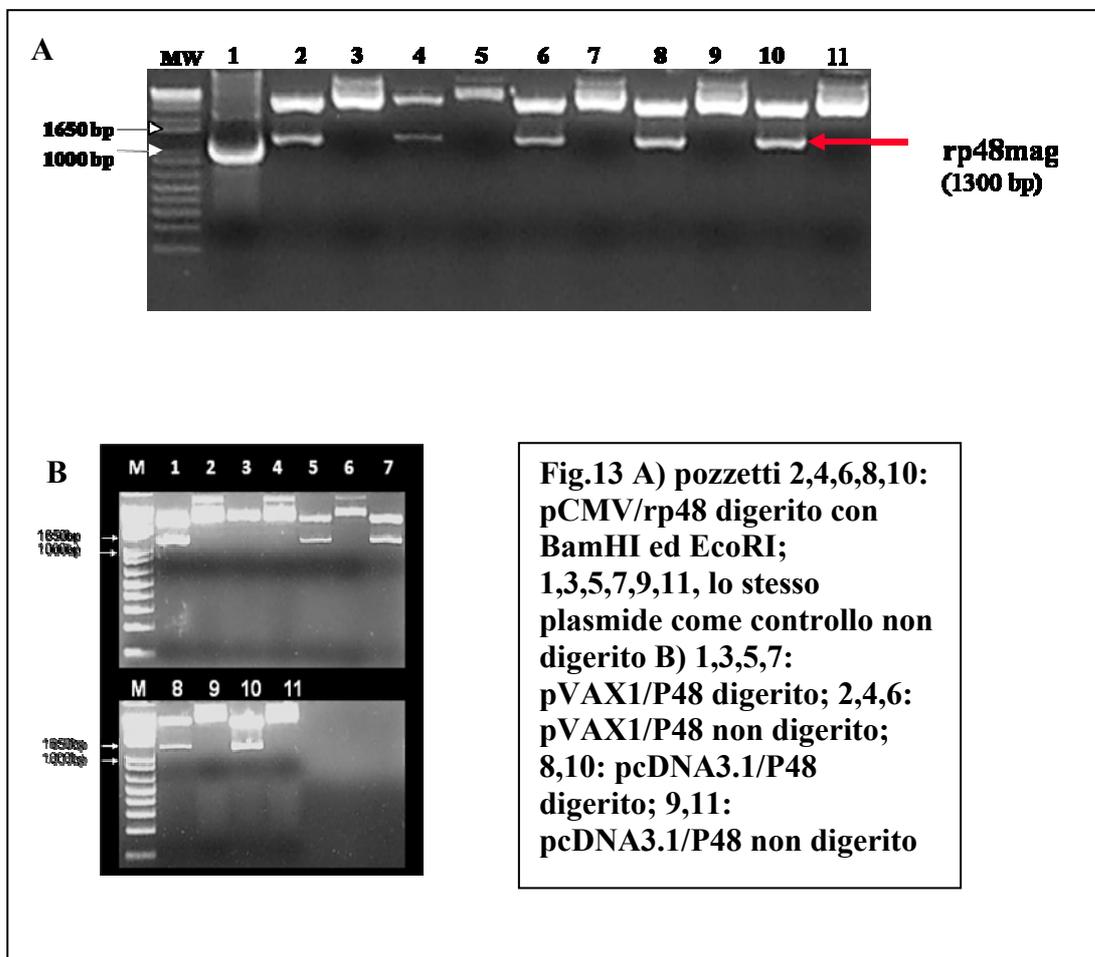


Fig. 12: Schema dei plasmidi ricombinanti ottenuti dopo clonaggio del gene per la *p48* nei plasmidi: *pCMV* (a), *pcDNA3* (b) e *pVAX* (c)

I vettori ricombinanti ottenuti (Fig 12) sono stati inseriti in *E. coli* mediante trasformazione e le colonie ricombinanti sono state selezionate per la resistenza

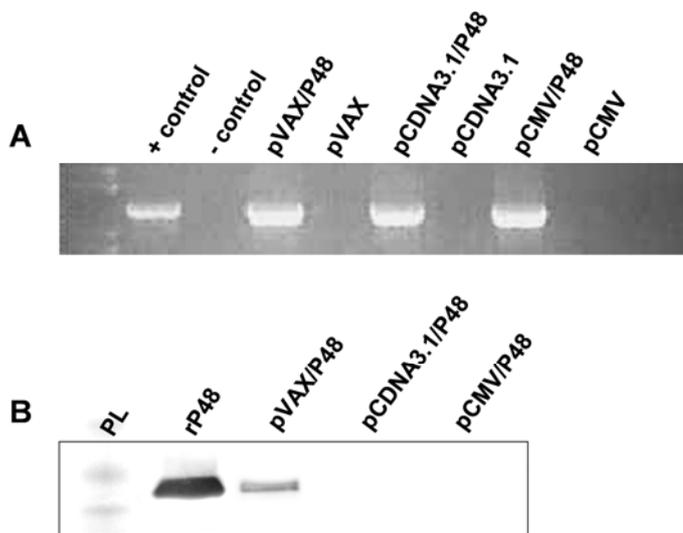
all'antibiotico codificata dal plasmide. Sono state allestite delle piccole colture da cui sono stati estratti i plasmidi; questi sono stati sottoposti a reazione di restrizione per verificare la presenza dell'inserto contenente il gene *p48*. I prodotti di digestione sono stati separati in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% (Fig. 13 A e B).



**Fig. 13: digestione di controllo dei plasmidi prodotti**

## 6.2- Espressione in vitro dei plasmidi contenenti il gene *p48*

Per assicurarsi che il gene *p48* venisse trascritto in cellule di mammifero, diverse colture cellulari HEK 293 sono state transfettate con i plasmidi, dopo l'induzione dell'espressione è stato estratto l'RNA totale e la presenza dell'mRNA specifico è stata verificata in RT-PCR. Come mostrato nella figura 14 A è stato amplificato un amplicone di circa 1.3 kb sia dalle cellule infettate indipendentemente dai tre plasmidi ricombinanti che dal vettore pGEX-2T/P48, utilizzato come controllo positivo per la PCR. Nonostante l'mRNA venga sintetizzato, non è stato possibile rilevare la proteina P48 nei lisati cellulari delle cellule transfettate con i plasmidi pcDNA3.1/P48 e pCMV-Script/P48, ma solo in quelle con pVAX1/P48 (Fig. 14 B).

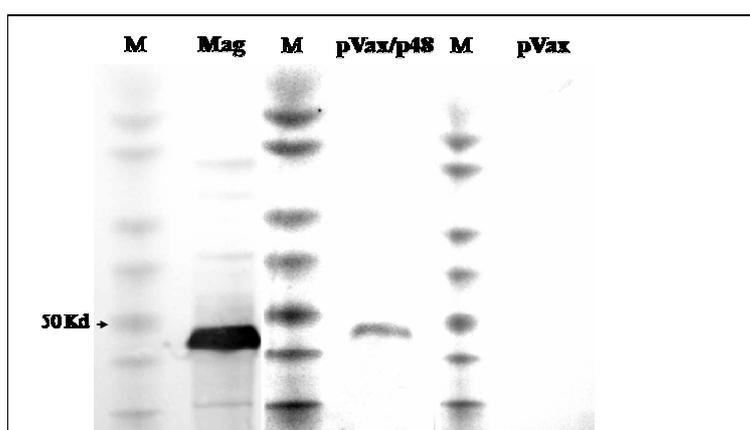


**Fig.12: Rilevazione in immunoblotting della trascrizione del gene *p48* (A) e della proteina P48 (B) in cellule HEK transfettate.**

Il sequenziamento del plasmide pVAX1/P48 ha confermato il clonaggio corretto del gene p48 nel vettore; questo plasmide è stato quindi scelto per la fase di immunizzazione genetica.

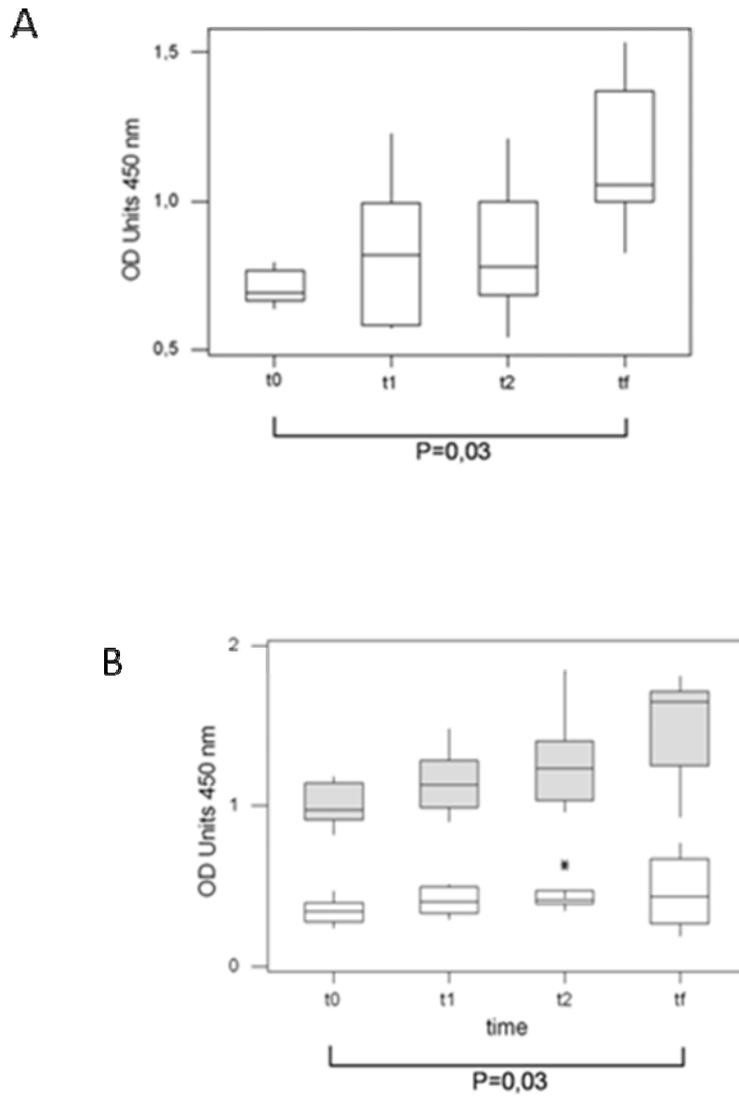
### 6.3- Valutazione della risposta immunitaria umorale alla vaccinazione

La risposta immunitaria umorale indotta dal plasmide pVAX1/P48 nei topi vaccinati è stata valutata in immunoblotting e in rP48-ELISA. Come mostrato nella figura 15, sono stati rilevati anticorpi IgG specifici per la rP48 nel pool di sieri provenienti nei topi vaccinati, nel momento T<sub>3</sub>, mentre il pool di sieri dei topi di controllo, prelevati nello stesso momento, non ha mostrato nessuna reattività con la rP48.



**Fig.15: Valutazione della risposta umorale nei topi vaccinati con pVAX1/P48 in immunoblotting: Mag = reattività della rP48 con siero di coniglio iperimmune anti-rP48 (controllo positivo); pVAX1/P48 = pool di sieri dei topi vaccinati prelevati a T<sub>3</sub>; pVAX = pool di sieri dei topi di controllo prelevati a T<sub>3</sub>**

È stato effettuato un test ELISA di prova per individuare la sottoclasse delle IgG e per quantificare il titolo anticorpale (Fig. 16A); non è stata rilevata nessuna differenza staticamente significativa nei i titoli delle IgG tra i sieri del gruppo di controllo prelevati nei momenti T0, T1, T2, T3, mentre il titolo delle IgG dei topi vaccinati nel momento T3 era significativamente più elevato di quello dei sieri prelevati a T0. Quando i sieri dei topi vaccinati presi nei diversi tempi di campionamento sono stati testati per cercare diverse sottoclassi di anticorpi, non è stato possibile rilevare un aumento statisticamente significativo del tasso di IgG2a, mentre era presente una differenza statisticamente significativa nel titolo delle IgG1 (Fig. 16B).

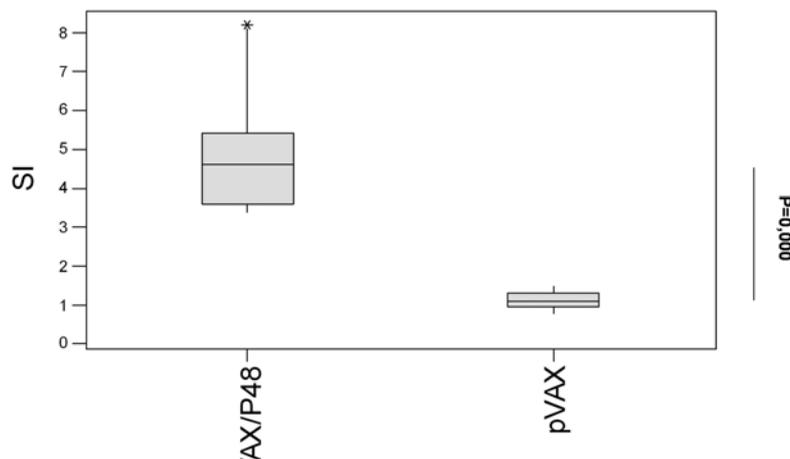


**Fig. 16: rP48-ELISA: A) variazioni del titolo di IgG; B) variazioni nel titolo di IgG1 (bianco) e IgG2 (grigio)**

È possibile comunque osservare un progressivo aumento dell'assorbanza delle IgG2a nei sieri dei topi vaccinati con il plasmide pVAX1/P48, anche se questo dato non è rilevante dal punto di vista statistico.

#### 6.4- Proliferaazione delle cellule mononucleate nella milza

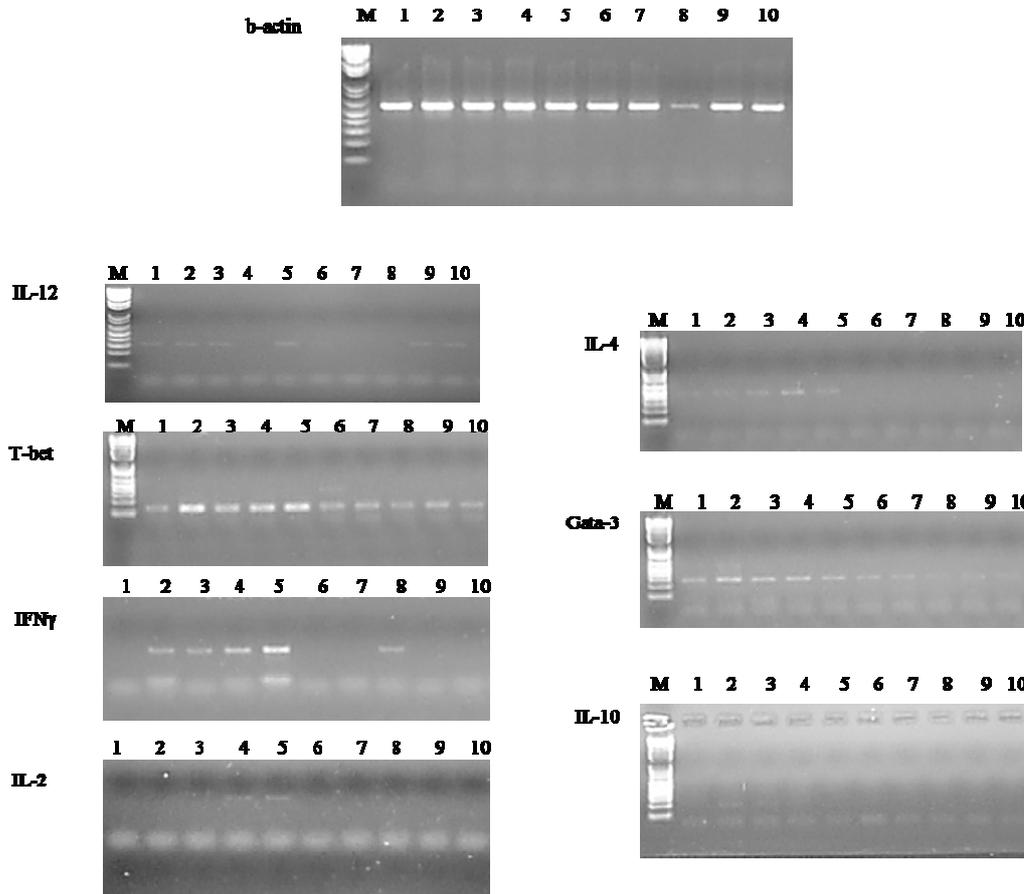
Per verificare se la vaccinazione con il vettore pVAX1/P48 è in grado di indurre una risposta proliferativa specifica. Le cellule mononucleate sono state isolate dalla milza dei topi otto settimane dopo l'inoculazione di pVAX1/P48 (nei topi vaccinati) o pVAX1 (nel gruppo di controllo) e sono state sottoposte a stimolazione con la proteina rP48 purificata per 72 ore. Come mostrato in figura 17, il vaccino pVAX1/P48 è in grado di indurre una proliferazione specifica in risposta alla rP48. L'indice di stimolazione medio dei topi vaccinati ha un valore stimato di 4.8, mentre non è stata rilevata alcuna attività proliferativa delle cellule mononucleate prelevate dai topi inoculati con pVAX1.



**Fig. 17: Test di proliferazione di cellule mononucleate prelevate dalla milza di topi immunizzati con pVAX1/P48 o pVAX1.**

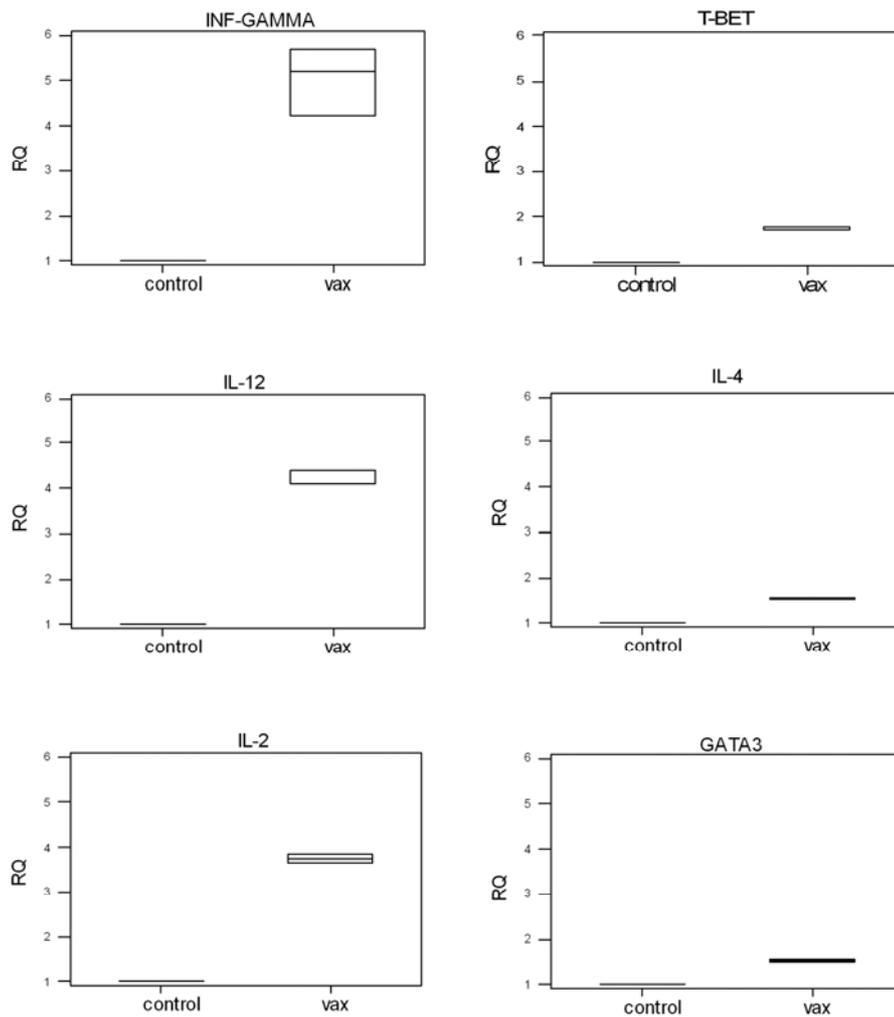
## 6.5- Ricerca degli mRNA specifici delle citochine in cellule mononucleate

Per verificare la presenza di mRNA specifici per le citochine nelle cellule mononucleate della milza, otto settimane dopo la prima immunizzazione con pVAX1/P48, sono state allestite delle reazioni di RT-pcr (fig. 18) e RT-real time PCR specifiche; l'mRNA per la  $\beta$  actina è stato utilizzato come riferimento per normalizzare i livelli degli mRNA specifici per le citochine.



**Fig. 18: 1,2,3,4,5: topi vaccinati con pVAX/P48; 6,7,8,9,10: topi vaccinati con pVAX**

Come mostrato in figura 19, le cellule prelevate dalla milza dei topi inoculati con pVAX1/P48 hanno sintetizzato quantità significativamente maggiori di mRNA di IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-2 rispetto alle stesse cellule prelevate dai topi del gruppo di controllo inoculato con pVAX1. Nei topi immunizzati con pVAX1/P48 è possibile osservare anche un lieve aumento di T-bet, IL-4, e GATA-3.



**Fig. 19: Quantità relative delle citochine espresse nella milza dei topi vaccinati e in quella dei topi di controllo, valutate in RT real time PCR.**

## *Capitolo 7*

### **Discussione e conclusioni**

Le difficoltà e i problemi legati alla diagnosi e al controllo della Agalassia contagiosa attraverso pratiche di igiene sanitaria hanno reso lo sviluppo di strumenti di profilassi basati sull'immunizzazione attiva una necessità. Nonostante i vaccini inattivati conferiscano protezione dall'Agalassia Contagiosa (Greco *et al.*, 2002; Nicholas, 2002; Tola *et al.*, 1999), il loro utilizzo ha molti svantaggi. Ad esempio: non c'è possibilità di distinzione tra animali naturalmente infetti e animali vaccinati, necessitano di adiuvanti e di diverse inoculazioni e producono una risposta per lo più umorale di breve durata.

Un'alternativa è costituita dai vaccini a DNA, il cui utilizzo è in via di sperimentazione nella terapia di alcuni tipi di tumori e soprattutto delle malattie infettive (Lowe *et. al*, 2006). Diverse ricerche recenti hanno dimostrato che i vaccini a DNA sono in grado di indurre un'immunità sia di tipo umorale che cellulo-mediata, e che essi rappresentano un utile strumento per la vaccinazione

contro i micoplasmi (Barry *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 1997; March *et al.*, 2006).

In questo studio il gene *p48* di *Mycoplasma agalactiae*, codificante un antigene immunodominante con funzione putativa di *solute binding protein* di un ABC transporter, è stato clonato nel plasmide di espressione eucariotico pVAX1. La funzionalità e immunogenicità del costrutto sono state valutate controllando l'espressione in HEK 293 e investigando il tipo di risposta immunitaria indotta in topi BalbC. Come mostrato in figura 12, è stato possibile isolare l'mRNA specifico per la proteina P48 in cellule HEK 293 transfettate con il vettore ricombinante; in queste stesse cellule, la quantità di proteina P48 era abbastanza elevata da poter essere rilevata in Western blotting. La produzione di anticorpi specifici contro la P48, la proliferazione degli splenociti e l'aumentata secrezione di citochine nei topi immunizzati con il vettore pVAX1/P48 (figure 15,16,17 e 19) hanno ulteriormente dimostrato che negli animali vaccinati veniva espressa la proteina P48 e che veniva indotta una risposta immunitaria.

I motivi CpG agiscono come un “segnale di pericolo” e come enhancer della risposta immunitaria Th1 nella vaccinazione a DNA tramite interazione con le cellule TLR9-positive (Liu *et al.*, 2005). In aggiunta a quelli del vettore pVAX1, il vettore pVAX1/P48 contiene altri due motivi CpG, ggCGtt e aaCGct localizzati nella sequenza del gene *p48*. Nella stessa sequenza sono assenti

motivi CpG esamerici, che possono inibire l'immunogenicità dei vaccini a DNA.

La lipoproteina P48 è un antigene superficiale invariabile che appartiene ad una famiglia di proteine basiche di membrana. Il gene *p48* (Rosati *et al.*, 1999) e i suoi omologhi in *M.bovis* (Robino *et al.*, 2005), *M.capricolum* (Alberti *et al.* 2007) e *M.mycooides* (dati non pubblicati) sono localizzati a monte dell'ATP-binding protein di un ABC transporter. L'uso di Blast-p ha permesso di individuare una forte e significativa omologia tra la P48 e differenti solute binding proteins di ABC-transporters indentificati in micoplasmi e in altre specie batteriche. In particolare, la proteina P48 ha un elevato grado di omologia con la Xylose binding protein dell'ABC transporter di *Mycoplasma pulmonis* (E value  $8e-30$ ), *Mycoplasma hypneumoniae* (E value  $1e-27$ ), e *Mycoplasma sinoviae* (E value  $3e-22$ ) e con le solute binding proteins di un sistema di trasporto ABC-type (non caratterizzato) di *Oenococcus oeni* (E value  $5e-08$ ), *Clostridium sticklandii* (E value  $5e-07$ ), e *Spiroplasma citri* ( $9e-08$ ). Questi dati indicano quindi che anche la proteina P48 di *M.agalactiae* ha probabilmente un'attività di solute binding protein.

È stato dimostrato che gli ABC transporters sono altamente immunogenici e rappresentano dei target ideali per lo sviluppo di vaccini contro gli agenti infettivi (Garmory & Titball, 2004); per esempio, l'immunizzazione con le proteine PiaA e PiuA (iron uptake proteins appartenenti a un ABC transporter)

previene infezioni respiratorie e sistemiche da *Streptococcus pneumoniae* (Brown *et al.*, 2001).

Per questi motivi, l'uso della P48 potrebbe rappresentare un candidato adatto per lo sviluppo di un vaccino a DNA contro l'agalassia contagiosa.

È stato dimostrato che la vaccinazione a DNA è in grado di indurre sia la risposta immunitaria umorale che quella cellulare. Le cellule  $T_h1$  possono indurre i macrofagi a distruggere microorganismi intracellulari in maniera più efficiente e stimolano le cellule B a produrre massivamente anticorpi opsonizzanti come IgG2a e IgG2b nei topi (Gurunathan *et al.*, 2000). La funzione più importante delle cellule  $T_h2$  è indurre le cellule a proliferare e produrre anticorpi, come le IgG1 e altri tipi.

Nei topi vaccinati con il plasmide pVAX1/P48 si è riscontrato un lieve ma significativo aumento delle IgG, apparentemente associato alla sottoclasse IgG1. Non è stato possibile osservare un aumento del titolo di IgG2 in rP48-ELISA. Nonostante questo, la linfoproliferazione e l'espressione delle citochine in cellule della milza stimulate dall'antigene P48 sono tipiche di una risposta immunitaria di tipo  $T_h1$ . Infatti nella milza dei topi vaccinati sono stati rilevati elevati livelli di IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-2 caratteristici della risposta  $T_h1$ ; negli stessi campioni è stato osservato un lieve incremento di IL-4. I due fattori di trascrizione T-BET e GATA-3, associati alla modulazione, rispettivamente, di  $T_h1$  e  $T_h2$ , sono stati debolmente attivati nei topi immunizzati con pVAX1/P48.

In conclusione, in questo studio è stato dimostrato che la vaccinazione genetica con il vettore pVAX1/P48 è in grado di indurre le risposte  $T_h1$  e  $T_h2$  (con tendenza verso la risposta  $T_h1$  associata con una debole risposta  $T_h2$  dimostrata da dall'aumento delle IgG1) e rappresenta un potenziale approccio nella messa a punto di vaccini contro *M.agalactiae*. Nei topi vaccinati con pVAX1/P48 si rileva un incremento significativo dei livelli di specifiche IgG nel siero, della proliferazione degli splenociti e dei tassi di citochine specifiche delle cellule T. Tuttavia l'esperimento ha messo in evidenza i limiti del costrutto pVAX1/P48 nella capacità di stimolare adeguatamente la risposta umorale.

Per ovviare a questo limite il plasmide ottenuto in questo lavoro è stato modificato inserendo a al suo interno, a monte della sequenza che codifica per la proteina rP48, una sequenza di circa 100bp del gene codificante per l'attivatore del plasminogeno tissutale TPA (Tissue Plasminogen Activator). Questa sequenza codifica per un peptide leader che ha la funzione di indirizzare la proteina prodotta verso l'esterno della cellula, aumentando quindi, nelle cellule transfettate, la secrezione dell'antigene prodotto con conseguente maggiore possibilità di stimolazione dei linfociti B.

Probabilmente un vaccino allestito con un unico antigene ricombinante potrà non essere sufficiente ad indurre nell'ospite un'immunità protettiva nei confronti del *Mycoplasma agalactiae* per cui sarà necessario aggiungere nel plasmide geni

codificanti per altre proteine invariabili costantemente espresse sulla membrana del patogeno.

Non è comunque possibile fare delle previsioni generali in base alla risposta nel modello murino alla vaccinazione con pVAX1/P48 ed è quindi necessario valutare il potenziale di questo vaccino nell'ospite naturale; per questo nei prossimi mesi il vaccino verrà testato direttamente sulla pecora, nella quale sarà possibile effettuare dopo la vaccinazione l'infezione sperimentale con il *Mycoplasma agalactiae*.

## *Bibliografia*

1. **Adegboye, D.S., U. Rasberry, P.G. Halbur, J.J. Andrews, and R.F. Rosenbusch.** 1995. Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 261-265.
2. **Adler HE, DaMassa AJ, Brooks DL:** 1980, Caprine Mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. *Am J Vet Res* 41:1677-1679.
3. **Ball, H.J., D. Finlay, and G.A.C. Reilly.** 1994a. Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. *Vet. Rec.* 135: 531-532.
4. **Ball, H.J., D.P. Mackie, D. Finlay, J. Gunn, E.A. MacFarland, G.A.C. Reilly, and D. Pollock.** 1994b. An antigen-capture ELISA for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Ir. Vet. J.* 47: 45-52.
5. **Barnes, A. G., Barnfield, C., Brew, R. & Klavinskis, L. S.** (2000) Recent developments in mucosal delivery of pDNA vaccines. *Current Opinions in Molecular Therapeutics* 2, 87–93
6. **Barry, M.A., W. C. Lai, and S. A. Johnston.** 1995. Protection against mycoplasma infection with expression-library immunization. *Nature* 377:632–635
7. **Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F.,** 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16 (3), 848–873.
8. **Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M.Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. Wayne Davis, H. A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1462.
9. **Bogdan, C., Schroppel, K., Lohoff, M., Rollinghoff, M.& Solbach, W.** (1990) Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4<sup>+</sup> T cells. *European Journal of Immunology* 20, 2533–2540

10. **Boretti, F. S., Leutenegger, C. M., Mislin, C., Hofmannlehmann, R., Konig, S., Schroff, M., Junghans, C., Fehr, D., Huettner, S. W., Habel, A., Flynn, J. N., Aubert, A., Pedersen, N. C., Wittig, B. & Lutz, H.** (2000) Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression. *AIDS* 14, 1749–1757
11. **Brank, M., D. Le Grand, F. Poumarat, P. Brezille, R. Rosengarten, and C. Citti.** 1999. Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 861-867.
12. **Brown, J. S., A. D. Ogunniyi, M.C. Woodrow, D. W. Holden, and J. C. Paton.** 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 69:6702-6.
13. **Brown, M.B., J.K. Shearer, and F. Elvinger.** 1990. Mycoplasmal mastitis in a dairy herd. *J. AM.Vet. Med. Assoc.* 196: 1097-1101.
14. **Byrne, W.J., H.J. Ball, N. Brice, R. McCormack, S.E. Baker, R.D. Ayling, and R.A.J. Nicholas.** 2000. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.* 146: 368-369.
15. **Carter, G.R., and M.M.Chengappa.** 1991. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology.* Lea & Febiger. Philadelphia, London.
16. **Chavez Gonzales, Y.R., C.R. Bascunana, G. Bolske, J.G. Mattsson, C. Fernandez Molina, and K-E Johansson.** 1995. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.* 47: 183-190.
17. **Chen, Y. L., S. N. Wang, W. J. Yang, Y. J. Chen, H. H. Lin, and D. Shiuan.** 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun.* 71:1155-60.
18. **Cohen, J.** (1993) Naked DNA points way to vaccines. *Science* 259, 1691–1692
19. **Corrales J.C. , Esnal C. De la Fea, A. Sanchez P. Assuncao J.B. Poveda A. Contreras** 2007 Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68 (2007) 154–166
20. **Corrales, J.C., Sanchez, A., Luengo, C., Poveda, J.B., Contreras, A.,** 2004. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano–Granadina goat herds. *J. Dairy Sci.* 87 (10), 3165–3171.

21. **Damassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., Moe, A.I.,** 1987. Caprine mycoplasmosis: an outbreak of mastitis requiring the destruction of 700 goats. *Vet. Rec.* 120 (17), 409–413.
22. **Dohms, J.E., L.L. Hnatow, P. Whetzel, R. Morgan, and C.L. Keeler.** 1993. Identification of the putative cytoadhesion gene of *Mycoplasma gallisepticum* and its use as a DNA probe. *Avian. Dis.* 37: 380-38839.
23. **Dunham Stephen P.,** 2002. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science* 2002, 73, 9–16
24. **East NE, DaMassa AJ, Logan LL, Brooks DL, McGowan B.,** 1983, Milkbourne outbreak of *Mycoplasma Mycoides* subspecies *mycoides* infection in a commercial goat dairy. *J Am Vet Med Assoc* 182:1338-1341
25. **Farina, R., and F. Scattozza,** a cura di. 1998. *Trattato di malattie infettive degli animali*, seconda edizione. UTET
26. **Femenia, F., Crespeau, F., Fontaine, J. J., Boucheix, C. & Parodi, A. L.** (1994) Early haematological and pathological abnormalities of pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Veterinary Research* 25, 544–554
27. **Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, J. L. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Saudek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J-F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P.-C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Petterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison III, and J. C. Venter.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270:397–403.
28. **Gaillard-Perrin G, Picavet DP, Perrin G:** 1985, Isolement de *Mycoplasma putrefaciens* dans deux troupeaux de chèvres presentant des symptoms d'agalactie. *Revue Med vet* 137:67-70
29. **Garmory, H.S., and R.W. Titball.** 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect Immun.* 69:6702.
30. **Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M., Alonso, J.M., Rey, J., Poveda, J.B., Hermoso de Mendoza, J.,** 1999a. Mastitis caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (large colony type) in goat flocks in Spain. *Zentralbl. Veterinaermed. B* 46 (10), 741–743.

31. **Gil, M.C., Pena, F.J., Hermoso, d.M., Gomez, L.,** 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50 (10), 484–487.
32. **Glansbeek, H. L., Haagmans, B. L., Lintelo, E. G., Egberink, H. F., Duquesne, V., Aubert, A., Horzinek, M.C. & Rottier, P. J.** (2002) Adverse effects of feline IL-12 during DNA vaccination against feline infectious peritonitis virus. *Journal of General Virology* 83, 1–10
33. **Goltz JP, Rosendal S, McCraw BM, Ruhnke HL:** 1986 experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. *Can J Vet Res* 50:59-57
34. **Gourlay, R.N., L.H. Thomas, and S.G. Wyld.** 1989. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet. Rec.* 124: 420-422.
35. **Greco, G., M.Corrente, D. Buonavoglia, A. Aliberti, and A. Fasanella.** 2002. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.* 25:17-20.
36. **Gurunahan, S., KlinmanLINMAN, D. M.& Seder, R. A.** (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Reviews of Immunology* 18, 927–97
37. **Gurunahan, S., Prussin, C., Sacks, D. L. & Seder, R. A.** (1998) Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine* 4, 1409–1415
38. **Gurunathan, S., D.M.Klinman, and R.A. Seder.** 2000. DNA vaccines: immunology, Application , and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-974.
39. **Hanlon, L., Argyle, D., Bain, D., Nicolson, L., Dunham, Golder, M.C., Mcdonald, M., Mcgillivray, C., Jarrett, O., Neil, J. C. & Onions, D. E.** (2001) Feline leukaemia virus vaccine efficacy is enhanced by co-administration with Il-12 and IL-18 expression vectors. *Journal of Virology* 75, 8424–8433
40. **Hasso, S.A., Aldarraji, A.M., Alaubaidi, J.M.,** 1994. Pathology of experimentally-induced contagious agalactia in goats. *Small Rumin. Res.* 13, 79–84.
41. **Hasso, S.A., Al-Omran, A.H.,** 1994. Antibody response patterns in goats experimentally infected with *Mycoplasma agalactiae*. *Small Rumin. Res.* 14, 79–81.

42. **Heller, M., E. Berthold, H. Pfutzner, R. Leirer, and K. Sachse.** 1993. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet. Microbio.* 37: 127-133.
43. **Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B.-C. Li, and R. Herrmann.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24:4420–4449.
44. **Himmelreich, R., H. Plagens, H. Hilbert, B. Reiner, and R. Herrmann.** 1997. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.* 25:701–712.
45. **Hosie, M.J., Flynn, J. N., Rigby, M.A., Cannon, C., Dunsford, T., Mackay, N. A., Argyle, D., Willet, B. J., Miyazawa, T., Onions, D. E., Jarrett, O. & Neil, J. C.** (1998) DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies. *Journal of Virology* 72, 7310–7319.
46. **Howard, C.J., J. Collins, and R.N. Gourlay.** 1977. A single radial haemolysis technique for the measurement of antibody to *Mycoplasma bovis* in bovine sera. *Res. Vet. Sci.* 23:128-130.
47. **Hyman, H.C., D. Yogev, and S.Razin.** 1987. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 726-728.
48. **Ise, W., M.Totsuka, Y. Sogawa, A. Ametani, S. Hachimura, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa.** 2002. Naive CD4<sup>+</sup> T Cells Exhibit Distinct Expression Patterns of Cytokines and Cell Surface Molecules on Their Primary Responses to Varying Doses of Antigen. *J. Immunol.* 168:3242-3250.
49. **ITO, Y.** (1960) A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (shope) of cottontail rabbits. *Virology* 12, 596–601
50. **Jensen, J. S., H. T. Hansen, and K. Lind.** 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* 34:286–291.
51. **Knudtson, W.U., D.E. Reed, and G. Daniels.** 1986. Identification of Mycoplasmatales in pneumonic calf lungs. *Vet. Microbiol.* 11: 79-91.
52. **Lai, W. C., S. P. Pakes, K. Ren, Y.S. Lu, and M.Bennett.** 1997. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol.* 158:2513-6.

- 53. Lambert, M.,** 1987. Contagious agalactia of sheep and goats. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 6 (3), 681–697.
- 54. Laylor, R., N. Porakishvili, J. B. De Souza, J.H. Playfair, P. J. Delves, and T. Lund.** 1999. DNA vaccination favours memory rather than effector B cell responses. Clin Exp Immunol. 117:106-12.
- 55. Liu, L., X. Zhou, H. Liu, L. Xiang, and Z. Yuan.** 2005. CpG motif acts as a 'danger signal' and provides a T helper type 1-biased microenvironment for DNA vaccination. Immunology 115:223-30.
- 56. Liu, N., N. Ohnishi, L. Ni, S. Akira, and K.n B. Bacon.** 2003. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. Nature Immunology 4:687-693.
- 57. Loher, B. I., Rankin, R., Pontarollo, R., King, T., Willson, P., Babiuk, L. A. & Drunen Littel-Van Den Hurk, S.** (2001) Suppository-mediated DNA immunization induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. Virology 289, 327–333
- 58. Lowe, D. B., M.H. Shearer, and R. C. Kennedy.** 2006. DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease. J. Cell. Biochem. 98:235-242.
- 59. Maniloff, J.** 1996a. Mycoplasma phylogeny: correlation with molecular biological and paleontological changes, p. 8. In abstract of the 8th IUMS International Congress of Bacteriology.
- 60. Maniloff, J.** 1996b. The minimal cell genome: “on being the right size”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 10004-10006.
- 61. Maniloff, J., K. Dybvig, and T.L. Sladek.** 1992. Mycoplasma DNA restriction and modification, p.325-330. In J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.), Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 62. March, J. B., C. D. Jepson, J. R. Clark, M.Totsika, and M.J. Calcutt.** 2006. Phage library screening for the rapid identification and in vivo testing of candidate genes for a DNA vaccine against Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony biotype. Infect Immun. 74:167-74.
- 63. McMartin DA, McOwan KJ, Swift LL.,** 1980 A century of classical contagious caprine pleuropneumoniae: from original description to aetiology. Br Vet J 136:507-515

64. **Megid, R., R.A.J. Nicholas, and R.J. Miles.** 2001. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet. Res. Commun.* 25: 1-12.
65. **Meng, K. E., and R. M.Pfister.** 1980. Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J. Bacteriol.* 144:390–399.
66. **Mir, L. M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. & Scherman, D.** (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4262–4267
67. **Muenster, O.A. E.E. Ose, and T. Matsuoka.** 1979. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. *Can. J. Comp. Med.* 43: 392-398.
68. **Nicholas, R.A.J.** 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin. Res.* 45:145–149.
69. **Nielsen, K.H., R.B. Stewart, M.M.Garcia, and M.D. Eaglesome.** 1987. Enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma bovis* antigens in bull semen and preputial washing. *Vet. Rec.* 120: 596-598
70. **Nobiron, I., Thompsom, I., Browlie, J. & Collins, M.E.** (2000) Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 76, 129–42
71. **Pascal Sirand-Pugnet<sup>1,2</sup>, Carole Lartigue<sup>1,2</sup><sup>a</sup>, Marc Marena<sup>3</sup><sup>b</sup>, Daniel Jacob<sup>4</sup>, Aurélien Barré<sup>4</sup>, Valérie Barbe<sup>5</sup>, Chantal Schenowitz<sup>5</sup>, Sophie Mangenot<sup>5</sup>, Arnaud Couloux<sup>5</sup>, Beatrice Segurens<sup>5</sup>, Antoine de Daruvar<sup>4</sup>, Alain Blanchard<sup>1,2</sup>, Christine Citti<sup>3</sup>\*** (2007) Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* 2007 May 18;3(5):e75
72. **Pascucci Silvio** Eziopatogenesi delle micoplasmosi (Lezione al Corso di formazione organizzato dall'Area Sanità Pubblica Veterinaria e dall'Ordine dei Medici Veterinari di Forlì – Cesena : ISZLER Forlì – 15 marzo 2007)
73. **Perreau P Breard A:** 1979 La mycoplasmosse caprine à M.CapricoluM.Comp Immun Microbiol Infect Dis 2:87-97
74. **Pisetsky, D. S.** (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity.* 5, 303–310

75. **Poumarat, F., B. Perrin, and D. Longchambon.** 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.* 29: 329-338.
76. **Poumarat, F., D. Le Grand, and D. Bergonier.** 1996. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point Vet.* 28: 761-767. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
77. **Poumarat, F., D. Longchambon, and J.L. Martel.** 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within “*M. mycoides* cluster” and within “glucose and arginina-negative cluster” of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 32: 375-390.
78. **Poumarat, F., M.Perrin, P. Belli, and J.L. Martel.** 1987. Recherche des anticorps anti-*Mycoplasma bovis* dans le sérum de bovins à l’aide de la réaction d’hémagglutination passive: valeur et limites de la réaction. *Rev. Med. Vet.* 138, 12: 981-989.
79. **Ramos-Payan, R., M.Aguilar-Medina, S. Estrada-Parra, Y.M.J. Gonzalez, L. Favila-Castillo, A. Monroy-Ostria, and I.C. Estrada Garcia.** 2003. Quantification of cytokine gene expression using an economical realtime polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. *Scand. J. Immunol.* 57:439– 445.
80. **Ramshaw, I. A. & Ramsay, A. J.** (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today* 21, 163–165
81. **Razin, S.** 1978. The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42: 414-470.
82. **Razin, S.** 1991. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroplasma* p.1937-1959. *In* A. Balows, H.G. Truper, M.Dworkin, W.Harder, and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. II, 2a ed. Springer-verlag, New York, N.Y.
83. **Razin, S.** 1991. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroleplasma*, p. 1937–1959. *In* A. Balows, H. G. Tru`per, M.Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. 2, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.
84. **Razin, S.** 1993. *Mycoplasma* membranes as models in membrane research. *Subcell. Biochem.* 20: 1-28. Plenum Press, New York, N.Y.
85. **Razin, S., and E.A. Freundt.** 1984. The Mollicutes, *Mycoplasmatales*, and *Mycoplasmataceae*, p. 740-742. *In* N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.) *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, vol. I The Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

86. **Razin, S., D. Yogeve, and Y Naot.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156.
87. **Razin, S., I. Kahane, and J. Kovartovsky.** 1972. Pathog. Mycoplasmas, Ciba found. Symp., pp. 93-122.
88. **Reilly, G.A.C., H.J. Ball, J.P. Cassidy, and T.D.G. Bryson.** 1993. First reported isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 133: 550-551.
89. **Risi, G.F., D.H. Martin, J.A. Silberman, and J.C. Cohen.** 1988. A DNA probe for detecting *Mycoplasma genitalium* in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes.* 2:327-335.
90. **Robino, P, A. Alberti, M.Pittau, B. Chessa, M.Miciletta, P. Nebbia, D. Le Grand, and S. Rosati.** 2005. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol.* 109:201-9.
91. **Robinson, H. L. & Torres, C. A.** (1997) DNA vaccines. *Seminars in Immunology* 9, 271–283
92. **Rosati, S., P. Robino, M.Fadda, S. Pozzi, A. Mannelli, and M.Pittau.** 2000. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Vet Microbiol.* 71:201-10.
93. **Rosati, S., S. Pozzi, P. Robino, B. Montinaro, A. Conti, M.Fadda, and M.Pittau.** 1999. P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a malp product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. *Infect Immun.* 67:6213-6.
94. **Rosendal, S.** 1994, *Ovine and Caprine Mycoplasmas, Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis:* 84-92.
95. **Rottem, S., and I. Kahane (ed.).** 1993. *Mycoplasma cell membranes.* *Subcell. Biochemistry.* 20: 1-314.
96. **Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Cabasse, E., Dufour, P., Guibert, J.M., Pepin, M.,** 2000. Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. *Vet. Res.* 31 (3), 329–337.
97. **Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Cabasse, E., Guibert, J.M., Calamel, M., Dufour, P., Vitu, C., Vignoni, M., Pepin, M.**1998. Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. *Small Rumin. Res.* 27, 31–39.

- 98. Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. & Raz, E.** (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273, 352–354
- 99. Shedlock, D. J. & Weiner, D. B.** (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68, 793–806
- 100. Stemke, G.W.** 1989. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic porcine pneumonia. *Mol. Cell. Probes.* 3: 225-232.
- 101. Sullivan ND, St.George TD, Horsfall N:** 1973 A proliferative interstitial pneumonia of sheep associated with mycoplasma infection:1 Natural history of the disease in a flock. *Aus Vet J* 49:57-62
- 102. Szeredi, L., Tenk, M., Dan, A.,** 2003. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50 (4), 172–177
- 103. Ter Laak, E.A., and J.H. Noordergraaf.** 1987. An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*. *Vet. Microbiol.* 14: 25-31.
- 104. Theiss, P., and K.S. Wise.** 1997. Localized frameshift mutation generates selective, high frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. *J. Bacteriology.* 179: 4013-4022.
- 105. Thorns, C.J.** 1978. Characterization of the antibodies detected by the film inhibition test for *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet. Sci.* 25: 386-388.
- 106. Timoney, J.F., J.H. Gillespie, F.W. Scott, and J.E. Barlogh.** 1992. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th edition, Cornell University Press. Terza edizione italiana coordinate da G. Redaelli: Hagan and Bruner's Microbiologia e Malattie Infettive degli Animali Domestici. Editoriale Grasso.
- 107. Tola, S., D. Manunta, S. Rocca, A.M.Rocchiagiani, G. Idini, P.P. Angioi, and G. Leori.** 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine* 10:2764-2768
- 108. Torres, C. A., Iwasaki, A., Barber, B. H. & Robinson, H. L.** (1997) Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *Journal of Immunology* 158, 4529– 4532
- 109. Trotter SL, Franklin RM, Baas EJ, Barile MF:** 1977, Epidemic caprine keratoconjunctivitis: Experimentally induced disease with a pure culture of *Mycoplasma conjunctivae*. *Infect and Immun* 18:816-822

110. **Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromcowski, S. H., Randall Deck, R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L. & Liu, M.A.** (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745–1749
111. **Van Rooij, E. M.A., Haagmans, B. L., De Visser, Y. E., De Bruin, M.G. M., Boersma, W. & Bianchi, A. T. J.** (1998) Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Veterinary Immunology And Immunopathology* 66, 113–126
112. **Villalba, E.J., Poveda, J.B., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Gutierrez, C., Gomez-Villamandos, J.**, 1992. An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. *Vet. Rec.* 130 (15), 330–331.
113. **Wolff, J.A., J.J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, and A. Jani.** 1992. Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in muscle. *HuM.Mol. Genet.* 1:363–369.
114. **Xiao, S., H. Chen, L. Fang, C. Liu, H. Zhang, Y. Jiang, and W. Hong.** 2004. Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine* 22: 345–351.