



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI**

**Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari**

**DOTTORATO DI RICERCA IN:  
"BIOCHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE  
MOLECOLARI"  
XXI CICLO**

***Produzione di antigeni ricombinanti  
del virus della Bluetongue***

***Tutore:***

*Dr. Alberto Alberti*

***Coordinatore:***

*Prof. Bruno Masala*

***Tesi di dottorato della Dott.ssa***

*Elisabetta Coradduzza*

Anno accademico 2007-2008

## INDICE:

|   |       |
|---|-------|
| 1. Introduzione   | 8     |
| 1.1 Caratteristiche strutturali del virus   | 8-10  |
| 1.2 Ingresso e replicazione del virus nella cellula   | 11-13 |
| 1.3 Caratteristiche fisico-chimiche del virus   | 14    |
| 1.4 Spettro d'ospite  | 14    |
| 1.5 Vettore   | 15-16 |
| 1.6 Epidemiologia   | 17-19 |
| 1.7 Patogenesi  | 20-21 |
| 1.8 Sintomatologia  | 22-26 |
| 1.9 Lesioni anatomico-patologiche   | 27-28 |
| <br>  |       |
| <b>1.10 Immunità</b>  |       |
| Risposta cellulare al BTV   | 29    |
| Induzione di citochine e prostanoidi  | 29-30 |
| Risposta immunitaria contro il virus  | 30    |
| Immunità umorale contro BTV   | 30-31 |
| Immunità cellulare contro BTV   | 31    |
| Risposta cellulare dei linfociti T in topi e pecore   | 32    |
| Risposta cellulare T helper   | 32-33 |
| <br>  |       |
| <b>1.11 Diagnosi</b>  |       |
| Diagnosi di laboratorio   | 34    |
| Campioni di sangue  | 34-35 |
| Campioni di seme  | 35    |
| Dott.ssa Elisabetta Coradduzza, Produzione di antigeni ricombinanti del virus della Bluetongue<br>Tesi di dottorato in "Biochimica, Biologia e Biotecnologie molecolari", Università degli studi di Sassari | 2     |

|  |       |
|--|-------|
| Campioni di tessuto                          | 36    |
| Tecniche di isolamento virale                |       |
| Inoculazione in uova embrionate              | 37-38 |
| Inoculazione in colture cellulari            | 38-39 |
| Inoculazione in animali                      | 39    |
| Tecniche di identificazione della bluetongue |       |
| Immunofluorescenza                           | 40    |
| ELISA-capture                                | 40    |
| Immunospot-test                              | 40    |
| AGID   | 41    |
| ELISA competitiva                            | 41    |
| Virus-neutralizzazione                       | 42    |
| Inibizione dell'emoagglutinazione            | 42    |
| Polymerase Chain Reaction (PCR)              | 42-43 |

## **1.12 Profilassi**

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| Diretta                        |       |
| Controllo delle movimentazioni | 44    |
| Quarantena                     | 44    |
| Stamping out                   | 44    |
| Lotta al vettore               | 44-45 |
| Indiretta                      |       |
| Vaccini attenuati              | 45    |
| Vaccini inattivati             | 45-46 |
| Virus-like-particles           | 46    |
| Vettori ricombinanti           | 46-47 |

|  |       |
|--|-------|
| 1.13 Proprietà della proteina VP7 del BTV  | 48    |
| 1.14 Scopo del lavoro  | 49    |
| <b>2. Materiali e metodi</b>   |       |
| 2.1 Campioni per l'isolamento virale   | 50    |
| 2.2 Trattamento dei campioni   | 50    |
| 2.3 Colture cellulari  | 50-51 |
| 2.4 Estrazione dell'RNA  | 52-53 |
| 2.5 Trattamento dell'RNA estratto con Dnasi  | 53    |
| 2.6 Retrotrascrizione dell'RNA   | 54-55 |
| 2.7 Determinazione del sierogruppo   | 56-57 |
| 2.8 Analisi di restrizione degli amplificati della NS1   | 57-59 |
| 2.9 Determinazione del sierotipo   | 60-61 |
| 2.10 Amplificazione dei geni L2 e S7   | 61-64 |
| 2.11 Clonaggio in vettore procariotico   | 65    |
| 2.12 Trasformazione di <i>Escherichia coli</i> con i plasmidi di clonaggio   | 66    |
| 2.13 Estrazione dei vettori di clonaggio dopo trasformazione di <i>Escherichia coli</i>  | 67-68 |
| 2.14 Digestione delle miniprep plasmidiche   | 69    |
| 2.15 Allestimento di maxiprep plasmidiche a partire da colture di <i>Escherichia Coli</i> trasformati con i vettori di clonaggio | 70-71 |
| 2.16 Digestione enzimatica delle maxiprep plasmidiche  | 72-73 |
| 2.17 Sequenziamento dei plasmidi pCR2.1/L2 e pCR2.1/S7   | 73    |
| 2.18 Amplificazione del gene S7 per l'inserimento nel plasmide di espressione pRSET B  | 73-74 |
| 2.19 Digestione del gene S7 amplificato con primers contenenti i siti di restrizione per <i>NcoI</i> e <i>BglIII</i>             | 75    |

|   |       |
|---|-------|
| 2.20 Plasmide scelto per il clonaggio di espressione  | 76    |
| 2.21 Digestione e defosforilazione del plasmide di espressione pRSET B  | 77-78 |
| 2.22 Clonaggio del plasmide di espressione pRSET B/S7   | 78    |
| 2.23 Trasformazione delle cellule competenti DH5 $\alpha$ con il plasmide di espressione pRSET B/S7   | 78-79 |
| 2.24 Digestione di controllo della miniprep del plasmide di espressione pRSET B/S7  | 79-80 |
| 2.25 Digestioni pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da maxi-culture   | 81    |
| 2.26 Trasformazione di <i>E.coli</i> BL21 con il plasmide di espressione pRSET B/S7   | 81-83 |
| 2.27 Digestioni di controllo del plasmide di espressione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica  | 83    |
| 2.28 Induzione pilota e monitoraggio dell'espressione della proteina VP7  | 84-85 |
| 2.29 Frazionamento in tampone fosfato dei pellet cellulari  | 86    |
| 2.30 Elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE)  | 87    |
| 2.31 Espressione della VP7 in <i>E. coli</i> BL21   | 88    |
| 2.32 Purificazione della proteina VP7 con il kit ProBond <sup>TM</sup> Purification System(Invitrogen)  | 89-92 |
| 2.33 Purificazione ottimizzata su colonna impaccata mediante cromatografia di affinità con i reagenti del kit ProBond <sup>TM</sup> Purification System | 92    |
| 2.34 Spettrometria di massa   | 93-94 |
| 2.35 Immunoblotting   | 95    |
| 2.36 ELISA  | 96    |
| 2.37 Clonaggio S7 in piante   | 97-98 |
| 2.38 Trasformazione di <i>E.coli</i> TOP10 con il plasmide pCR8/S7  | 99    |
| 2.39 Digestione di controllo del plasmide pCR8/S7   | 99    |
| 2.40 Ricombinazione plasmidica dell'entry clone pCR8/S7 con il Destination vector   | 100   |
| 2.41 Trasformazione di <i>E.coli</i> con il clone di espressione  | 100   |

|   |         |
|---|---------|
| 2.42 Controllo della presenza dell'inserto nel clone di espressione                                 | 101     |
| <b>3. Risultati.</b>  |         |
| 3.1 Determinazione del sierogruppo  | 102     |
| 3.2 Analisi di restrizione degli amplificati della NS1  | 103     |
| 3.3 Determinazione del sierotipo  | 104     |
| 3.4 Amplificazione dei gene L2 e S7   | 105-106 |
| 3.5 Purificazione degli amplificati L2 e S7   | 106-107 |
| 3.6 Digestione enzimatica dei vettori ricombinati dopo estrazione plasmidica in miniprep e maxiprep | 108-109 |
| 3.7 Sequenziamento del plasmide pCR2.1/L2   | 110     |
| 3.8 Sequenziamento del plasmide pCR2.1/S7   | 111     |
| 3.9 Amplificazione del gene S7 con primers NcoI e BglII   | 112     |
| 3.10 Digestione e defosforilazione del plasmide pRSET B e digestione dell'amplificato S7            | 113     |
| 3.11 Digestioni di controllo delle miniprep pRSETB/S7   | 114     |
| 3.12 Digestioni delle maxiprep pRSET B/S7   | 114     |
| 3.13 Sequenziamento plasmide pRSETB/S7  | 115     |
| 3.14 Digestione del pRSET B/ S7 dopo estrazione da <i>E.coli</i> BL21.                              | 115     |
| 3.15 Frazionamento in tampone fosfato   | 116-117 |
| 3.16 Purificazione della proteina VP7   | 118     |
| 3.17 Purificazione ottimizzata su colonna impaccata mediante cromatografia di affinità              | 119     |
| 3.18 Analisi della proteina mediante spettrometria di massa   | 120     |
| 3.19 Immunoblotting   | 121     |
| 3.20 ELISA  | 122-123 |
| 3.21 Amplificazione del gene S7 a partire dal plasmide pCR2.1/S7                                    | 124     |

|  |         |
|--|---------|
| 3.22 Digestione del plasmide pCR 8/S7  | 124     |
| 3.23 Sequenziamento del plasmide pCR8/S7                                       | 125     |
| 3.24 Amplificazione S7 dal clone di espressione dopo ricombinazione plasmidica | 125     |
| <br>   |         |
| <b>4. Conclusioni e discussione</b>  | 126-127 |
| <br>   |         |
| <b>5. Riferimenti bibliografici</b>  | 128-136 |

## ***1. Introduzione.***

Il *Bluetongue virus* (BTV) è un Orbivirus della famiglia *Reoviridae*, che causa sindrome emorragica principalmente nelle pecore e occasionalmente, nei bovini e nei cervi.

Il virus è trasmesso a differenti specie di ruminanti selvatici e domestici da insetti ematofagi appartenenti al genere *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*). Sebbene sia un arbovirus, BTV può occasionalmente essere trasmesso attraverso il liquido seminale e la placenta.

In totale 24 sierotipi sono riconosciuti nel mondo e, per la loro diversità, sono associati a bassi livelli di protezione crociata che complicano le strategie di vaccinazione.

BTV è diffuso in paesi tropicali, sub-tropicali e temperati; tuttavia in questi ultimi la febbre emorragica si manifesta con andamento stagionale.

Per le importanti perdite economiche che comporta, questa patologia è inserita nella lista dell'ufficio internazionale delle Epizootie (Organismo internazionale per la salute animale) che comprende malattie infettive il cui controllo è prioritario per il commercio internazionale degli animali e delle loro produzioni (35).

### ***1.1 Caratteristiche strutturali del virus.***

BTV è il prototipo del genere *Orbivirus*, al quale appartengono anche il virus della malattia emorragica (EHDV), e il virus della peste equina (AHSV).

La trasmissione di questi virus da parte dell'insetto vettore è influenzata sia da fattori genetici (ad esempio il genotipo dell'insetto o del virus), sia da fattori ambientali come la temperatura (3). BTV, EHDV, AHSV sono virus complessi privi di envelope, dotati di sette proteine strutturali e un genoma a RNA comprendente 10 segmenti di RNA a doppio filamento di taglia diversa (4, Figura 1). Essi, in base al comportamento in elettroforesi su gel

di agarosio sono distinti in “grandi” (L1, L2, L3), “medi” (M4, M5, M6) e “piccoli” (S7, S8, S9, S10). Ciascuno di essi codifica per una proteina ad eccezione del segmento S10 che codifica per due proteine non strutturali (5).

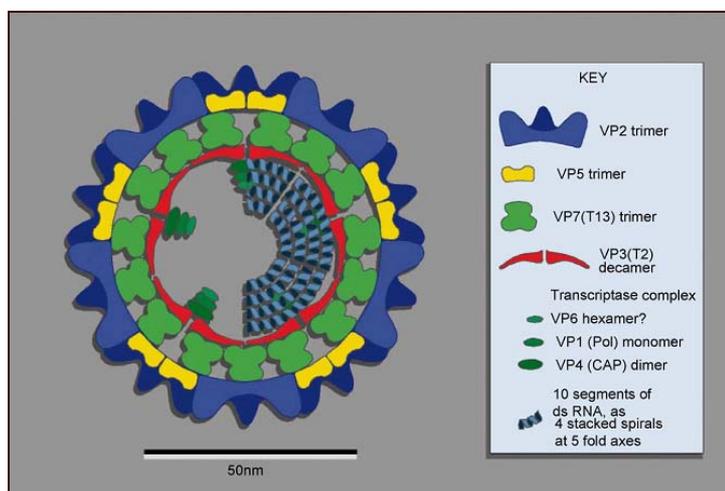


Figura 1: Diagramma schematico della struttura del BTV

Il virione ha un diametro di circa 80 nm e possiede un capsidico costituito da due strati.

L1 codifica per la proteina VP1, che è localizzata nel virione all'interno del core ed ha funzione di RNA polimerasi. Ha attività ottimale tra i 27°C e i 37°C, permettendo una replicazione efficiente del virus sia negli insetti che nelle cellule di mammifero.

L2 codifica per la proteina VP2 che è localizzata nel capsidico esterno e assume una forma appuntita. È il maggiore antigene sierotipo specifico, responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti, dell'emoagglutinazione e dell'ingresso del virus nelle cellule di vertebrato.

L3 codifica per la proteina VP3, localizzata nel sub-core virale, dove forma la base sulla quale appoggiano i trimeri della VP7 e che interagisce con i complessi di trascrizione e con l'RNA genomico, avendo quindi un ruolo importante per l'assemblaggio e la replicazione del virione.

M4 codifica la VP4, localizzata all'interno del core, che incappuccia gli RNA messaggeri precoci, stabilizzandoli e permettendone la traduzione.

M5 codifica per la proteina VP5 che insieme a VP2 costituisce il capsido esterno. VP5 ha forma globulare e sembra essere in grado di aumentare il titolo anticorpale indotto dalla VP2. Sembra inoltre di fondamentale importanza per il trasporto del core virale nel citoplasma della cellula ospite.

M6 codifica per la NS1, una proteina non strutturale che origina strutture tubulari (28, 29) nel citoplasma delle cellule infette. Questa è una caratteristica unica del virus della bluetongue e di altri orbivirus, dal momento che né le cellule infettate dai rotavirus, né quelle infettate dai reovirus esibiscono tali strutture. Questa proteina è coinvolta nella replicazione del virus, nel suo trasporto e nella sua morfogenesi (30).

S7 codifica per la VP7 che si trova nello strato superficiale del core ed è responsabile dell'ingresso del virus nelle cellule d'insetto.

S8 codifica per la proteina non strutturale NS2 che forma i corpi inclusi citoplasmatici, sede di assemblaggio del core virale e recluta l'RNA a singolo filamento del virus.

S9 codifica per la VP6 che si trova all'interno del core virale. VP6 è una elicasi, ATPasi e forma esameri in presenza di RNA virale.

S10, codifica per le glicoproteine NS3 e NS3A, associate sia alla VP2 che alla VP5. La NS3 funziona come una viroporina, facilitando il rilascio del virus, inducendo la permeabilizzazione della membrana. Inoltre, interagisce con le proteine di membrana dell'ospite Calpactina e Tsg101, così da permettere alle particelle virali di lasciare la cellula anche con un meccanismo di budding simile a quello dei retrovirus. E' quindi coinvolta sia nella maturazione che nel rilascio del virus (1, 2, 23, 24, 25, 26, 27, 35).

## ***1.2 Ingresso e replicazione del virus nella cellula.***

Nelle cellule di mammifero, l'ingresso del BTV avviene attraverso l'attacco del virus a un recettore sulla membrana plasmatica (6). Recentemente è stato dimostrato che il virus entra nelle cellule attraverso un meccanismo di endocitosi pH dipendente mediato dalla clatrina.

Le proteine del capsido esterno di BTV, che non sono glicosilate, sono responsabili dell'ingresso del virus e della penetrazione nella cellula, perciò la loro struttura deve facilitare questo processo.

Tramite la microscopia confocale si è visto che la particella virale ha simmetria icosaedrica.

Lo strato esterno del capsido è composto di 180 molecole di VP2 e 360 molecole di VP5. Le 180 molecole di VP2 formano 60 strutture trimeriche appuntite mentre le 360 molecole di VP5 sono arrangiate in 120 strutture globulari e sono localizzate più internamente rispetto alle molecole della VP2. Le punte della VP2 si estendono 3 nm al di sopra del corpo principale del virione e sono responsabili dell'attacco del virus alla superficie cellulare e dell'endocitosi del virione mediata dal recettore (6, 7, Figura 1). Una volta inglobato nell'endosoma il virione si sveste della VP2.

L'ingresso del core nel citoplasma richiede il pH acido dell'endosoma che permette alla proteina globulare VP5 di permeabilizzare la membrana endosomale attraverso il suo peptide ammino-terminale formante il poro, che è in sostanza analogo al peptide di fusione dei virus provvisti di envelope. In sostanza, il cambiamento conformazionale della VP5 dovuto al basso pH endosomale promuove la destabilizzazione della membrana e indebolisce il contatto tra la VP5 e il sottostante strato più esterno del core (7, 8, 9, figura 2).

Ciò permette alle particelle del core di essere rilasciate nel citoplasma e iniziare la replicazione del genoma (10, 11). Come abbiamo già visto, il core è un complesso multi-

enzimatico composto da due proteine maggiori (VP7 e VP3) e tre proteine minori enzimaticamente attive, con l'aggiunta dei dieci segmenti di dsRNA (13, 14, 15, 16).

Il core di BTV ha una struttura molto robusta e può essere generato *in vitro* da particelle virali purificate tramite trattamento con proteasi. Questo ha facilitato l'analisi tridimensionale della struttura proteica del core che ha rivelato che essa è costituita da 260 trimeri di VP7 (31, 32, 33) attaccati ad un più interno, sottile, involucro proteico, formato da 120 molecole di VP3 arrangiate in 12 decameri. L'architettura della struttura è confermata da quella di altri membri della famiglia, e ciò sottolinea la sua importanza nell'assemblaggio del capsido di questi virus (34).

Il genoma del BTV rimane dentro il core e solo gli mRNA sintetizzati *ex novo* vengono rilasciati dal core parentale e sono utilizzati come template sul quale sarà formato l'RNA genomico a doppio filamento e a partire dal quale verranno tradotte le proteine virali.

È importante dire che oltre a essere trascrizionalmente attivo il core generato *in vitro* tramite trattamento proteolitico di BTV purificato mantiene anche potere infettante per l'insetto vettore e linee cellulari da esso derivate, indicando che esso può anche mediare l'attacco alle cellule e la penetrazione del virus (12).

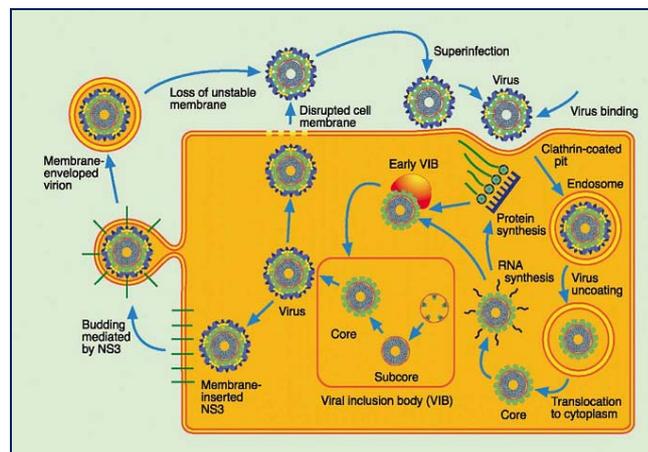


Figura 2: Diagramma schematico che rappresenta il ciclo di replicazione del BTV (1).

La trascrizione avviene quindi dentro il core virale integro, dove gli enzimi virali trascrivono i dieci segmenti del genoma producendo copie di mRNA multiple non poliadenilate di ogni segmento. Gli mRNA, incappucciati e metilati, vengono in seguito tradotti in proteine virali nel citoplasma delle cellule infette.

Le proteine neoformate in seguito interagiscono con mRNA virale sequestrato nei corpi inclusi citoplasmatici per formare particelle provirali.

Queste particelle provirali si pensa siano i siti per la sintesi del dsRNA e per l'ulteriore produzione di mRNA precedente all'eventuale formazione di particelle virali complete e all'estrusione e al rilascio dalle cellule infette (17, 18).

I corpi inclusi consistono prevalentemente della NS2 che è sintetizzata abbondantemente ed è responsabile del reclutamento delle proteine del core e dei trascritti di nuova sintesi (19, 20, 21, 22).

Sebbene l'esatto meccanismo dell'incapsidamento virale non è noto, attualmente si pensa che i corpi inclusi siano la sede di incapsidazione del genoma e di assemblaggio del core.

Tuttavia le proteine del capsido esterno non sono reclutate dall'NS2 e l'assemblaggio del capsido esterno sul core non sembra avvenire all'interno dei corpi inclusi citoplasmatici.

### ***1.3 Caratteristiche fisico-chimiche del virus.***

BTV è un virus termostabile, che resiste all'essiccamento e si mantiene infettante per 3 anni a pH 7,0 e a 22° C. Nel siero o nel sangue defibrinato può sopravvivere fino a 25 anni ed 1 anno in una miscela di ossalato-fenolo-glicerina a temperatura ambiente. E' infettante per un mese a 5°C; tale infettività diminuisce del 50% se lo si tiene per lo stesso tempo a 22-25°C o se lo si congela lentamente tra -10 e -20°C. Dopo un anno di permanenza a temperature comprese tra -27 e -70°C si riduce del 50% e del 75% dopo 3 anni alle medesime temperature. E' stabile a pH compreso tra 6,0 e 10,0 mentre viene rapidamente inattivato a pH inferiore a 6,0 ed a 4°C. Questo è importante per la persistenza del virus nelle carni degli animali infetti in quanto esso si mantiene infettante fino a 30 giorni a 4°C se il pH non scende al di sotto di 6,0. E' resistente all'etere e al sodio desossicolato, mentre viene inattivato dalla formalina al 3%, da basse concentrazioni di tripsina e dall'alcool a 70° (5).

### ***1.4 Spettro d'ospite.***

Il virus della bluetongue ha una patogenicità variabile, sono recettivi tutti i ruminanti, ma l'infezione si manifesta in forma particolarmente grave negli ovini (soprattutto nelle razze europee, mentre le africane e asiatiche risultano più resistenti).

Bovini, caprini e bufalini non mostrano solitamente sintomatologia apprezzabile ma i bovini rappresentano un importante serbatoio virale dal momento che il virus ha la capacità di rimanere nel loro sangue (fase viremica) a lungo (anche fino a 60 giorni).

Solipedi, cani, gatti, furetti e altri animali di laboratorio, quali coniglio e cavia, non risultano recettivi. In un solo caso è stata segnalata l'infezione naturale in animali non ruminanti, e di preciso in roditori della specie *Rhabdomys pumilo* e *Otomys muratus*.

E' possibile infettare sperimentalmente topini e criceti neonati e topini adulti con virus passato precedentemente su uova embrionate (5).

## 1.5 Il vettore.

Il vettore naturale del virus della Bluetongue (BTV) è un Dittero appartenente alla famiglia dei *Ceratopogonidae*, genere *Culicoides*.

Nel 1944 Du Toit dimostrò che il virus viene trasmesso da *Culicoides imicola*, vettore principale della malattia in Africa australe, Asia e oggi anche in Europa, mentre il *C.varipennis* e il *C.sonorensis* lo sono in Nord America e il *C.insignis* e il *C.fulvus* in Australia.

Il *Culicoides imicola* è un moscerino simile alle zanzare che come queste punge gli animali per nutrirsi. L'adulto misura circa 2mm e ha le ali macchiettate (36, Figura 3).



Figura 3: Esemplare di *Culicoides*

Le femmine adulte si cibano di sangue e solitamente hanno attività crepuscolare. Si infettano ingerendo sangue di animali infetti e viremici. Il virus replica nelle ghiandole salivari del moscerino, che rimane infetto per tutto il resto della vita (solitamente 10-20 giorni, ma in casi eccezionali anche 90 giorni), ma non è in grado di trasmettere il virus verticalmente alla progenie. Il ciclo biologico dei Culicoidi è costituito da 4 stadi larvali ed uno pupale. La maggior parte delle femmine predilige ambienti umidi per deporre le uova e in queste zone le larve possono svilupparsi e, attraverso quattro stadi, divenire pupe e poi

immagini. Non sempre il moscerino dopo aver attaccato l'animale viremico si infetta; infatti il virus deve riuscire a superare le barriere difensive dell'insetto e replicare nelle ghiandole salivari per poter essere trasmesso (36, 37).

La presenza maggiore della malattia si rileva alla fine della stagione estiva, per poi scomparire con il sopraggiungere dei primi freddi, quando la temperatura delle ore crepuscolari scende al di sotto dei 12° C. Infatti nelle regioni tropicali questi insetti rimangono attivi per anni mentre nelle regioni a clima temperato lo sono soltanto durante la stagione estiva e in autunno per poi cessare la diffusione del virus con i primi freddi (38).

Delle oltre 1200 specie di *Culicoides* conosciute, meno del 3% è in qualche modo correlato alla trasmissione del virus. In sintesi, le specie di Culicoidi coinvolte nella trasmissione del BTV hanno una differente distribuzione geografica, tra queste si riportano di seguito le più importanti:

*C. imicola* (Africa, Cipro, Italia, Spagna, Portogallo, Grecia, Asia).

*C. pulicaris* (Balcani).

*C. obsoletus* (Nord America, Cipro, Nord Europa).

*C. milnei* (Africa, Asia).

*C. variipennis* (Nord America).

*C. fulvus* (Australia).

*C. actoni* (Australia).

## 1.6 Epidemiologia.

In base ai caratteri epidemiologici della malattia è possibile distinguere quattro zone da essa colpite .

- 1) Endemica: dove l'infezione è presente tutto l'anno con picchi dovuti alla maggiore attività dei *Culicoides*. Corrisponde alle zone tropicali e subtropicali.
- 2) Epidemica: dove l'infezione compare quasi ogni anno, e presenta una diffusione correlata alla dinamica dei venti.
- 3) Incursiva: dove l'infezione compare sporadicamente per azione dei venti, ma si esaurisce con i primi freddi stagionali.
- 4) Indenne: corrispondente alle latitudini estreme (Canada, Russia, Europa settentrionale), dove le condizioni climatiche non consentono l'attività degli artropodi vettori (Figura 4).

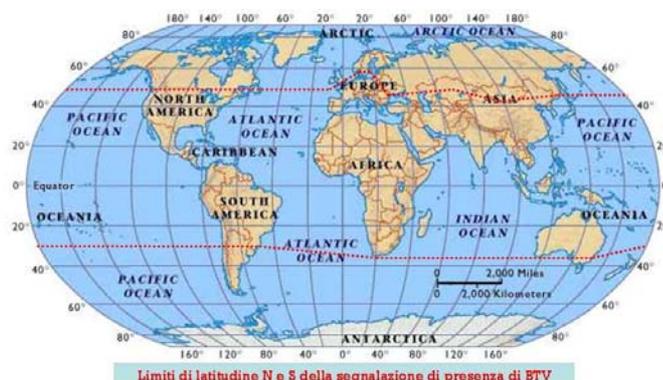


Figura 4

La malattia fu descritta per la prima volta in pecore merino importate in Sud Africa nel diciannovesimo secolo. Nel 1902 la malattia era conosciuta come “ *malarial catarrhal fever of sheep*” e solo nel 1905 fu chiamata “bluetongue”. All’inizio del ventesimo secolo si diffuse in Africa tramite razze di pecore non indigene altamente suscettibili alla malattia (39). L’infezione fu poi segnalata come malattia enzootica tra le latitudini del 40° parallelo sud e del 53° parallelo nord in quasi tutti i continenti. Prima del 1998, brevi episodi occasionali di

BTV avvennero in sud Europa (Spagna, Portogallo, Grecia e Cipro, 40), tuttavia dal 1998 almeno otto ceppi distinti di BTV appartenenti a sei differenti sierotipi hanno invaso l'Europa (tipo 1, 2, 4, 8, 9, 16). BTV 8 è stato segnalato recentemente in molti paesi del Nord Europa (41, 42).

Durante l'agosto del 2006, il sierotipo otto fu segnalato nei Paesi Bassi, per poi passare alla Germania, Belgio e nord-est della Francia, generando un totale di 2.297 casi di BTV nel nord Europa durante tutto il 2006. Dopo la stagione invernale l'infezione mostrò una forte recrudescenza e si estese drammaticamente in Europa nel 2007 arrivando a 40.931 casi totali.

In Francia l'epidemia del sierotipo otto colpì sessanta comuni su 95, con 15.253 casi solo nel sud del paese. Essa poi riapparve nel 2007 in Belgio (6.661 casi), Germania (11.487 casi), nei Paesi Bassi (5.798 casi), Lussemburgo (1.315 casi), Danimarca (1 caso), Svizzera (5 casi), Repubblica ceca (1 caso) e Regno Unito (65 casi). Durante il 2007, un numero significativo di animali colpiti dal sierotipo otto furono importati in Italia. Nel gennaio 2008 gli animali infetti furono importati in Spagna, il virus entrò nell'Irlanda del Nord, attraverso l'importazione di animali infetti da fattorie Europee ma esso venne prontamente eliminato mediante la macellazione degli animali infetti e di quelli entrati in contatto con loro. Nel 2006 il sierotipo 1 fu segnalato in Nord Africa e in Sardegna e, nel 2007 fu segnalato in Spagna, in Francia e nei Paesi Bassi. L'evoluzione del virus in Europa è importante soprattutto considerando la velocità e l'estensione con la quale diffonde che può favorire l'insorgere di nuove varianti tramite il riassortimento (42). Il cambio della distribuzione del vettore in sud Europa (*Culicoides imicola*) dovuto a cambiamenti climatici può spiegare in parte l'estensione del virus in nuove aree geografiche, così come in Corsica dove arrivò il sierotipo 2 (41, 42). Tuttavia, *C. imicola* non è stato trovato in Nord Europa dove BTV-8 era trasmesso molto efficacemente, e neppure nelle aree dei Balcani dove arrivò il BTV-9. Nuovi vettori,

appartenenti al *C. obsoletus* e al *C. pulicaris* sono coinvolti nella trasmissione di BTV in tali aree (43).

La recente identificazione di otto nuovi sierotipi negli USA suggerisce fortemente che il cambiamento nella distribuzione del BTV, che inizialmente ha colpito l'Europa, può essere un fenomeno mondiale forse come conseguenza dei cambiamenti climatici (44, 35).

## ***1.7 Patogenesi.***

La patogenesi della bluetongue è simile in pecore e bovini così come, probabilmente, in tutte le specie di ruminanti. Sono evidenziabili tuttavia differenze nella severità della malattia che colpisce le differenti specie di ruminanti, essendo i bovini particolarmente resistenti all'espressione della malattia. Dopo che il virus penetra nella cute tramite il morso del vettore infetto, viene trasferito ai linfonodi regionali dove avviene la replicazione iniziale (45). Esso è poi disseminato nei tessuti linfatici (dove ha come bersaglio monociti e linfociti) e nei polmoni. Alla replicazione in questi distretti segue una fase di viremia cellulosa associata caratterizzata dalla presenza del virus in monociti, linfociti, globuli rossi e piastrine. Il virus negli eritrociti si localizza in invaginazioni della membrana dove risulta protetto dagli anticorpi neutralizzanti. La localizzazione del virus negli elementi mononucleati è importante ai fini della distribuzione dello stesso nell'organismo, mentre quella negli eritrociti lo è per l'infezione dei vettori.

La durata della viremia dipende dalla specie animale. È stato riportato che essa può durare per 14-31 giorni nelle pecore e fino a 100 giorni nei bovini. Nelle capre sono state riportate viremie di 19-21 giorni (46).

La replicazione del BTV nelle cellule endoteliali e periendoeliali e nei periciti dei capillari, delle arteriole e delle venule provoca degenerazione vacuolare delle cellule colpite, ipertrofia nucleare e citoplasmatica, picnosi e carioressi. Alla necrosi seguono processi di rigenerazione che portano a ipertrofia e iperplasia delle pareti vasali e occlusione del lume che porta a stasi ematica, essudazione, ipossia. Costante sembra essere uno stato di panleucopenia, alla quale seguono la febbre e la fase viremica. Solo nel bovino i casi di malattia sono messi in relazione a una reazione di ipersensibilità mediata dalle IgE, che aumentano poco prima della comparsa dei sintomi con liberazione di sostanze vasoattive.

L'infezione durante la gravidanza comporta una serie di conseguenze sul prodotto del concepimento variabili a seconda della fase di gestazione.

Dopo 30-60 giorni il feto va incontro a malformazioni scheletriche degli arti, del capo e del rachide. Dal 60° al 90° si può andare incontro ad aborto e lesioni neurologiche. Queste ultime non si osservano in caso di infezione prima del 30° e dopo il 90° giorno di gestazione.

Nei ruminanti infetti, oltre all'azione dell'interferone si instaura una risposta sia umorale sia cellulo-mediata.

Linfocitosi si osserva dal 14° giorno dopo l'infezione mentre gli anticorpi neutralizzanti diretti contro la VP2, sono rilevabili a partire da 1-4 settimane dopo l'esposizione al virus e conferiscono più che altro protezione omologa (5).

## ***1.8 Sintomatologia.***

Il periodo di incubazione della malattia va dai 4 ai 14 giorni, con una media di 7 giorni. Le manifestazioni cliniche, più o meno gravi, sono dettate dal sierotipo virale e dalla razza coinvolta nell'infezione. In quelle importate, in particolare le merinos, appare più grave mentre in alcune razze africane autoctone l'infezione può risultare inapparente. Inoltre bisogna sottolineare il ruolo importante della fotosensibilizzazione nel determinare la gravità dei sintomi; infatti, quando le pecore sono tenute al riparo dalle radiazioni solari, le alterazioni congestizie sono meno evidenti. La letalità varia tra l'1 e il 30%.

Il primo sintomo che si manifesta è l'ipertermia che dura più o meno una settimana, accompagnata da tachipnea, inappetenza e depressione. A questi sintomi segue l'edema che può colpire diverse regioni del corpo, come quella orale, oculare e, talvolta, auricolare. L'edema può essere accompagnato da iperemia (Figure 5, 6, 7).



Figura 5



Figura 6



Figura 7

La lingua spesso appare edematosa e cianotica, fuoriuscendo dalla bocca. Se l'edema non è particolarmente grave solo la punta della lingua è arrotondata. Ci possono essere emorragie papillari su tutta la superficie della lingua ed in particolare su quella ventrale. A volte questi sintomi non sono visibili ad occhio nudo e solo il taglio dell'organo li rende evidenti (Figura 8).



(Figura 8).

L'edema può estendersi anche alle regioni mandibolare e sottomandibolare portando talvolta a difficoltà respiratoria (Figure 9, 10, 11).



Figura 9



Figura 10



Figura 11

Altri sintomi sono l'edema e l'iperemia delle palpebre, le emorragie a livello del musello (Figure 12, 13) e la cianosi della mucosa orale che di solito sono caratteristici delle infezioni di ceppi ad alta virulenza.



Figura 12



Figura 13

Sul margine linguale e sulla mucosa delle gengive, a livello degli incisivi e dei molari, sono visibili erosioni con accumulo di materiale necrotico; la saliva si presenta schiumosa (Figure 14, 15).



Figura 14



Figura 15

Queste lesioni tendono a guarire con rapidità, in circa 5 giorni dalla remissione della sintomatologia. Lo scolo nasale, passa dall'essere sieromucoso a mucopurulento e intorno alle narici si formano croste che, se rimosse, evidenziano una superficie erosa (Figure 16, 17, 18).



Figura 16



Figura 17



Figura 18

A livello del cercine coronario si osservano striature emorragiche o, più raramente, emorragie importanti (Figure 19, 20, 21).



Figura 19



Figura 20



Figura 21

Sono frequenti le lesioni podali specialmente agli arti posteriori; l'animale ha difficoltà nella deambulazione e cerca di camminare sulle ginocchia. La coronite, in casi particolarmente gravi, può portare alla rottura dello zoccolo. Le emorragie rimangono visibili per 2 o 3 settimane.

L'iperemia cutanea (Figura 22, 23) è particolarmente manifesta negli animali che vivono all'aperto; se la regione inguinale viene anche leggermente strofinata o se l'animale "siede" sul posteriore si possono verificare emorragie, così come durante l'esame degli arti anteriori.



Figura 22



Figura 23

Le alterazioni a livello cutaneo sono molto importanti per le razze ovine produttrici di lana; infatti quella che cresce nel periodo in cui l'animale è malato è di qualità scadente, tanto che l'animale può arrivare a perdere l'intero vello (38).

Oltre che in forma acuta la BT può presentarsi in forma subacuta e lieve.

La forma subacuta presenta una sintomatologia attenuata con dimagrimento, debolezza, torcicollo e un lunghissimo periodo di convalescenza. Le forme lievi mostrano solo una lieve ipertermia (5). Gli animali che sopravvivono agli episodi acuti dell'infezione

possono sviluppare dermatiti croniche e lesioni vescicolari ed erosive sulle superfici interdigitali e mucosali (35). Nei bovini e nei caprini l'infezione è quasi sempre asintomatica. Raramente si possono osservare febbre, lieve scialorrea, edema delle labbra, disepitelizzazione delle labbra e del musello, erosioni sulla mucosa orale, ulcere sul palato, scolo nasale sieroemorragico o mucopurulento e talvolta ulcerazioni sui capezzoli delle vacche da latte. Si può avere respirazione accelerata con rari colpi di tosse. Si osservano inoltre rigidità degli arti con zoppia ed ablazione degli unghiaie (5).

Nelle forme più gravi ci può essere un eczema cutaneo con desquamazione, aborto o lesioni di vario tipo nel vitello appena nato.

Il sierotipo otto che ha invaso il Nord Europa è per esempio caratterizzato da un numero elevato di bovini con sintomatologia clinica (35).

## ***1.9 Lesioni anatomo-patologiche.***

Il quadro anatomico varia in funzione del momento nel quale si verifica la morte e della gravità della malattia.

Nell'apparato digerente sono evidenziabili emorragie sulla mucosa dell'omaso, all'apice delle papille del ruminale e ovunque vi sia attività muscolare (Fig 24, 25).



Figura 24



Figura 25

Sono inoltre riscontrabili iperemia, edema e cianosi della mucosa del cavo orale e emorragie sulla mucosa esofagea. L'edema descritto nella regione orale e mandibolare si può estendere allo sterno. I polmoni sono congesti, negli alveoli e nell'intero albero bronchiale è presente liquido schiumoso. Nelle forme a decorso più lento sui lobi polmonari si osservano petecchie emorragiche.

Le emorragie alla base delle arterie polmonari per molti ricercatori sono da considerarsi patognomoniche dal momento che sono evidenziabili più o meno nel 95% di casi di BTV (Fig 26).



Figura 26

Sono inoltre presenti idrotorace, idropericardio e emorragie sub-epicardiche. I linfonodi e la milza appaiono ingrossati. Nelle aree cutanee glabre si osserva iperemia marcata che coinvolge anche i capillari. Qualora la malattia si protragga oltre le due settimane si osserva una massiva degenerazione della muscolatura scheletrica, i fasci muscolari appaiono depigmentati e le fasce intermuscolari contengono un essudato chiaro che può assumere consistenza gelatinosa. L'esame istologico non evidenzia alcuna lesione da ritenere patognomonica.

## ***1.10. Immunità.***

### ***Risposta cellulare al BTV.***

La malattia virale emorragica non è solo la conseguenza del danno virale diretto contro le cellule ma anche il risultato di intensi e talvolta sregolati processi infiammatori. Il BTV riduce in vitro la resistenza endoteliale elettrica associata ai riarrangiamenti del citoscheletro mediati dalla chinasi MAP p38 (47) e in aggiunta l'infezione porta alla morte di molti tipi cellulari ed ad un'importante risposta infiammatoria (34).

Nelle cellule di mammifero, il virus induce apoptosi e/o necrosi nelle cellule endoteliali microvascolari ovine e bovine, nei monociti e nelle cellule T  $\gamma\delta$  WC1 attivate (48). Lo svestimento virale, ma non la sua replicazione, è richiesto per indurre apoptosi (49). Esperimenti in vitro hanno dimostrato che mettere a contatto cellule di mammifero con una miscela di VP2 e VP5, e osservare la penetrazione di VP5 nella cellula, sono due eventi sufficienti a indurre apoptosi, coinvolgendo l'attivazione del NF-kB. Tuttavia, alcuni tipi cellulari che supportano la replicazione virale non dimostrano un effetto citopatico per BTV, come ad esempio le cellule d'insetto, linee delle cellule T  $\gamma\delta$  e i linfociti del sangue attivati. I due meccanismi di rilascio del virus dalla cellula ( budding e rilascio mediato da viroporina) potrebbero spiegare parzialmente questa differenza (35, 48, 49, 50, 27).

### ***Induzione di citochine e prostanoidei.***

L'infezione di cellule endoteliali microvascolari bovine e ovine induce la trascrizione di interleuchina (IL) -1, IL-8, IL-6, ciclossigenasi 2 e la sintesi di ossido nitrico inducibile. Questi mediatori sono coinvolti nella patogenesi di diverse febbri emorragiche virali. L'infezione induce inoltre un incremento plasmatico di prostaciclina e trombassano. Il

trombossano è un forte fattore procoagulante, mentre la prostaciclina è un potente vasodilatatore e inibitore di aggregazione piastrinica. Nei bovini c'è una quantità nettamente inferiore di queste due sostanze e ciò può spiegare la minore sensibilità dei bovini all'induzione di danni microvascolari e trombosi mediate dal virus (51). Il virus è anche un forte induttore di interferone di tipo 1 in vivo sia in ovini e bovini che in topi (52, 53). Un ceppo del sierotipo otto del virus si è dimostrato essere un ottimo induttore nei topi anche quando irradiato con UV (54). Molti ceppi di molti sierotipi del virus sono risultati induttori di interferone ma la loro capacità dipende dal contesto cellulare (55). In vitro una grande varietà di tipi cellulari inducono questa produzione, incluse le cellule embrionali di topo, i leucociti umani e leucociti di pecore adulte (56, 57, 58). Tuttavia le esatte componenti virali coinvolte in questo processo non sono conosciute (35).

### ***Risposta immunitaria contro il virus.***

Il trasferimento di anticorpi e cellule T in pecore monozigotiche ha rivelato che sia l'immunità umorale che cellulare proteggono la pecore contro l'infezione da BTV e dalla malattia (59, 60).

### ***Immunità umorale contro BTV.***

Studi di trasferimento passivo di siero hanno mostrato che anticorpi specifici per il BTV possono conferire protezione verso un sierotipo specifico, suggerendo un ruolo in vivo per la neutralizzazione virale mediata da anticorpi. Tuttavia non è noto come gli anticorpi interferiscano con il virus. La VP2 e la VP5 sono le sole proteine del virus che inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti, essendo la VP2 la maggiore proteina coinvolta nella sierotipo- specificità (59, 70, 61, 62, 66).

Pecore inoculate con la proteina producono anticorpi e sono resistenti a infezioni con il sierotipo omologo (64, 61). Due domini idrofilici nella VP2, AA199-213 (regione 1) e AA 321-346 (regione 2), contengono epitopi conformazionali neutralizzanti (65). La co-espressione della VP2 e della VP5, anche in combinazione con le proteine del core per formare virus-like particles (VLP) a doppio strato, aumenta la risposta anticorpale di pecore inoculate se paragonate a quelle inoculate con solo la VP2 (66, 61, 67, 68). La VP5 aumenta la neutralizzazione sia attraverso l'influenza sulla VP2, dipendente dalla sua conformazione (69, 63), sia grazie al fatto che direttamente induce la produzione anticorpale, sebbene anticorpi monoclonali per la VP5 non sono stati descritti (66).

Generalmente gli anticorpi proteggono solo verso i virus omologhi, sebbene infezioni seriali di pecore infettate da due diversi sierotipi possano proteggere contro l'infezione di un terzo sierotipo (70). La protezione tra diversi sierotipi è associata più che altro alla somiglianza nella sequenza della VP2 (71). La strategia vaccinale potrebbe beneficiare dell'inclusione delle proteine VP2 e VP5 insieme.

### ***Immunità cellulare contro BTV.***

Il livello di anticorpi neutralizzanti non è sempre correlato con il grado di protezione dopo vaccinazione con vaccino vivo (59) e qualche vaccino inattivato può conferire protezione in assenza di livelli apprezzabili di anticorpi neutralizzanti (72). Inoltre, il trasferimento adottivo di linfociti T citotossici (CTL) a pecore monozigotiche ha mostrato di conferire una parziale protezione (59, 60), indicando che essi partecipano a questo meccanismo.

### ***Risposta cellulare dei linfociti T in topi e pecore.***

Nei topi, l'analisi statistica dei CTL indica che peptidi proteici non strutturali inducono maggiormente la produzione di CTL omotipici ed eterotipici, seguiti dalle proteine minori del core VP3 e VP7 e dalle proteine esterne del capsido VP2 e VP5 (73).

Le VP2 e VP5 che variano considerevolmente tra i vari sierotipi non sono riconosciute da CTL eterotipici (73). Inoltre, baculovirus esprimenti la NS2, la NS1, la NS3, VP1, VP4 e VP6, inducono la risposta citotossica in topi, ed essa è parzialmente protettiva contro virus vaccinali che esprimono proteina omologa solo nel caso della NS2 (74).

In pecore è stata descritta cross-reattività citotossica specifica per il BTV(60) e linee di linfociti citotossici mostrano di inibire la replicazione virale in fibroblasti di cute infettati con sierotipi vaccinali omologhi ed eterologhi (75). I virus vaccinali ricombinanti esprimenti antigeni di BTV dimostrano che la VP2 e la NS1 sono i maggiori CTL immunogeni e che i CTL NS1 specifici, ma non quelli specifici per VP2, sono cross-reattivi (76). Per di più, la NS1 era riconosciuta dai CTL di tutte le pecore merinos immunizzate con virus vaccinali ricombinanti, mentre le VP2, VP3, VP5 e VP7 erano riconosciute solo da quelli di alcune pecore (77).

Le altre proteine non appaiono contenere epitopi CTL, anche se NS2 induce CTL in topi (74).

### ***Risposta cellulare T helper.***

I maggiori determinanti helper sierotipo-specifici sono presenti nella VP2 e qualcuno nella VP5, mentre i maggiori determinanti cross-reattivi sono localizzati entro le proteine strutturali del core (78). In esperimenti nei quali le pecore vennero vaccinate con un capripox virus che codifica per la VP7, si era ottenuta protezione clinica contro infezioni eterotipiche, sebbene il virus replicasse ancora (79). Gli effettori immunitari coinvolti nella protezione indotta dalla VP7 furono probabilmente cellule T CD4.

D'altra parte la VP7 è immunodominante durante la produzione di anticorpi, ma gli anticorpi non sono neutralizzanti e probabilmente neanche protettivi.

## ***1.11 Diagnosi.***

Per la diagnosi clinica assume significato fondamentale la comparsa, negli ovini più che nei bovini, dei sintomi caratteristici dell'affezione (ad alta morbilità e a mortalità variabile), caratterizzata da sintomi respiratori ed enterici, presenza di aborti o nascita di agnelli e vitelli malformati. In caso di animali in fase di guarigione o che mostrano una sintomatologia lieve la diagnosi è assai più complicata. È necessario inoltre fare una diagnosi differenziale con le patologie che dal punto di vista sintomatologico sono accomunate al BTV.

Per l'ovino:

ectima contagioso, afta epizootica, vaiolo, peste dei piccoli ruminanti, fotosensibilizzazione, oestrus ovis, stomatite micotica, polmonite, pedaina, avvelenamenti da piante, eczemi facciali, cenurosi, salmonellosi, emoncosi acuta con depressione ed edema sottomandibolare, malattia di akabane, poliartriti, laminiti, ascessi ed altre affezioni del piede, EHDV.

Per il bovino:

afta epizootica, peste bovina, BVD/MD, IBR, febbre catarrale maligna.

## ***Diagnosi di laboratorio.***

Il virus può essere isolato da campioni di sangue, tessuti di animali infetti venuti a morte, feti e seme di maschi durante il picco di viremia.

### ***Campioni di sangue.***

Il BTV appare strettamente associato ai globuli rossi rispetto agli altri componenti ematici. Le particelle virali possono essere evidenziate all'interno di invaginazioni della

membrana citoplasmatica di queste cellule; l'associazione del virus con gli eritrociti inizia quasi subito dopo l'infezione e persiste per tutta la fase viremica (80, 81). Una volta nei globuli rossi, le particelle virali sono protette dagli anticorpi fino alla naturale degradazione di queste cellule; i globuli rossi di bovino hanno una vita media più lunga di quella delle pecore, ecco perché la viremia in questi animali dura più a lungo (82). Il sangue, in quantità di 20, 30 ml va prelevato in presenza di EDTA o eparina e inviato al laboratorio refrigerato a una temperatura tra i 4 e i 10° C oppure conservato in ossalato-fenolo-glicerina (OPG) se la refrigerazione non è possibile. È importante evitare il congelamento dal momento che la lisi della componente cellulare libererebbe il virus a essa associato, con conseguente neutralizzazione da parte degli anticorpi che potrebbero essere già presenti nel siero. Le cellule ematiche, separate e lavate per centrifugazione, vengono, prima dell'inoculazione, lisate mediante sonicazione o aggiunta di acqua distillata per liberare il virus contenuto all'interno e nelle invaginazioni della membrana plasmatica.

Per lo stoccaggio l'ideale è il dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e la conservazione a -70° C dal momento che il virus non è stabile a lungo a -20° C (83).

### ***Campioni di seme.***

La trasmissione del virus attraverso il seme è stata documentata nella pecora ed è molto importante per l'inseminazione artificiale. In un maschio viremico, attraverso le lesioni endoteliali, componenti ematiche infettanti possono riversarsi nel seme e condurre all'infezione. D'altra parte le condizioni di conservazioni del seme dopo il prelievo permettono al virus di rimanere vitale e rappresentare una fonte di contagio nel bestiame. Anche il seme può essere utilizzato per l'isolamento virale e, per evitare la citotossicità, viene risospeso in PBS prima dell'inoculazione in uova embrionate o in colture cellulari (82).

### ***Campioni di tessuto.***

Per gli animali venuti a morte, i prelievi riguardano in particolare la milza, i linfonodi meseraici, il fegato, i polmoni, il cervello e il midollo osseo. Il virus può essere isolato da lesioni delle mucose del tratto digerente e respiratorio e dai sistemi vascolare, scheletrico o reticoloendoteliale in caso di infezione acuta nelle pecore. Anche campioni biotici di animali vivi come la mucosa buccale, labiale o la pelle possono essere fonte di isolamento del virus .

Il midollo rosso (femore) di pecore adulte, il cervello di feti ovini e la milza e il fegato di agnelli neonati sono i migliori tessuti dai quali si possa isolare il virus. I campioni devono essere raccolti in sterilità, conservati e trasportati a 4°C in laboratorio dove si tratteranno con PBS per ottenere sospensioni al 10%. Ai surnatanti di tali sospensioni verranno aggiunti antibiotici per utilizzarli per l'inoculazione (84).

## ***Tecniche di isolamento virale.***

### ***Inoculazione in uova embrionale.***

0, 1 ml di inoculo virale è iniettato in uova embrionate di pollo di circa 10 giorni (embryonated chicken eggs, ECE), in seguito incubate a 33, 5°C per sette giorni (figura 27, 84). Gli embrioni iniziano a morire già dopo 24 ore, ma abitualmente tra il terzo e il sesto giorno, e presentano un caratteristico color ciliegia dovuto ad emorragie ed edema (figura 28).

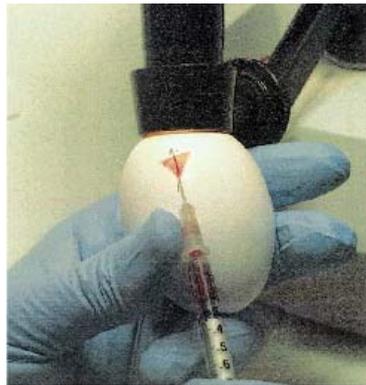


Figura 27



Figura 28

Quelli morti già dopo 24 ore vengono buttati e quelli ancora vivi dopo sette giorni vengono soppressi e comunque analizzati dal momento che non sono per forza indicativi di campione negativo. Le uova sono disinfettate con etanolo al 70% e l'embrione è rimosso dal guscio con strumenti sterili. L'intero embrione è depositato in una piastra di petri e vengono quindi prelevati i tessuti di interesse ( cervello, fegato, milza, cuore e polmoni) poi conservati a 4° C. I tessuti sono quindi risospesi in una sospensione al 10% e centrifugati. Le sospensioni sono usate per l'isolamento del virus su colture cellulari dal momento che la morte embrionale non è indicativa dell'isolamento virale.

Il virus nel surnatante dell'omogenato può essere identificato anche senza passaggio in colture cellulari mediante un metodo di capture ELISA che ha mostrato il 100% di sensibilità senza falsi positivi o negativi e che riduce di parecchio i tempi di lavoro per l'isolamento (85, 86). L'identificazione può essere effettuata direttamente anche mediante RT-PCR o indirettamente mediante immunofluorescenza o immunoperossidasi che è uno strumento di valutazione molto vantaggioso con il quale anticorpi monoclonali del virus permettono la localizzazione di antigeni specifici all'interno delle cellule infettate (84). Anche l'ibridazione in situ su tessuti di uova embrionate permette l'isolamento dell'RNA virale da cervello, rene e dal midollo spinale già dopo 24 ore, dopo 48 da cuore e polmoni. Il fegato è coinvolto dall'infezione al terzo giorno (87).

### ***Inoculazione in colture cellulari.***

Le linee cellulari maggiormente utilizzate per l'infezione e la coltivazione del virus sono le BHK-21 (baby hamster kidney), le cellule della linea VERO (african green monkey kidney) e le cellule d'insetto C6-36 (derivano da *Aedes* spp). Anche una linea cellulare endoteliale di arteria polmonare di vitello (CPAE) permette la replicazione del virus (88, 89). Generalmente l'infezione con ceppi di campo delle colture cellulari è preceduta da quella in uova embrionate (82).

Le colture cellulari mantenute a 37°C in atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% vengono infettate con l'inoculo e la visualizzazione dell'infezione in atto è caratterizzata da effetto citopatico e conseguente citolisi. L'effetto citopatico è caratterizzato dalla comparsa di foci di cellule rotondeggianti e rinfrangenti sul monostrato cellulare. Questi foci rapidamente si allargano fino al punto di rompersi staccandosi dal monostrato cellulare e fluttuando liberamente nel medium di coltura. Il processo coinvolge tutto il monostrato entro 2-3 giorni. Dal punto di vista microscopico le culture infette presentano cellule con citoplasma granulare, picnosi del nucleo, frammentazione e disintegrazione della struttura cellulare. L'esame al microscopio

elettronico rivela già dopo 4 ore dall'infezione la presenza di corpi inclusi virali. Queste inclusioni hanno caratteristiche sia fibrillari che granulari e sono presenti sia all'interno delle cellule che in posizione iuxtannucleare. Il core virale e le virus-like particles sono trovate entro la matrice delle inclusioni e alla periferia, rispettivamente. Strutture specifiche del BTV si rilevano nelle cellule infettate e sono rappresentate da tubuli costituiti principalmente da NS1 (82).

### ***Inoculazione di animali.***

La pecora è ancora considerata l'indicatore più sensibile del virus. L'inoculo può avvenire per via venosa (l'animale può tollerare l'iniezione di grandi quantità di inoculo) o sottocutanea. Il materiale inoculato è costituito o da un pool di diversi lisati di sangue oppure estratti d'organo in sospensione o omogenati d'insetto. Dopo 5-8 giorni dall'inoculazione il virus può essere già recuperato da sangue. Anche topini da 2-4 giorni possono essere inoculati intracerebralmente e mostrare letargia, atassia, prostrazione, coma e morte entro 2-5 giorni dall'inoculazione.

## ***Tecniche di identificazione della Bluetongue.***

Gli Orbivirus isolati sono tipicamente classificati in sierogruppi sulla base della loro reattività con specifici antisieri standard che riconoscono proteine, come la VP7, che sono conservate in ogni sierogruppo. La cross- reattività tra membri dei sierogruppi BT e EHD ha sollevato la possibilità che un isolato di EHDV possa essere confuso con BTV sulla base di una debole reazione di immunofluorescenza con antisieri policlonali contro BTV. Per ovviare a ciò può essere usato un anticorpo monoclonale sierogruppo-specifico per BT. I metodi comunemente usati per l'identificazione dei virus a livello di **sierogruppo** sono i seguenti:

**Immunofluorescenza (IF):** Vengono infettati monostrati di cellule VERO o BHK21 e dopo 24 –48 ore a 37° C o dopo la comparsa di blando effetto citopatico, le cellule infettate sono fissate con agenti quali la paraformaldeide, acetone o metanolo, seccate e l'antigene virale evidenziato utilizzando un monoclonale anti-BTV o antisieri anti-BTV e si continua con procedure standard di immunofluorescenza.

**L'ELISA capture:** Con questa tecnica antigeni virali raccolti in uova embrionate e medium di coltura (86), insetti infettati (90), e sangue ovino possono essere investigati direttamente. Le proteine del virus vengono legate dagli anticorpi adsorbiti sui pozzetti di piastre per ELISA e i materiali fissati rilevati utilizzando un secondo anticorpo. L'anticorpo di cattura può essere policlonale o un monoclonale sierogruppo-specifico.

**Immunospot test:** Piccoli volumi di surnatante colturale o cellule infettate sonicate o lisate sono adsorbite a nitrocellulosa e essiccate all'aria. Siti di legame non-specifici sono bloccati tramite l'inoculazione in una soluzione contenente proteine di latte scremato. Dopo l'incubazione con un anticorpo reattivo per il sierogruppo BTV, l'anticorpo legato è raccolto usando IgG anti-topo coniugate alla perossidasi.

## **Per il sierotipo:**

**AGID ( immunodiffusione in gel di agar):** Dal 1982 e per lungo tempo è stato il test riconosciuto a livello internazionale per la movimentazione degli animali. Ha sensibilità e specificità minore di altre prove, fra le quali l'ELISA. La metodica più ampiamente utilizzata si basa sulla disponibilità di piastre di gel di agarosio allo 0,9 % in cui sono scavati sei pozzetti attorno ad uno centrale nel quale viene posto l'antigene virale. Nei pozzetti circostanti vengono posti alternativamente il siero da testare e un siero di controllo positivo anti-BTV. Dopo incubazione si osservano le linee di precipitazione tra il pozzetto centrale e i pozzetti con siero positivo. Il test è relativamente rapido (24h) e semplice ma può reagire con altri Orbivirus, in particolare con altri EHD, evidenziando falsi positivi (82). A seguito delle problematiche correlate alla lettura, come l'evidenza di reazioni crociate e la lettura che può essere soggettiva nell'interpretazione dei risultati da parte degli operatori, l'AGID è stato progressivamente sostituito da un test più specifico, quale l'ELISA competitiva.

**ELISA competitiva:** E' un test caratterizzato da elevata sensibilità e specificità. La specificità è dovuta all'impiego di diversi tipi di anticorpi monoclonali sierogruppo-specifici. Nonostante la diversità, tutti sembrano legare la regione amino-terminale della proteina maggiore del core, la VP7. Il siero in esame viene posto in contatto con l'antigene noto e, se nel siero sono presenti anticorpi, questi si legheranno all'antigene occupando i siti di legame, competendo con gli anticorpi monoclonali coniugati con enzima aggiunti successivamente. Essi, non trovando siti di legame liberi, non si legano e l'aggiunta del successivo substrato cromogeno non determina colorazione. Al contrario, in assenza di anticorpi serici, si ha evidenza di colorazione. Il test, raccomandato dall'OIE, permette di evidenziare gli anticorpi di tutti e ventiquattro i sierotipi ed inoltre, dal momento che è altamente specifico, non si hanno reazioni verso antigeni correlati o proteine cellulari. La lettura è effettuata tramite spettrofotometro e i dati sono ottenuti entro 4 ore.

**Virus neutralizzazione:** E' una prova tipo specifica per i 24 sierotipi del virus conosciuti e può essere utilizzata per sierotipizzare un virus isolato o modificato per determinare la specificità degli anticorpi neutralizzanti nel siero . Gli antisieri generati nei maiali della Guinea o nei conigli hanno meno cross- reattività tra sierotipi di quelli ottenuti su bovini e pecore.

Nel test sono messi a contatto diluizioni del virus e diluizioni di antisieri per un pannello di sierotipi di BTV. Quindi questo mix viene inoculato su monostrati cellulari e l'inibizione della crescita del virus e l'assenza dell'effetto citopatico del BTV è indicativo del sierotipo virale.

**Inibizione dell'emoagglutinazione:** Pur conoscendo le proprietà emoagglutinanti del virus, questa tecnica non viene impiegata per la necessità di avere un antigene altamente purificato per ogni sierotipo, con notevoli problemi di stabilità.

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR).***

L'amplificazione primer-diretta permette di evidenziare il genoma virale con la sintesi ciclica di cDNA in vitro per avere un numero elevato di sequenze specifiche facili da evidenziare su gel di agarosio. Se il materiale virale è RNA, come nel caso del BTV, è necessaria una preventiva retrotrascrizione in cDNA, pertanto si parla di Reverse Transcriptase-PCR. L'identità del prodotto si accerta mediante sequenziamento diretto, analisi di digestione con enzimi di restrizione o tecniche di ibridazione. La tecnica può essere utilizzata per riconoscere il sierogruppo, il sierotipo o anche la provenienza geografica (topotipo). Questo perché la conoscenza del virus ha fatto sì da identificare i geni maggiormente conservati identificativi del sierogruppo (M6, L3, S7) e quello identificativo del sierotipo (L2). La multiplex RT-PCR permette di amplificare più tratti del genoma tramite l'utilizzo di più coppie di primers, di evidenziare il patogeno anche in caso di piccole mutazioni del genoma e senza necessità di sequenziamento e di identificare diversi sierotipi

presenti in un'infezione mista. La nested RT-PCR consiste nell'eseguire delle amplificazioni successive usando nella seconda reazione primers più interni rispetto al primo amplificato. Ovviamente ciò aumenta la specificità perché la reazione non avviene se il primo amplificato non è specifico. La PCR permette l'identificazione del virus anche quando il titolo viremico è basso, evidenzia acido nucleico virale nel sangue delle pecore anche in presenza di alti titoli anticorpali che precludono il recupero del virus in colture cellulari (82). La multiplex PCR rileva il virus anche quando le altre prove di isolamento danno esito negativo. Infatti, paragonando l'isolamento in ECE e CC seguito da immunofluorescenza con quello ottenuto con duplex PCR si è visto che quest'ultima rileva il virus anche quando le altre danno esito negativo (91). Una multiplex PCR ha identificato 5 sierotipi di BTV (quelli americani) tra i 24 conosciuti e altri orbivirus correlati, mostrando maggiore affidabilità rispetto alla neutralizzazione virale (92).

## ***1.12 Profilassi.***

Le misure di lotta si basano sulla profilassi diretta e su quella indiretta (vaccinazione).

### ***Profilassi diretta.***

**Controllo delle movimentazioni:** (animali vivi, seme o embrioni). I paesi infetti possono esportare animali vivi seguendo le direttive dell'OIE, mettendo cioè in atto un sistema in grado di evidenziare precocemente l'insorgere della patologia, controllando gli animali prima dello spostamento e praticando un'efficace profilassi vaccinale.

**Quarantena:** Se provenienti da un paese con infezione in atto, gli animali devono essere sottoposti, nei territori di partenza, ad un periodo di quarantena (articolo 2.2.13.8 del Codice Zoosanitario dell'OIE). Questo periodo deve essere di almeno 60 giorni e le strutture devono impedire contatti con il vettore, dotandosi di zanzariere con maglie di diametro non superiore ad 1 mm e di dispositivi atti ad impedire l'ingresso degli insetti.

**Stamping out:** Tutti gli animali malati, infetti, sospetti d'infezione e sospetti di contaminazione devono essere abbattuti. Ovviamente questa metodica non esclude che il contagio venga comunque perpetrato tramite l'insetto vettore ma permette di evitare all'animale malato inutili sofferenze.

**Lotta al vettore:** Il problema principale per la lotta al *Culicoides* è l'individuazione dei siti di riproduzione. È importante che gli animali rimangano protetti in ricoveri muniti di zanzariere o mediante trattamenti direttamente sul corpo da un'ora prima del tramonto all'alba, durante cioè le ore di attività dell'insetto.

Per la lotta alle larve si possono impiegare piretroidi di sintesi nell'acqua ai bordi delle pozzanghere o nei laghetti inquinati da escrementi animali. Per gli adulti la lotta non deve essere condotta in maniera generalizzata perché i trattamenti su tutta la superficie aziendale

potrebbero portare e gravi problemi di inquinamento e di residui pesticidi nella carne e nel latte. Oltretutto gli adulti si trovano vicino agli animali quindi le zone da trattare sono i ricoveri e le pareti esterne ed interne degli ovili.

### ***Profilassi indiretta.***

La profilassi indiretta prevede la vaccinazione delle specie sensibili. La protezione anticorpale nei confronti della bluetongue è sierotipo-specifica, caratteristica dovuta al ruolo chiave della VP2 nell'immunità protettiva mediata dalle cellule B e T. Quindi è necessaria l'identificazione dei sierotipi circolanti nel territorio nel quale si vaccina.

I vaccini che si trovano in commercio contro il virus sono sia attenuati sia inattivati. Questi vaccini devono essere sicuri e devono permettere di differenziare tra animali naturalmente infetti o vaccinati (DIVA: differentiating infected from vaccinated animals).

**Vaccini attenuati:** I vaccini attenuati prodotti in Sud Africa sono stati usati per lungo tempo come strumento di controllo del virus sia in Sud Africa che più recentemente in Corsica, nelle isole Baleari e in Italia. Questi vaccini assicurano una forte protezione dopo una sola inoculazione per almeno un anno e sono i più facili da produrre. Tuttavia non sono sempre sicuri, specialmente in qualche razza sensibile. La loro attenuazione è difficile da controllare e possono generare segni clinici di malattia, aborti, diminuzione nella produzione del latte e decremento nella qualità del seme. In più possono portare ad una viremia di più di due settimane. Possono essere infettanti per il vettore con una potenziale reversione della virulenza o riassortimento con geni del tipo selvaggio dando vita a nuovi ceppi di BTV con virulenza modificata. Oltretutto essi non permettono di differenziare gli animali vaccinati da quelli naturalmente infetti (93, 94).

**Vaccini inattivati:** Possono generare una immunità protettiva appropriata e sicura se ben preparati. Tuttavia una singola vaccinazione potrebbe indurre solo una detenzione

transiente di anticorpi neutralizzanti ed è di solito insufficiente per portare ad un'immunità che duri diversi mesi (particolarmente nei bovini). Una forte immunità a lungo termine può essere conferita da due iniezioni (93). Vaccini inattivati che discernano tra l'animale vaccinato e quello naturalmente infetto sono teoricamente possibili da realizzare ma non ancora prodotti. Sebbene la produzione di questo tipo di vaccino sia costosa e il loro uso sia contrastante, sono i migliori che offrano un compromesso tra sicurezza ed efficacia.

L'autorità Europea sulla sicurezza alimentare ha raccomandato che i paesi utilizzino questo tipo di vaccino utilizzato dal 2005 in diversi paesi europei inclusi Francia ed Italia (93, 95). Tuttavia per ora l'affidabilità di questo tipo di vaccino è diretta solo verso pochi sierotipi.

**Virus like particles:** Le proteine strutturali del BTV possono essere prodotte come proteine ricombinanti codificate da Baculovirus in cellule di insetto, nelle quali loro auto-assemblano come virus like particles (VLP) presentando l'antigenicità del virus senza l'informazione genetica del BTV (67). Sono perciò considerate naturalmente sicure e non richiedono un processo di inattivazione, sebbene uno studio recente abbia sottolineato che le VLP prodotte in laboratorio includono larghe quantità di Baculovirus (96). Sintomatologia clinica si può manifestare a causa della presenza del Baculovirus e per il rischio potenziale della loro replicazione negli insetti vettori di campo. Le VLP sono comunque uno strumento promettente di vaccinazione con le quali generare vaccini multivalenti, dal momento che può essere inclusa la VP2 di diversi tipi virali. Esse in laboratorio mostrano di essere efficaci nel proteggere da infezioni omologhe del virus e di essere in parte protettive contro BTV eterologo (67, 68). Ulteriori studi sono ora incentrati sul capire quale sia la loro stabilità a lungo termine, il loro costo di produzione e purificazione e la loro efficacia su ceppi di campo.

**Vettori ricombinanti:** Potranno essere sviluppati come futuri vaccini, se si dimostreranno sicuri, poco costosi, DIVA, flessibili per l'inclusione di molti sierotipi e se porteranno ad una protezione a lungo termine con una sola inoculazione. Già qualche

promettente risultato è stato ottenuto usando vettori derivati da poxvirus. Si è visto che l'inoculazione contemporanea di vaccini virali che codificano per le proteine VP2 e VP5 (tre iniezioni distanziate da 21 giorni) possono conferire immunità protettiva nelle pecore (66). Ancora più recentemente, un vettore canarypoxvirus che esprimeva geni sintetici ottimizzati per VP2 e VP5 (due iniezioni, ogni 22 giorni) ha portato alti titoli di anticorpi neutralizzanti, una differenziale reattività alla VP2 se paragonato a sieri di pecore infettate (DIVA), e forte protezione contro il tipo omologo. Infine un capripox replicativo che codifica per VP2, VP7, NS1, e NS3 (una iniezione) era parzialmente protettivo in pecore (97, 79). Perciò vettori ricombinanti possono dare immunità protettiva con proprietà DIVA ma la loro efficacia non supera quella dei vaccini inattivati dal momento che sono necessarie diverse iniezione per una protezione a lungo termine. I vettori ricombinanti portano alla produzione di alti livelli di proteina esogena e generano una forte immunità anamnestic cross-protettiva; sono perciò considerati qualificati per uno sviluppo di applicazione su campo.

### ***1.13 Proprietà della proteina VP7 del BTV.***

Essendo la proteina più esterna del core virale e la più accessibile partecipa all'ingresso del virus nella cellula del vettore. La VP7 ha un tripeptide arginina-glicina-aspartato (RGD) presente nei residui aminoacidici 168-170, che è uno dei siti di legame riconosciuti dalle proteine dell'ospite e che appartiene alla famiglia delle integrine, così come la fibronectina, vibronectina e fibrinogeno.

Dalle strutture cristallografiche a raggi X si è visto che questo motivo è localizzato sul dominio superiore dei due domini della molecola e appare essere accessibile. È possibile perciò che sia uno step iniziale per l'attacco del core alle cellule d'insetto. Se si introducono mutazioni puntiformi all'interno degli aminoacidi 168-170 si vede che non ci sono cambiamenti dal punto di vista morfologico, biochimico o per quanto riguarda le caratteristiche immunologiche.

I mutanti reagiscono ai sieri anti-BTV in blotting come il ceppo selvaggio, la proteina è strutturalmente simile alla selvaggia e, come indicato dalla struttura secondaria, mantiene anche abilità nell'organizzarsi in trimeri. Inoltre le core like-particles sono strutturalmente e funzionalmente identiche alle selvaggie. Ciò che cambia è che l'alterazione nella sequenza dell'RGD porta ad una ridotta capacità di legame delle CLP alle cellule d'insetto. Il motivo RGD è conservato per tutti i sierotipi di BTV, ed è essenziale per l'ingresso del virus, dal momento che mutazioni al suo interno risultano in particelle che non si legano alle cellule d'insetto o comunque lo fanno in maniera molto inferiore rispetto ai non mutati. E' quindi evidente il ruolo fondamentale all'interno del virus ricoperto dalla proteina VP7 (98).

### ***1.14 Scopo del lavoro.***

Bluetongue virus è causa di notevoli perdite economiche per i paesi colpiti ed è quindi necessario ed urgente portare avanti studi incentrati sulla realizzazione di misure che siano in grado di combatterne la diffusione. Lo scopo di questo lavoro era la produzione in sistemi eterologhi di antigeni ricombinanti a partire dal sierotipo 2 di BTV circolante in Sardegna nel 2001, utilizzabili come strumenti diagnostici e preventivi della malattia. Per ottenere questo risultato si è partiti dall'isolamento del BTV da pellet di membrane di globuli rossi con il virus ad esse adesivo, conservati in DMSO e stoccati a -80° C, ottenuti precedentemente da sangue di ovini che si erano infettati durante l'epidemia di bluetongue del 2000-2001. Con questo materiale sono state quindi infettate fiasche di cellule VERO, e una volta rilevato l'effetto citopatico il surnatante delle fiasche è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA virale. Si è poi proceduto con l'identificazione del sierogruppo BTV e del sierotipo 2 mediante appositi primers e con il clonaggio dei geni S7 e L2 in sistemi batterici. Il gene S7 è stato poi clonato in un sistema di espressione per *E.coli* e l'espressione della proteina ad esso corrispondente, la VP7, è stata saggiata in immunoblotting ed in ELISA. Inoltre sono stati fatti i primi passi per il clonaggio del gene S7 in vettori per piante.

## ***2. Materiali e metodi.***

### ***2.1 Campioni per l'isolamento virale.***

Il primo passo della ricerca è stato l'isolamento del virus. Per fare ciò siamo partiti da una collezione di campioni di sangue prelevato da ovini sintomatici durante le epidemie di BTV che si sono presentate in Sardegna tra il 2000 e il 2001. Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo di referenza BTV 2.

### ***2.2 Trattamento dei campioni.***

Al momento della raccolta, nel nostro laboratorio il sangue era stato centrifugato a 1000 x g per 10 minuti, il siero ed il buffy coat asportati e i GR (globuli rossi) lavati (centrifugando a 3.000 x g) diverse volte con 2-3 ml di PBS + antibiotico all'1%. Quindi la frazione di GR era stata ripetutamente trattata con acqua mQ filtrata (centrifugando a 3.000 x g), per lisarla, fino ad ottenere un pellet bianco (costituito dalle membrane globulari con adesione del virus), poi risospeso in DMSO e stoccato a -80°C.

### ***2.3 Colture cellulari.***

Allo scopo di isolare il virus della bluetongue sono stati allestiti monostrati di cellule Vero in fiasche da 25 ml utilizzando come terreno di coltura il D-MEM addizionato di FBS al 10% (siero fetale bovino) e penicillina-streptomina all'1%. Le colture di cellule Vero sono state incubate a 37° C in atmosfera con CO<sub>2</sub> al 5%, controllate giornalmente ed eventualmente passate quando giunte a confluenza. Fiasche contenenti cellule a bassa confluenza sono state infettate con i vial di globuli rossi precedentemente descritti potenzialmente infetti e per ciascuna fiasca è stato preparato il corrispondente negativo (GR di bovino sano). Inoltre una

fiasca è stata infettata con il BTV di referenza. Le fiasche sono state messe a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5%° over night (O.N) per consentire l'adsorbimento del virus. Giornalmente le cellule sono state controllate per verificare l'effetto citopatico (placche di lisi e passaggio di cellule in sospensione, figure 29 e 30); al momento opportuno i surnatanti delle fiasche, contenenti cellule infette, sono stati raccolti e centrifugati a 800 x g. I pellet cellulari così ottenuti sono stati risospesi in 100µl di PBS e congelati a -80° C. I surnatanti dei centrifugato invece sono stati messi a contatto con 1 ml di sangue bovino (precedentemente centrifugato e lavato con PBS), lasciati a 37° C O.N per permettere l'adsorbimento del virus alle membrane dei GR e il giorno dopo centrifugati a 800 x g e ripetutamente trattati con acqua mQ sterile per ottenere un pellet costituito dalle membrane dei globuli rossi con il virus ad esse adeso, quindi risospesi in 100µl di PBS e congelati a -80° C.

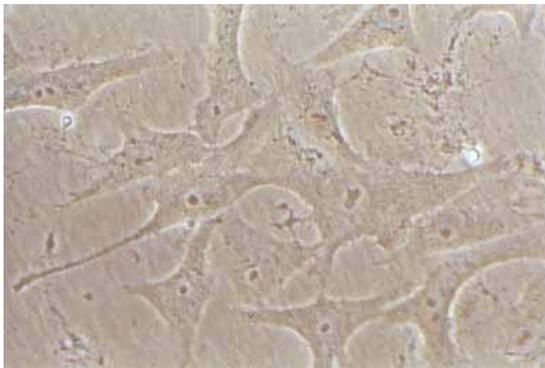


Figura 29: cellule VERO normali in coltura.

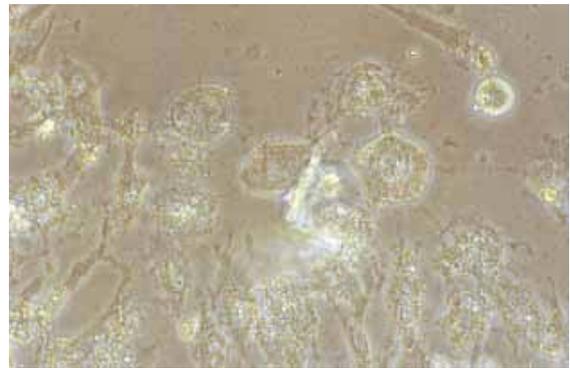


Figura 30: Cellule VERO con effetto citopatico dopo infezione con BTV.

## 2.4 Estrazione dell'RNA.

L'RNA è stato estratto dai pellet utilizzando il kit "Total RNA Isolation Sistem" della Promega:

Il protocollo di lavoro è stato il seguente:

- Togliere il fenolo-cloroformio-isoamilalcol dal frigo e tenerlo per 15 minuti a T ambiente.
- Raffreddare la soluzione di denaturazione in ghiaccio.
- Preparare e raffreddare in freezer il PBS 1X (Per un litro sciogliere in 800 ml di H<sub>2</sub>Omq: 8 gr di NaCl, 0,2 gr di KCl, 1,44 gr di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 gr di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Quindi portare il pH a 7,4 con HCl, portare il volume a 1000 ml con H<sub>2</sub>Omq, autoclavare e conservare a T ambiente).
- Conteggiare le cellule dei pellet risospesi in PBS con la camera di Burkner. Una volta accertato il numero di cellule per ml contenute nel campione, centrifugare a 300 x g per 5 minuti a 4° C.
- Rilavare il pellet con PBS sterile ghiacciato 1X e ripetere la centrifugazione.
- Eliminare il surnatante ed aggiungere la soluzione denaturante fredda; lasciare agire per 5 minuti, e quindi vortexare.
- Aggiungere la quantità raccomandata (in base al campione) di sodio acetato 2M e mescolare minuziosamente invertendo 4-5 volte.
- Quindi, aggiungere la quantità raccomandata di fenolo-cloroformio stando attenti a prenderlo dalla fase organica in basso e mescolare il campione per 3-5 volte per inversione accuratamente.
- Agitare vigorosamente il campione per 10 secondi e raffreddare in ghiaccio per 15 minuti.
- Centrifugare a 10.000 x g per 20 minuti a 4° C e trasferire la fase acquosa che contiene l'RNA in un nuovo tubo (la fase organica e l'interfaccia contengono il DNA genomico).

- Aggiungere un uguale volume di isopropanolo (uguale al volume iniziale del campione) alla fase acquosa e incubare il campione a -20° C per 30 minuti per precipitare l'RNA.
- Centrifugare a 10.000 x g per 10 minuti a 4° C.
- Lavare il pellet ottenuto aggiungendo un ml di etanolo al 75% ghiacciato.
- Sciogliere il pellet con un puntale sterile o una bacchetta di vetro Rnasi-free.
- Centrifugare a 10.000 x g per 10 minuti a 4° C.
- Asciugare all'aria il pellet in un ambiente Rnasi-free per 5-20 minuti.
- Disciogliere l'RNA in TE buffer e stoccare il campione a -80° C.

### ***2.5 Trattamento dell'RNA estratto con DNAsi.***

Dopo l'estrazione dell'RNA virale i campioni sono stati trattati con deoxyribonuclease I (SIGMA cat.n°AMP-D1) per l'eliminazione di eventuali residui di DNA.

Mix di reazione:

|                     |     |
|---------------------|-----|
| RNA in TE           | 8µl |
| Reaction buffer 10x | 1µl |
| Dnase I (1u/ µl)    | 1µl |

Protocollo di lavoro:

- Miscelare delicatamente e incubare 15 minuti a T ambiente.
- Aggiungere 1 µl di STOP SOLUTION.
- Incubare a 70° C per 10 minuti.
- Mettere in ghiaccio.

## **2.6 Retrotrascrizione dell'RNA virale.**

I campioni di RNA sono stati quindi retrotrascritti utilizzando il kit “ImProm-II™ Reverse Trascrizione System” della Promega. Si è allestito un primo mix per il controllo positivo, uno per il negativo e uno per i campioni di RNA da retrotrascrivere.

### **Mix per il controllo positivo:**

|   |     |
|---|-----|
| Controllo positivo: 1.2 kb Kanamicin RNA(1µg) | 2µl |
| Primers Random                                | 1µl |
| Acqua nucleasi-free                           | 2µl |
| TOTALE  | 5µl |

### **Mix per il controllo negativo:**

|                     |      |
|---------------------|------|
| Primers-Random      | 1 µl |
| Acqua nucleasi-free | 4 µl |
| TOTALE              | 5 µl |

### **Campione da retrotrascrivere:**

|                |      |
|----------------|------|
| RNA            | 4 µl |
| Primers Random | 1 µl |
| Totale         | 5 µl |

I campioni sono stati incubati a 70° C per 5 minuti (piastra preriscaldata), quindi raffreddati in ghiaccio per cinque minuti, microcentrifugati per 10 secondi e lasciati in ghiaccio. E' stato poi allestito un secondo mix di reazione da unire al precedente.

**Secondo mix:**

**Per l' RNA virale da retrotrascrivere, il campione positivo e il negativo con trascrittasi inversa:**

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Acqua nucleasi-free           | 5, 5µl  |
| ImProm-II™ 5x Reaction Buffer | 4 µl    |
| MgCl                          | 3 µl    |
| dNTP Mix                      | 1 µl    |
| Rnasina                       | 0, 5 µl |
| Trascrittasi inversa          | 1 µl    |
| TOTALE                        | 15 µl   |

**Per il campione negativo senza trascrittasi:**

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| ImProm-II™5x Reaction Buffer | 4 µl    |
| MgCl                         | 3 µl    |
| dNTP Mix                     | 1 µl    |
| Rnasina                      | 0, 5 µl |
| Acqua nucleasi-free          | 6, 5 µl |
| TOTALE                       | 15 µl   |

I 15 µl sono stati aggiunti ai mix da 5 µl. Le reazioni sono state lasciate a 25° C per 5 minuti, a 42° C per un'ora, a 70° C per 15 minuti e conservate a -20° C. Si è così ottenuta una library di DNA virale.

## ***2.7 Determinazione del sierogrupo.***

Il cDNA ottenuto con la retrotrascrizione è stato testato per la determinazione del sierogrupo. Per fare questo sono state allestite delle PCR per amplificare selettivamente:

1) Il tratto codificante il segmento 10 del genoma del virus AHSV (African horse sickness virus), utilizzando i primers (99):

**P3 : 5'-GTTTAAATTATCCCTTGTC-3'**

**P4 : 5'-GTAAGTCGTTATCCCGGCTC-3'**

Con un prodotto atteso di 758 bp.

2) Il tratto codificante per una porzione del segmento 10 del virus EHDV (Epizootic Haemorrhagic Disease Virus), utilizzando i seguenti primers (100):

**EHDV P1/F : 5'-GGTTGCTTATGCTTCGTATGCGGA-3'**

**EHDV P2/R : 5'-CACGACATAGTGACCTTGGAGCTT-3'**

Con un prodotto atteso di 503 bp.

3) il tratto codificante per una porzione del segmento 6 del BTV (bluetongue virus) utilizzando i seguenti primers (101):

**BTVA /F : 5'-GTTCTCTAGTTGGCAACCACC-3'**

**BTVB /R : 5'-AAGCCAGACTGTTTCCCGAT-3'**

Con un prodotto atteso di 274 bp.

Per questa ultima reazione è stata utilizzata la Gotaq, allestendo una miscela di 50 µl comprendente l'acqua mQ sterile, il buffer 5 X, i primers specifici 10µM, dNTP mix 10mM, la Taq e il nostro cDNA (BTV di campo e BTV di referenza). Il protocollo delle temperature utilizzate è il seguente:

- 1) Denaturazione iniziale      95° C per 2 minuti
  - 2) Denaturazione                95° C per 1 minuto
  - 3) Annealing                    55° C per 1 minuto
  - 4) Extension                    72° C per 1 minuto
- 2, 3, 4 ripetuti per 30 cicli
- 5) Extension finale            72° C per 5 minuti

Tutti i prodotti di PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio al 2% (60 ml di TAE 1X, 1,2 gr di agarosio, 4 µl di etidio bromuro) per controllare la taglia degli amplificati.

## ***2.8 Analisi di restrizione degli amplificati della NS1.***

Una volta identificato il sierogruppo, per verificare la specificità dei prodotti di PCR, oltre alla valutazione della taglia, è stata fatta una digestione con un enzima di restrizione.

Per sottoporli alla digestione gli amplificati sono stati prima purificati con il MinElute PCR Purification Kit della Quiagen.

### **Protocollo di purificazione:**

Prima di iniziare aggiungere l'etanolo (al 96, 100%) al Buffer PE.

Aggiungere l'indicatore di pH al Buffer PB.

Quindi:

- 1) Aggiungere 5 volumi di Buffer PB ad un volume della reazione di PCR e mischiare.
- 2) Verificare che il colore del mix sia giallo.
- 3) Posizionare una colonnina in un tubo da 2 ml.
- 4) Mettere il campione nella colonna e centrifugare a 17.900 x.g per un minuto.
- 5) Scaricare il materiale e rimettere la colonna nel tubo.
- 6) Per lavare, addizionare 750 µl di Buffer PE alla colonna e centrifugare a 17.900 x g per un minuto.
- 7) Scaricare e centrifugare di nuovo per un minuto a massima velocità.
- 8) Mettere la colonna in un tubo da 1,5 ml. Per eluire, mettere 10µl di Buffer di eluizione al centro della colonna a lasciare 10 minuti a temperatura ambiente.
- 9) Centrifugare 1 minuto a 17.900 x g.

Una volta purificati, i campioni sono stati sottoposti alla reazione di digestione. L'utilizzo dei primers BTVA/F e BTVB/R consente di caratterizzare ulteriormente la NS1; infatti questo tratto contiene un sito di restrizione per l'enzima *HpaII*, corrispondente alla sequenza **CCGG**, presente in alcuni sierotipi (come il 2, 4, 9) ma non in quello di riferimento. L'enzima taglia l'amplificato del BTV di campo di 274 bp in due parti; una di 68 bp e l'altra di 206 bp, mentre non taglia quello del BTV di riferimento che non ha il sito di taglio per questo enzima.

Mix per la reazione di digestione :

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| 10X buffer HpaII   | 3 $\mu$ l              |
| <i>HpaII</i>       | 0.2 $\mu$ l            |
| DNA                | 1 $\mu$ g              |
| H <sub>2</sub> Omq | a volume di 30 $\mu$ l |

Le digestioni sono state controllate su gel di agarosio all'1% (60 ml di TAE 1x, 0,6 gr di agarosio, 4  $\mu$ l di etidio bromuro).

## ***2.9 Determinazione del sierotipo.***

Per l'evidenziazione del sierotipo sono stati usati primers disegnati sui sierotipi 4, 9 e 2 circolanti in Sardegna .

Primers per l'amplificazione di un tratto della VP2 sierotipo 4:

**BTV/ 4/ Sense      5'- AACATATTCAGAACAGGGGGAG- 3'**

**BTV/ 4/ Reverse    5'- CTCTATCGGTTCATCCAATTC- 3'**

Primers per l'amplificazione di un tratto della VP2 sierotipo 9:

**BTV/ 9/ Sense      5'- GAAAAAACGCTGATGCGATCGC- 3'**

**BTV/ 9/ Reverse    5'- TCTAGCGTTTTATCCGCCGCA- 3'**

Primers discriminanti per l'amplificazione di un tratto della VP2 sierotipo 2:

**BTV/ 2/ Corso/ Sense      5'- GGCATTCCGATTTATGGACGTAA- 3'**

**BTV/ 2/ Corso/ Reverse    5'- TCTCTGCATCTTCAATTGCTTC- 3'**

La sequenza è stata disegnata su quella della VP2 del virus circolante in Corsica.

Il protocollo delle temperature utilizzate per l'amplificazione dei primers discriminanti la VP2 sierotipo 2 è il seguente:

- 1) Denaturazione iniziale                      95° C per 2 minuti
- 2) Denaturazione                                95° C per 1 minuto
- 3) Annealing                                      55° C per 1 minuto
- 4) Estensione                                     72° C per 30 secondi

Passaggi dal 2 al 4 ripetuti per 30 cicli.

- 5) Estensione finale                            72° C per 5 minuti

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati controllati su gel di agarosio al 2%.

### ***2.10 Amplificazione dei geni L2 e S7.***

Sono state allestite delle reazioni di PCR con primers specifici per la sequenza corrispondente all'intero segmento del gene L2 del sierotipo 2 di BTV e a quello del gene S7 dello stesso sierotipo virale.

#### **Primers per il gene L2:**

**BTV2/ VP2/ ATG/ F                                5'- ATGGATGAACTTGGCATTCCG- 3'**

**BTV2/ VP2/ STOP/ R                                5'- CACGCAGGTCATACATTGAG- 3'**

#### **Primers per il gene S7:**

**BTV2/ VP7/ CORSICAN/ F                                5'- ATGGACACTATCGCGGCAAG- 3'**

**BTV2/ VP7/ CORSICAN/ R                                5'- TGGACTACACATAAGCGGCG- 3'**

Per le amplificazioni specifiche dei gene L2 e S7 sono state allestite due reazioni di PCR utilizzando la GoTaq e i seguenti protocolli di temperature.

#### **Protocollo di PCR per il segmento L2:**

- 1) Denaturazione iniziale                      95° C, 2 minuti
- 2) Denaturazione                                95° C, 1 minuto
- 3) Annealing                                      56° C, 1 minuto
- 4) Estensione                                     72° C, 3 minuti

Passaggi dal 2 al 4 ripetuti per 35 cicli

- 5) Estensione finale                            72° C, 5 minuti

#### **Protocollo di PCR per il segmento S7:**

- 1) Denaturazione iniziale                      95° C, 2 minuti
- 2) Denaturazione                                95° C, 1 minuto
- 3) Annealing                                      62° C, 1 minuto
- 4) Estensione                                     72° C, 1 minuto e mezzo

Passaggi dal 2 al 4 ripetuti per 35 cicli

- 5) Estensione finale                            72° C, 5 minuti

I prodotti di PCR sono stati fatti correre su gel di agarosio al 2% per il controllo.

A questo punto gli amplificati di ogni reazione riuniti in un'unica provetta sono stati caricati su gel di agarosio all'1% in due superpозzetti e fatti correre a 60 volt. Il gel è stato quindi tagliato e le bande purificate con il "Qiaquick Gel Extraction Kit" della Qiagen.

### **Protocollo di purificazione da gel:**

Prima di iniziare verificare che il colore del Buffer QG sia giallo, aggiungere l'indicatore di pH e verificare che sia  $\leq$  a 7,5. Aggiungere l'etanolo (96, 100%) al Buffer PE.

1. Tagliare la banda corrispondente all'amplificato da gel.
2. Pesare il gel. Aggiungere 3 volumi di Buffer QG a un volume di gel (Es: 100 mg = 300 $\mu$ l).
3. Incubare per 10 minuti a 50° C. Vortexare ogni 2-3 minuti per aiutare il gel a sciogliersi.
4. Controllare che il colore del mix sia giallo.
5. Aggiungere un volume di isopropanolo (rispetto al quantitativo iniziale di gel) al campione e mischiare.
6. Prendere una colonnina e posizionarla in un tubo da 2 ml.
7. Mettere il campione nella colonna e centrifugare a 17.900 x g per un minuto.
8. Buttare il materiale e rimettere la colonna nello stesso tubo.
9. Aggiungere 500 $\mu$ l di Buffer QG alla colonna e centrifugare per 10 minuti a 17.900 x g. Eliminare l'eluato.
10. Per lavare aggiungere 750  $\mu$ l di Buffer PE alla colonna e centrifugare a 17.900 x g per un minuto. Eliminare l'eluato.
11. Centrifugare di nuovo a 17.900 x g per un altro minuto.
12. Mettere la colonna in un nuovo tubo da 1,5 ml.
13. Per l'eluizione, aggiungere 50  $\mu$ l del Buffer di eluizione al centro della colonna, lasciare la colonnina per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugare a 17.900 x g per 1 minuto.

Gli amplificati poi sono stati sottoposti a corsa elettroforetica per verificare che la purificazione fosse avvenuta in maniera corretta.

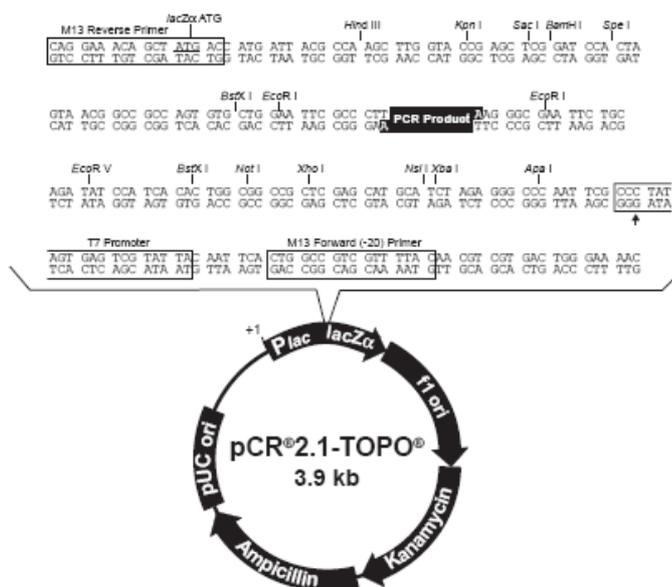
Per confermare di nuovo che la sequenza dell'L2 appartenesse al sierotipo sardo è stata allestita una reazione di PCR con primers specifici per il sierotipo Corso (pag. 60) utilizzando come campione di partenza l'amplificato purificato ottenuto con i primers specifici per l'intero segmento L2. L'amplificato è stato diluito con acqua mQ sterile in modo che fosse diluito 1:10, 1:100 e 1:1000 e sottoposto alla reazione utilizzando la GoTaq e il seguente protocollo di temperature.

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1) Denaturazione iniziale                | 95° C per 2 minuti   |
| 2) Denaturazione                         | 95° C per 30 secondi |
| 3) Annealing                             | 58° C per 30 secondi |
| 4) Estensione                            | 72° C per 30 secondi |
| Passaggi da 2 al 4 ripetuti per 30 cicli |                      |
| 5) Estensione finale                     | 72° C per 5 minuti   |

Il prodotto dell'amplificazione è stato controllato su gel di agarosio al 2%.

## 2.11 Clonaggio in vettore procariotico.

Il passo successivo è stato quello di clonare gli inserti L2 e S7 in un vettore di clonaggio procariotico (pCR 2.1, **figura 31**), in modo da produrne una elevata quantità.



**Fig. 31:** Mappa e sequenza del pCR2.1.

La reazione di ligation degli inserti L2 e S7 entro il vettore **pCR 2.1** è stata allestita utilizzando la metodica del TOPO TA cloning. I quantitativi dei componenti della mix nella reazione sono i medesimi per L2 e per S7.

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Prodotto di PCR fresco | 4µl |
| Soluzione salina       | 1µl |
| TOPO vector            | 1µl |
| Totale                 | 6µl |

Miscelare delicatamente la reazione ed incubare per 30 minuti a TA.

Mettere in ghiaccio.

## ***2.12 Trasformazione di Escherichia coli con i plasmidi di clonaggio.***

Per le trasformazioni di *E.coli* TOP 10 con i vettori ricombinanti pCR2.1/L2 e pCR2.1/S7 è stato utilizzato un vial di *E.coli* per ogni reazione di trasformazione procedendo come segue:

- 1) Aggiungere 2  $\mu$ l della reazione di clonaggio ad un vial di One Shot Chemically Competent Top10 *E.coli*.
- 2) Mescolare gentilmente muovendo il puntale in circolo.
- 3) Incubare in ghiaccio 30 minuti.
- 4) Mettere la reazione per 30 secondi a 42° C in modo da causare uno shock.
- 5) Mettere in ghiaccio.
- 6) Aggiungere 250 $\mu$ l di SOC medium e agitare per un'ora a 37° C.
- 7) Seminare 20 $\mu$ l e 100 $\mu$ l del prodotto di trasformazione su piastre LB (Per un litro di LB: 10 gr Triptone, 5 gr estratto di lievito, 10 gr di NaCl e 15gr di agar. Sciogliere in 800 ml di acqua mQ. Misurare il pH 7,0 con NaOH e sterilizzare in autoclave) contenenti ampicillina ad una concentrazione di 100  $\mu$ g/ml.
- 8) Incubare a 37° C overnight.
- 9) Il giorno dopo selezionare le colonie bianche tramite la discriminazione blu-bianco dovuta al gene della  $\beta$  galattosidasi contenuto nel vettore di clonaggio.
- 10) Mettere in crescita le colonie contenenti l'inserto in LB liquido con ampicillina 100  $\mu$ g/ml over night.
- 11) Il giorno dopo estrazione plasmidica delle colonie selezionate.

### ***2.13 Estrazione dei vettori di clonaggio dopo trasformazione di Escherichia coli.***

Per confermare l'avvenuto legame tra gli inserti L2 e S7 e il vettore di clonaggio si è proceduto con la purificazione dei plasmidi pCR 2.1/L2 e pCR2.1/S7 utilizzando il PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (INVITROGEN cat n° K2100-11).

Prima di cominciare:

aggiungere, se il kit è nuovo, RnasiA al Resuspension Buffer (R3) secondo le istruzioni. Mischiare bene. Stoccare a 4° C.

Controllare che il Lysis Buffer (L7) non contenga precipitati. Se li contiene tenerlo a 37° C nel bagnetto per pochi minuti finchè non si sciolgono. Non agitare.

Aggiungere etanolo al 96–100% al Wash Buffer 9 (W9) e al Wash Buffer 10 (W10) seguendo le istruzioni. Mischiare bene. Stoccarli a T ambiente.

Quindi:

- 1) Centrifugare da 1 a 5 ml di coltura batterica ( $1-2 \times 10^9$  *E. coli* in LB medium).  
Rimuovere attentamente il surnatante dal pellet cellulare.
- 2) Aggiungere 250 µl di Resuspension Buffer (R3) con RnasiA al pellet e risospendere le cellule fino ad aver una soluzione omogenea.
- 3) Aggiungere 250 µl di Lysis Buffer (L7) e mescolare invertendo gentilmente la provetta per 5 volte. Non vortexare. Mettere a incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Non superare i 5 minuti.
- 4) Aggiungere 350 µl di Precipitation Buffer (N4) e mescolare immediatamente invertendo la provetta finchè la soluzione non diventa omogenea. Non vortexare.

- 5) Centrifugare a 12.000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il lisato dai detriti.
- 6) Trasferire il surnatante limpido in un Wash tube da 2 ml e centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto.
- 7) Buttare il materiale scaricato e rimettere la colonna nel Wash tube.
- 8) Aggiungere 500 µl di Wash Buffer (W10) con etanolo alla colonna. Incubare per 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugare a 12.000 x g per 1 minuto. Scaricare il materiale e rimettere la colonna nel Wash Tube.

**Nota:** questo step di lavaggio è raccomandato quando stai usando ceppi end A+.

- 9) Aggiungere 700 µl di Wash Buffer (W9) con etanolo alla colonna.
- 10) Centrifugare la colonna a 12.000 x g per un minuto. Scaricare il materiale e rimettere la colonna nel Wash Tube.
- 11) Centrifugare la colonna a 12.000 x g per un minuto per rimuovere ogni residuo di Wash Buffer (W9). Scaricare.
- 12) Mettere la colonna in un tubo pulito da 1,5 ml.
- 13) Aggiungere 75 µl di TE Buffer preriscaldato al centro della colonna.
- 14) Incubare per 10 minuti a T ambiente.
- 15) Centrifugare a 12.000 x g per 2 minuti.

Il tubo ora contiene il DNA plasmidico purificato. Buttare la colonna.

- 16) Quantificare al fotometro.

## ***2.14 Digestione delle miniprep plasmidiche.***

Per verificare il corretto inserimento di L2 e S7 all'interno del vettore pCR 2.1 sono state allestite due reazioni di digestione enzimatica utilizzando l'enzima *EcoRI* (Biolabs 20U/ $\mu$ l). Questo enzima taglia all'interno del plasmide in due siti fiancheggiati quello contenente la sequenza di interesse, permettendo quindi di rilevare su gel di agarosio all'1% la presenza di due bande diverse nel campione digerito, che corrispondono al plasmide aperto e all'inserito di interesse a fronte di una sola banda nel campione non digerito, corrispondente al plasmide vuoto. I campioni di DNA sono in una reazione il plasmide pCR2.1/L2 e nell'altra il pCR2.1/S7. I quantitativi di enzima e buffer sono i medesimi per entrambe le reazioni, mentre varia il quantitativo in  $\mu$ l di DNA a seconda della concentrazione dei due plasmidi allo spettrofotometro, e di conseguenza la quantità di H<sub>2</sub>O per arrivare a volume.

Mix di digestione:

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| 10X buffer EcoRI   | 3 $\mu$ l              |
| <i>EcoRI</i>       | 0.1 $\mu$ l            |
| DNA                | 1 $\mu$ g              |
| H <sub>2</sub> OMQ | a volume di 30 $\mu$ l |

La reazione è stata incubata per 2 ore a 37° C in bagnetto termostato e controllata su gel di agarosio all'1%.

### ***2.15 Allestimento di maxiprep plasmidiche a partire da colture di E. coli trasformati con i vettori di clonaggio.***

Una volta controllati i plasmidi mediante digestione enzimatica, circa 1 ml di coltura O.N (LB con ampicillina 100µg/ml) della colonia positiva è stato utilizzato come starter in 200 ml di LB antibiotato, così da ottenere una grande quantità di batteri trasformati e molteplici copie dei plasmidi pCR2.1/L2 e pCR 2.1/S7. Il kit utilizzato per la maxiprep plasmidica era il PureLink™ HiPure Plasmid DNA (INVITROGEN: k2100-06).

È stato applicato il seguente protocollo:

Prima di iniziare verificare che l'Rnase A sia stata aggiunta al Resuspension Buffer (R3) e che non si siano formati precipitati nel Buffer di lisi.

#### ***Equilibratura della colonna.***

Mettere la colonna in sospensione. Versare 30 ml di Equilibration Buffer (EQ1) nella colonna. e permettere che la soluzione scenda per gravità.

Procedere con la preparazione del lisato mentre la colonna sta equilibrando.

#### ***Estrazione:***

usare 200 ml di una coltura di LB cresciuta O.N.

- 1) Raccogliere le cellule centrifugando la coltura a 4.000 x g per 10 minuti. Rimuovere il surnatante.
- 2) Aggiungere 10 ml di R3 con Rnase A al pellet e risospendere le cellule fino a che non sono omogenee. Trasferire le cellule in una provetta da centrifuga da 50 ml.
- 3) Aggiungere 10 ml di L7. Miscelare invertendo la provetta 5 volte. Non vortexare. Incubare a T ambiente per 5 minuti (senza superarli).
- 4) Aggiungere 10 ml di N3 e miscelare subito invertendo finchè la miscela non è omogenea. Non vortexare.

5) Centrifugare a 12.000 x g per 10 minuti a T ambiente.

**Nota:** Se il pellet non aderisce alle pareti, incubare a T ambiente per 5 minuti per permettere la separazione del lisato e del pellet gelatinoso. Pipettare il lisato in una altra provetta e centrifugare a 15.000 x g per 5 minuti a T ambiente per rimuovere ogni detrito cellulare rimanente.

6) Mettere il surnatante nella colonna equilibrata. Permettere che la soluzione nella colonna scenda per gravità.

7) Lavare la colonna con 60 ml di Wash Buffer (W8). Permettere che la soluzione nella colonna scenda per gravità.

8) Mettere una provetta da centrifuga sterile sotto la colonna (provetta di eluizione).

9) Aggiungere 15 ml di Buffer di Eluizione (E4) alla colonna per far eluire il DNA. Permettere che la soluzione scenda per gravità. Non forzare la soluzione rimanente. La provetta contiene il DNA purificato. Buttare la colonna.

10) Aggiungere 10, 5 ml di isopropanolo al tubo di eluizione. Mischiare bene.

11) Centrifugare a 15.000 x g per 30 minuti a 4° C. Rimuovere piano e buttare il surnatante.

12) Risospendere il pellet in 5 ml di etanolo al 70%.

13) Centrifugare a 15.000 x g per 5 minuti a 4° C. Rimuovere lentamente e buttare il surnatante.

14) Lasciare all'aria il pellet per 10 minuti.

15) Risospendere il DNA in 300 µl di TE Buffer.

16) Quantificare al fotometro

## 2.16 Digestione enzimatica delle maxiprep plasmidiche.

In seguito all'estrazione del DNA plasmidico da grandi quantità di *E. coli* trasformati con i plasmidi di interesse si sono controllati i campioni mediante digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *EcoRI* (Biolabs 20U/μl) che taglia il plasmide ai lati delle sequenze di nostro interesse. I campioni di DNA sono in una reazione il pCR2.1/L2 e nell'altra il pCR2.1/S7. I quantitativi di enzima e buffer sono i medesimi per entrambe le reazioni, mentre varia il quantitativo in μl di DNA a seconda della concentrazione dei due plasmidi allo spettrofotometro e, di conseguenza, la quantità di H<sub>2</sub>O per arrivare a volume.

Mix di reazione:

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| 10X buffer EcoRI | 3 μl              |
| <i>EcoRI</i>     | 0.1 μl            |
| DNA              | 1 μg              |
| H <sub>2</sub> O | a volume di 30 μl |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C in bagnetto termostato e controllarla su gel di agarosio all'1%.

Per il plasmide pCR2.1/L2 è stata anche allestita una reazione di digestione enzimatica con altri due enzimi di restrizione: *XcoI* (Roche 10U/ μl) e *Hind III* (Roche 10U/μl) che tagliano ognuno in uno dei siti fiancheggianti l'inserto.

Mix di reazione:

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| 10X buffer B     | 3 μl              |
| <i>XcoI</i>      | 0.125 μl          |
| <i>HindIII</i>   | 0.1 μl            |
| DNA              | 1 μg              |
| H <sub>2</sub> O | a volume di 30 μl |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C in bagnetto termostato e controllarla su gel di agarosio all'1%.

Una volta verificato il corretto inserimento degli inserti L2 e S7 nel plasmide, i due vettori ricombinati sono stati sequenziati per verificare che le sequenze dei geni di interesse non contenessero mutazioni.

### ***2.17 Sequenziamento dei plasmidi pCR2.1/L2 e pCR2.1/S7.***

Per il sequenziamento plasmidico è stato usato il KIT ABI PRISM Big Terminator Cycle Sequencing Reading, secondo il protocollo allegato, e un sequenziatore ABI PRISM 310. Le sequenze generate sono state corrette con il programma CHROMAS (Technelysium Pty Ltd Australia) ed è stata effettuata una ricerca di sequenze nucleotidiche simili mediante BLASTn. Proteine omologhe sono state inoltre identificate sottoponendo le sequenze ottenute ad analisi ORF-finder e BLASTp. Per confermarne l'identità, le sequenze sono state allineate alle regioni corrispondenti di un campione di BTV rappresentativo dei differenti gruppi usando CLUSTAL X.

### ***2.18 Amplificazione del gene S7 per l'inserimento nel plasmide di espressione pRSETB.***

Il plasmide pCR2.1/S7 è stato utilizzato come campione di partenza per l'amplificazione del gene S7 con nuovi primers contenenti i siti di restrizione per gli enzimi *NcoI* e *BglII*. Questa amplificazione è necessaria per permettere l'inserimento del gene di interesse, amplificato e in seguito digerito con gli stessi enzimi di restrizione, all'interno di un

plasmide di espressione a sua volta precedentemente digerito con gli stessi primers e poi defosforilato.

Sequenza degli oligonucleotidi:

**BTV2/VP7/ATG/BglIII/F 5'-GAAGATCTATGGACACTATCGCGGCAAGAG-3'**

**BTV2/VP7/STOP/NcoI/R 5'-AACCATGGTGGACTACACATAAGCGGCGCG-3'**

Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la Taq polimerasi Pfx ,una Taq proofreading che ha la capacità di correggere gli errori che si potrebbero verificare nella sequenza evitando l'insorgere di mutazioni al suo interno.

Il programma di PCR utilizzato per questa amplificazione è il seguente:

- 1) Denaturazione iniziale                      94° C, 2 minuti
- 2) Denaturazione                                94° C, 30 secondi
- 3) Annealing                                    55° C 1 minuto
- 4) Estensione                                    68° C, 1 minuto e mezzo

Passaggi dal 2 al 4 per 35 cicli

- 5) Estensione finale                            68° C, 10 minuti

I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% per il controllo, quindi purificati e utilizzati per la successiva digestione.

### ***2.19 Digestione del gene S7 amplificato con primers contenenti i siti di restrizione per NcoI e BglII.***

La digestione del gene S7 dopo l'amplificazione è stata allestita utilizzando gli enzimi *NcoI* (Biolabs 10U/ µl) e *BglII* (Biolabs 10U/ µl) i cui siti di restrizione sono contenuti nei primers amplificanti l'S7. La digestione è stata fatta per preparare il gene S7 all'inserimento nel plasmide di espressione digerito con gli stessi enzimi.

Mix di reazione per la digestione enzimatica dell'amplificato S7:

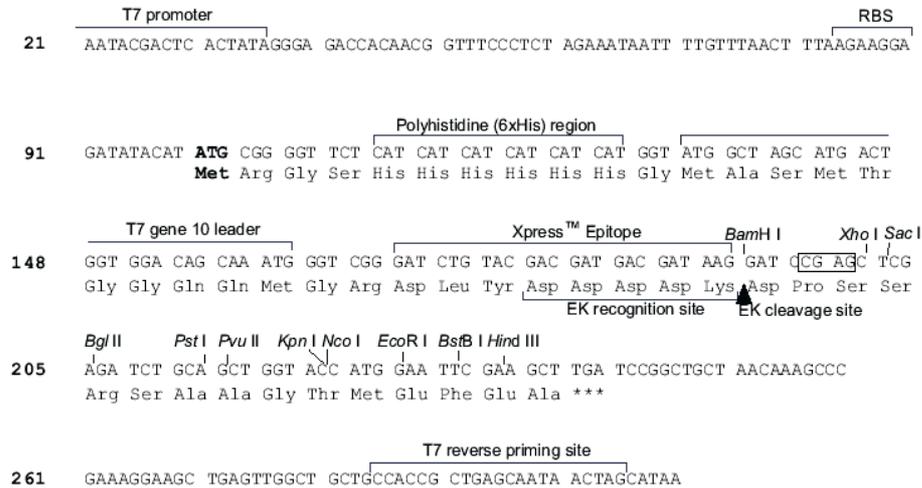
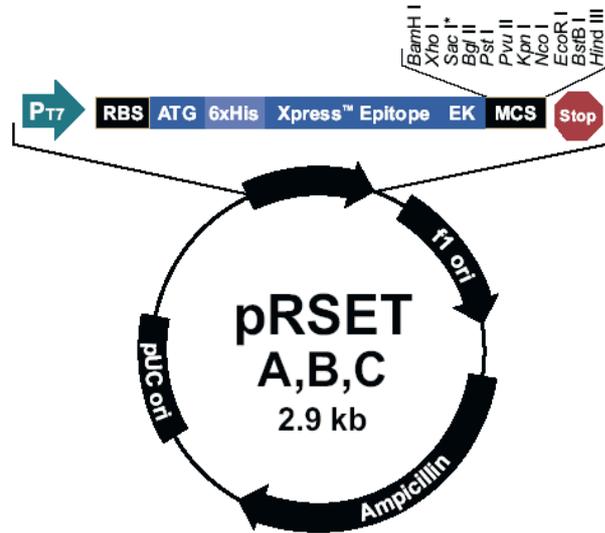
|                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| 10X buffer 3       | 6 µl              |
| <i>NcoI</i>        | 1 µl              |
| <i>BglII</i>       | 1 µl              |
| DNA                | 3 µg              |
| H <sub>2</sub> OMQ | a volume di 60 µl |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C in bagnetto termostato.

Purificare la digestione enzimatica come se fosse un prodotto di PCR (MinElute PCR Purification Kit), quantificarla al fotometro e utilizzarla per la ligation con il plasmide di espressione.

## 2.20 Plasmide scelto per il clonaggio di espressione.

Il plasmide di espressione scelto per l'inserimento del gene S7 al suo interno è il pRSET B.



**Figura 32:** Mappa e regione multipla di clonaggio del plasmide pRSET B

## **2.21 Digestione e defosforilazione del plasmide di espressione pRSET B.**

Il plasmide pRSET B è stato digerito con gli enzimi di restrizione *NcoI* e *BglII* per linearizzarlo e permettere il successivo legame con il gene S7. In seguito il plasmide è stato trattato con la fosfatasi alcalina per eliminare i gruppi 5' fosfato e impedirgli di richiudersi su se stesso.

### **Mix di digestione plasmidica:**

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| 10X buffer 3       | 2 $\mu$ l    |
| <i>NcoI</i>        | 0,6 $\mu$ l  |
| <i>BglII</i>       | 0,6 $\mu$ l  |
| pRSET B            | 5 $\mu$ g    |
| H <sub>2</sub> Omq | 13,3 $\mu$ l |
| Totale             | 20 $\mu$ l   |

Incubare il mix a 37°C per 2 ore in bagnetto termostato.

### **Mix di defosforilazione plasmidica. (kit Promega):**

Questo mix è da aggiungere alla reazione di digestione dopo due ore di incubazione a 37°C:

|                     |            |
|---------------------|------------|
| 10X dephosf. Buffer | 5 $\mu$ l  |
| Fosfatasi alcalina  | 4 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> Omq  | 21 $\mu$ l |

Incubare la reazione a 37°C per un'altra ora.

Purificazione da gel di agarosio all'1% del plasmide digerito e defosforilato. Il kit utilizzato per la purificazione da gel è il "Qiaquick Gel Extraction" della Quiagen.

Quindi il plasmide purificato è stato quantificato al fotometro.

## ***2.22 Clonaggio del plasmide di espressione pRSET B/S7.***

La reazione di ligation tra il pRSET B digerito, defosforilato e purificato e l'amplificato del gene S7, anch'esso digerito e purificato, è stata condotta con il rapid DNA ligation Kit (Roche, cat n° 1635379) .

Il mix di reazione era il seguente :

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| pRSET B                 | 50 ng                              |
| S7                      | 150 ng                             |
| 5X DNA diluition buffer | 2 µl                               |
| H <sub>2</sub> Omq      | fino a volume                      |
| Totale                  | 10 µl                              |
| <b>Quindi:</b>          | 10 µl di T4 DNA 2X ligation buffer |
| E in aggiunta           | 1 µl di T4 DNA ligase              |

La reazione è stata poi incubata a 16°C O/N.

## ***2.23 Trasformazione delle cellule competenti DH5α con il plasmide di espressione pRSET B/S7.***

La trasformazione di *E.coli* DH5α con il plasmide di interesse è stata effettuata come segue:

- 1) Scongela in ghiaccio le DH5α competenti.

- 2) Mettere, per ogni prodotto di ligation, 100 µl di cellule in una falcon da 15 ml ghiacciata.
- 3) Aggiungere 5 µl di prodotto di ligation (se si utilizza il Kit Roche) senza spipettare, ma solo muovendo leggermente il puntale per non rompere le cellule.
- 4) Lasciare in ghiaccio per 45 minuti.
- 5) Shockare le cellule a 42°C per circa un minuto e rimetterle subito in ghiaccio.
- 6) Aggiungere 900 µl di LB (senza antibiotico).
- 7) Far crescere a 225 RPM per 1 ora a 37°C (il plasmide inizia ad esprimere i prodotti di resistenza).
- 8) Piastrare su LB + ampicillina (100 µg/ml) e incubare a 37°C overnight in incubatore.
- 9) Il giorno successivo prelevare una colonia trasformata dalla piastra e inocularla in 5 ml di LB + ampicillina (100 µg/ml). Incubare a 37°C, 225 RPM O.N.
- 10) Il giorno successivo utilizzare 3 ml di coltura per fare l'estrazione plasmidica di controllo in miniprep del plasmide pRSET B/S7 utilizzando il "PureLink™ Quick Plasmid Miniprep" Kit (protocollo pagina 67-68).

## ***2.24 Digestioni di controllo della miniprep del plasmide di espressione pRSETB/S7.***

Per la digestione enzimatica di controllo del plasmide pRSET B/S7 sono stati utilizzati gli enzimi *EcoRI* e *BamHI* che, all'interno della sequenza plasmidica tagliano più esternamente da entrambe le parti di quanto non facciano *NcoI* e *BglII*, permettendo perciò di linearizzare il plasmide separandolo dall'inserto corrispondente all'S7.

Mix di reazione della digestione:

|                  |                        |
|------------------|------------------------|
| 10X buffer EcoRI | 3 $\mu$ l              |
| 100X BSA         | 0,3 $\mu$ l            |
| <i>Bam</i> HI    | 0.2 $\mu$ l            |
| <i>Eco</i> RI    | 0.2 $\mu$ l            |
| DNA              | 1 $\mu$ g              |
| H <sub>2</sub> O | a volume di 30 $\mu$ l |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C e controllarla su gel di agarosio all'1%.

Una volta controllati i plasmidi mediante digestione enzimatica, circa 1 ml del brodo di coltura (LB con ampicillina 100 $\mu$ g/ml) contenente la colonia positiva cresciuta O.N è stato utilizzato come starter in 200 ml di LB antibiotato così da ottenere una grande quantità di batteri trasformati e molteplici copie del plasmide pRSET B/S7. Il kit utilizzato per la maxiprep plasmidica era il PureLink™ HiPure Plasmid DNA (protocollo a pagina 70-71).

## **2.25 Digestioni pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da maxi-colture.**

Per la digestione di controllo delle maxiprep plasmidiche pRSET B/S7 sono stati utilizzati gli enzimi *EcoRI* e *BamHI*.

Mix di reazione:

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| 10X buffer EcoRI | 3 $\mu$ l         |
| 100X BSA         | 0,3 $\mu$ l       |
| <i>BamHI</i>     | 0,2 $\mu$ l       |
| <i>EcoRI</i>     | 0,2 $\mu$ l       |
| DNA              | 1 $\mu$ g         |
| H <sub>2</sub> O | fino a 30 $\mu$ l |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C e controllarla su gel di agarosio all'1%.

Una volta controllato mediante digestione, il plasmide è stato sequenziato per verificare che la sequenza del gene S7 fosse corretta.

## **2.26 Trasformazione di *E.coli* BL21 con il plasmide di espressione pRSET B/S7.**

La trasformazione di *E.coli* BL21 con il plasmide di espressione è stata effettuata con il Rapid transit<sup>TM</sup> transformation Kit (SIGMA cat. n° R-2653). Prima di tutto è stato necessario rendere competenti gli *E.coli* BL21 procedendo nel seguente modo:

- 1) Scongellare un vial di BL21 a 37°C e piastrarne circa 20µl su piastre di LB + cloramfenicolo 35µg/ml usando un'ansa. Incubare O.N a 37°C in incubatore.
- 2) Trasferire una colonia in ~3 ml di LB + cloramfenicolo 35 µg/ml e incubare a 37°C O.N a 225 RPM.
- 3) Trasferire un'aliquota della coltura in un medium di coltura preriscaldato (LB + cloramfenicolo 35 µg/ml) ad una diluizione 1:100 così che la sua assorbanza iniziale (OD600) sia approssimativamente di 0,01-0,05 (es: 100 µl di cellule in 10 ml di LB + cloramfenicolo). Incubare la coltura a 37°C a 250 RPM.
- 4) Far crescere le cellule fino ad ottenere una assorbanza (OD600) di 0.3-0.4 (generalmente per *Escherichia coli* è richiesto un tempo variabile da 90 a 240 minuti).
- 5) Preparare il Rapid Transit Buffer durante la fase di incubazione stabilendo la quantità da utilizzare per la reazione (50 µl di buffer per ogni 50 µl di campione cellulare) e trasferire questa quantità in una falcon da 15 ml ghiacciata .
- 6) Rimuovere le cellule dall'incubatore e metterle in ghiaccio per 10 minuti
- 7) In una falcon sterile da 15 ml mescolare un uguale volume di Rapid Transit Buffer (50 µl) e di cellule (50 µl, tutto previamente raffreddato in ghiaccio). Mettere a incubare in ghiaccio per 10-30 minuti, facendo attenzione che non congelino.

A questo punto le cellule sono competenti e pronte per ricevere il plasmide.

Quindi abbiamo portato avanti la trasformazione degli *E.coli* BL21 con il plasmide pRSET B/S7 estratto da *E.coli* DH5α precedentemente trasformati con lo stesso plasmide.

- 1) Per ogni reazione di trasformazione mettere 100 µl di cellule competenti in una falcon sterile da 15 ml previamente raffreddata in ghiaccio.
- 2) Aggiungere il plasmide ai 100µl di soluzione (quantità di plasmide da aggiungere: da 100 pg a 10 ng contenuto massimo in 5 µl di soluzione). Mescolare gentilmente (non vortexare nè tritare) e mettere a incubare in ghiaccio per 10-30 minuti.

- 3) Preriscaldare il Recovery Medium a 37°C. Aggiungere 900 µl del Recovery Medium alla reazione di trasformazione e mettere a incubare a 37°C per 1 ora a 250 RPM.
- 4) Piastrare in LB + cloramfenicolo 35µg/ml + ampicillina 50 µg/ml (fai ~400 µl per piastra) e incubare a 37°C O/N in incubatore.
- 5) Selezionare una colonia in 4 ml di LB + cloramfenicolo 35µg/ml + ampicillina 50 µg/ml e mettere a incubare a 37°C O.N a 250 RPM.
- 6) Con 3 ml della coltura fare l'estrazione plasmidica (protocollo pag 67-68).

### ***2.27 Digestione di controllo del plasmide di espressione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica.***

Per la reazione di digestione del plasmide pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da *E.coli* BL21 trasformati, sono stati utilizzati gli enzimi *EcoRI* e *BamHI*. La reazione di digestione è stata allestita come segue:

|                         |              |
|-------------------------|--------------|
| 10X buffer <i>EcoRI</i> | 3 µl         |
| 100X BSA                | 0, 3µl       |
| <i>BamHI</i>            | 0.2µl        |
| <i>EcoRI</i>            | 0.2µl        |
| DNA                     | 1 µg         |
| H <sub>2</sub> O        | fino a 30 µl |

Incubare la reazione 2 ore a 37° C e controllare su gel di agarosio all'1%.

Sequenziare il plasmide.

## ***2.28 Induzione pilota e monitoraggio dell'espressione della proteina VP7.***

Dopo avere accertato con estrazione plasmidica e digestione enzimatica l'avvenuta trasformazione di *E.coli* BL21 con il plasmide pRSET B/S7, è stata indotta l'espressione della proteina VP7 di BTV.

I reagenti necessari per la reazione sono:

### **SOB. Per un litro:**

A 950 ml di H<sub>2</sub>Omq aggiungere:

20 gr di tryptone

5 gr di Yeast Extract

0,5 gr di NaCl

186 mg di KCl

- 1) mischiare la soluzione fino a farla diventare omogenea
- 2) portare il pH a 7,0 con NaOH 5N.
- 3) portare il volume a 1000 ml e sterilizzare in autoclave.
- 4) dopo aver autoclavato, aggiungere 10 ml di Mg<sup>2+</sup> 1M sterile (es: 10 ml di MgCl<sub>2</sub> 1M sterile oppure 10 ml di MgSO<sub>4</sub> 1M sterile).

### **IPTG:**

Per 10 ml di una soluzione 100 mM:

dissolvi 0.24 gr di IPTG in H<sub>2</sub>Omq sterile. Porta il volume finale a 10 ml e sterilizza con filtro da 0.22 µm. Non autoclavare.

Per l'induzione dell'espressione abbiamo poi proceduto come segue:

- 1) Scongellare un vial di BL21/pRSET B/S7 e piastrarne 100  $\mu$ l in LB agar con ampicillina (50 $\mu$ g/ml) e cloramfenicolo (35 $\mu$ g/ml). Piastrare anche *E.coli* BL21 non trasformati come controllo negativo.
- 2) Selezionare una colonia e inocularla in 2 ml di SOB contenente ampicillina (50 $\mu$ g/ml) e cloramfenicolo (35 $\mu$ g/ml). Far crescere a 37° C O.N.
- 3) Il giorno dopo, prelevare una quantità di coltura (~250 $\mu$ l cioè in rapporto di 1:100 con il volume del terreno) e inocularla in 25 ml di terreno liquido in modo che la OD 600 sia pari a 0,1. Per raggiungere questa assorbanza noi abbiamo aggiunto altri 500  $\mu$ l di starter.
- 4) Far crescere la coltura in rapida oscillazione a 37° C fino a raggiungere una OD 600 di 0.4-0.6. Per gli *E.coli* non trasformati sono state necessarie circa due ore e mezzo, per quelli trasformati circa 6 ore.
- 5) Prelevare 1 ml di cellule prima di indurre con IPTG, centrifugare a 4.000 x g per 10 minuti il campione e aspirare il surnatante. Conservare il pellet (e il surnatante) in freezer a -20° C. Questo sarà il controllo al tempo 0.
- 6) Aggiungere IPTG (preparato fresco) ad una concentrazione finale di 0.1 mM (250  $\mu$ l di IPTG 100 mM in 25 ml di coltura) e continuare a far crescere le cellule.
- 7) Dopo 1 ora di incubazione, prelevare 1 ml di campione, centrifugare come descritto nello step 5, aspirare il surnatante e conservare il pellet (e il surnatante) in freezer a -20° C. Continuare a prelevare 1 ml di campione ogni ora per 5 volte.

## ***2.29 Frazionamento in tampone fosfato dei pellet cellulari.***

In seguito all'induzione con IPTG, ognuno dei 5 pellet cellulari ottenuti è stato risospeso in 100 µl di 20 mM phosphate buffer a pH neutro e immerso in azoto liquido e subito dopo a 42°C per 10 minuti.

Questa operazione è stata ripetuta per altre due/tre volte e i campioni sono poi stati centrifugati per 10 minuti a massima velocità a 4° C per ottenere un pellet di proteine insolubili.

Il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova provetta. A 100 µl di surnatante è stato aggiunto un volume uguale di 2X Laemmli sample buffer (Tris HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo, b-mercaptoetanol 5%). Il pellet invece è stato risospeso in 100 µl di 1X SDS-PAGE sample buffer.

I campioni sono stati incubati per 5 minuti a 95°C, e 10 µl di campione contenente il pellet e 10 µl di campione contenente il surnatante sono stati caricati su un gel di poliacrilammide e sottoposti a SDS-PAGE.

### ***2.30 Elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE).***

I campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 10% preparati con acrilamide-bisacrilammide 30% in rapporto 29:1 in Tris HCl 20 mM a pH 8,8, SDS 10%, APS 10% e TEMED. Lo stacking gel è stato preparato utilizzando gli stessi reagenti del running gel ma con Tris HCl 20 mM pH 6,8. La corsa è stata condotta per circa 250mA per un'ora con l'apparato MiniProtean Tetra Cell della BioRad (Figura 33).



Figura 33: Apparato per l'elettroforesi monodimensionale (MiniProtean Tetra Cell, BioRad).

La colorazione dei gel è stata effettuata utilizzando la colorazione con Coomassie Brilliant Blue.

#### **Colorazione con Coomassie Brilliant Blue.**

Il gel è stato lavato in acqua mQ e fissato per circa 1 ora in metanolo 50%, acido acetico 10% e Coomassie Brilliant Blue R 250 0,2%. In seguito il gel è stato messo in destaining solution (40% metanolo, 10% acido acetico) a decolorare, fotografato mediante scannerizzazione e quindi conservato in acqua mQ.

### ***2.31 Espressione della VP7 in E.coli BL21.***

Una volta accertato il tempo ottimale per l'espressione della proteina, l'induzione proteica è stata ripetuta inoculando uno starter di BL21/pRSET B/S7 in 50 ml di SOB antibiotato in modo che quest'ultimo avesse una OD600 di 0,1, e la coltura è stata fatta crescere a 37°C in oscillazione a 225 RPM, sino ad assorbanza di 0,4-0,6 OD600 (ottenuta più o meno dopo 5 ore in crescita).

È stato quindi aggiunto IPTG preparato fresco ad una concentrazione finale di 1mM (aggiungere 500 µl di IPTG 100 mM in 50 ml di coltura ), la coltura è stata incubata a 37°C a 225 RPM fino al tempo ottimale determinato nella pilot expression (stabilita con prelievi fatti ad intervallo di 1h per 5h), ed i batteri sono stati raccolti al T3.

### ***2.32 Purificazione della proteina VP7 con il kit ProBond™ Purification System (Invitrogen).***

La purificazione della proteina è stata condotta il kit ProBond™ Purification System (Invitrogen). Essendo la proteina insolubile la purificazione è stata fatta utilizzando il protocollo in condizioni denaturanti. Si è proceduto come segue.

#### ***Preparazione del Bacterial cell lysate:***

- 1) Equilibrare il Guanidinium Lysis Buffer, pH 7,8 a 37°C.
- 2) Raccogliere le cellule da una coltura di 50 ml centrifugando a 4000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 3) Risospendere il pellet cellulare in 8 ml del Guanidinium Lysis Buffer dello step 1.
- 4) Mettere le cellule in oscillazione lenta per 5-10 minuti a temperatura ambiente per garantire la lisi cellulare.
- 5) Sonicare il lisato cellulare in ghiaccio per 3 volte con impulsi di 5 secondi ognuno ad alta intensità.
- 6) Centrifugare il lisato a 3000 x g per 15 minuti per pellettare i detriti cellulari. Trasferire il surnatante in una nuova provetta.
- 7) Rimuovere 5µl del lisato per fare un SDS-PAGE. Conservare il lisato rimanente in ghiaccio o a -20°C. Procedere con il protocollo denaturante.

#### ***Purificazione in condizioni denaturanti:***

Prima di cominciare:

Prelevare 10 ml di Denaturing Wash Buffer (pH 6,0) fornito con il kit, mescolare e aggiustare il pH a 5,3 usando HCl. Utilizzare questo buffer nello step 5 della purificazione.

Controllare il pH degli altri buffers prima di cominciare, poiché dal momento che contengono urea il loro pH può aumentare.

### **Preparazione della ProBond™ Column**

Quando si prepara la colonna, assicurarsi che il tappo a scatto alla sua estremità inferiore rimanga intatto.

Per preparare la colonna:

- 1) Risospendere la ProBond™ resin nella sua bottiglia con ripetute inversioni e colpetti gentili.
- 2) Trasferire 2 ml della resina in una 10-ml Purification Column fornita con il kit. Lasciar sedimentare completamente la resina per gravità (in 5-10 minuti) o pellettare centrifugando a bassa velocità (800 x g per 1 minuto). Aspirare il surnatante gentilmente.
- 3) Aggiungere 6 ml di acqua distillata sterile e risospendere la resina con gentili inversioni, tappando la colonna.
- 4) Far sedimentare la resina per gravità o centrifugando come descritto nello step 2. Aspirare il surnatante gentilmente.
- 5) Per purificazione in condizioni denaturanti, aggiungere 6 ml di Denaturing Binding Buffer.
- 6) Risospendere la resina con gentili inversioni, tappando la colonna.
- 7) Far sedimentare la resina per gravità o centrifugando come descritto nello step 2. Aspirare il surnatante gentilmente. Ripetere gli steps 5-6-7.

### ***Fasi della purificazione:***

- 1) Aggiungere 8 ml di lisato preparato in condizioni denaturanti ad una Purification Column preparata come descritto sopra.
- 2) Mettere in gentile agitazione per 15-30 minuti a temperatura ambiente (usando un cerchio ruotante) per far risospendere la resina nella soluzione lisata. Lasciar sedimentare completamente la resina per gravità o centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare con attenzione il surnatante.
- 3) Lavare la colonna con 4 ml di Denaturing Binding Buffer (fornito con il kit) per risospendere la resina e oscillare per 5 minuti. Far sedimentare la resina per gravità o centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare con attenzione il surnatante. Mettere il surnatante a 4°C per il successivo SDS-PAGE di controllo. Ripetere questo step un'altra volta.
- 4) Lavare la colonna con 4 ml di Denaturing Wash Buffer, pH 6,0 (fornito con il kit) per risospendere la resina e oscillare per 5 minuti. Far sedimentare la resina per gravità o centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare con attenzione il surnatante. Recuperare il surnatante a 4°C per il successivo SDS-PAGE. Ripetere questo step un'altra volta.
- 5) Lavare la colonna con 4 ml di Denaturing Wash Buffer, pH 5,3 (preparato in precedenza) per risospendere la resina e far oscillare per 5 minuti. Far sedimentare la resina per gravità o centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare con attenzione il surnatante. Recuperare il surnatante a 4°C per l' SDS-PAGE. Ripetere questo step un'altra volta.
- 6) Bloccare la colonna in posizione verticale e togliere il tappo dall'estremità inferiore della colonna. Eluire la proteina aggiungendo 5 ml di Denaturing Elution Buffer (fornito con il kit). Raccogliere frazioni da 1 ml.

Controllare gli eluati su un SDS-PAGE al 10%.

### ***2.33 Purificazione ottimizzata su colonna impaccata mediante cromatografia di affinità con i reagenti del kit ProBond™ Purification System.***

Dal momento che il grado di purificazione ottenuto con il precedente protocollo non era ottimale si è deciso di purificare la proteina mediante cromatografia di affinità su colonna impaccata procedendo come segue:

- 1) Mettere 8 ml di resina nella colonna. Appoggiare la resina alle pareti della colonna e farla scendere piano piano. Far sedimentare la resina per gravità.
- 2) Lavare abbondantemente la resina con H<sub>2</sub>O mQ.
- 3) Versare molto lentamente 60 ml di Denaturing solution sulle pareti e farla scendere pian piano.
- 4) Risospendere 500µl di lisato in 7,5 ml di Denaturing solution e metterli nella colonna. Far scendere per gravità. Recuperare l'eluato e riversarlo all'interno della colonna. Ripetere questa operazione in tutto 5 volte.
- 5) Lavare con 50 ml di Denaturing Binding Buffer.
- 6) Lavare con 50 ml di Wash Buffer a pH 6,0 (cerchiamo di abbassare lentamente il pH).
- 7) Lavare con 50 ml di Wash Buffer pH 5,3.
- 8) Eluire con il Buffer denaturante di eluizione pH 4,0. Utilizzarne 20 ml raccogliendolo in frazioni da un ml ognuno.

Controllare gli eluati su un SDS-PAGE al 10%.

## ***2.34 Spettrometria di massa.***

### ***Preparazione del campione***

L'operazione preliminare da effettuare per l'analisi mediante spettrometria di massa consiste nell'escindere dal gel le bande di interesse e sminuzzarle. Allo scopo di allontanare il colorante, si effettuano dei lavaggi aggiungendo alternativamente acetonitrile (ACN) e ammonio bicarbonato ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 50mM pH 8,0, fino a ricoprire i frammenti.

I lavaggi sono stati ripetuti 3 volte. Dopo l'ultimo lavaggio, i campioni sono stati completamente disidratati in ACN e quindi è stato eliminato il surnatante.

Le bande proteiche sono state quindi sottoposte a riduzione ed alchilazione delle cisteine.

Per la riduzione i frammenti di gel sono stati rigonfiati con DTT 10 mM in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM pH 8,0 per 45 min a 56°C; in seguito i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente. Dopo aver rimosso l'eccesso di riducente, è stato aggiunto ACN, le provette sono state vortexate e dopo qualche minuto è stato rimosso il surnatante. Per l'alchilazione è stata aggiunta velocemente iodoacetammide 55mM in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM pH 8,0, incubando i campioni per 30 min al buio. Sono stati effettuati ulteriori lavaggi con ACN e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , come descritto in precedenza.

A questo punto a tutte le bande, ormai decolorate, è stata aggiunta la tripsina, in soluzione con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM pH 8,0, avente una concentrazione 10 ng/  $\mu\text{l}$  ( per una bandina mediamente colorata si aggiungono 10  $\mu\text{l}$  per banda). La tripsina idrolizza il legame peptidico, liberando i peptidi che al C-ter recano residui di lisina o arginina, eccetto quando questi amminoacidi sono seguiti da prolina (K-P e R-P). I campioni sono stati dapprima incubati in ghiaccio per 1-2 ore, al fine di rigonfiare il gel con la soluzione enzimatica in condizioni sfavorevoli all'autodigestione e successivamente lasciati a 37°C O.N.

Per l'estrazione dei peptidi, i campioni sono stati centrifugati alla massima velocità per pochi secondi ed è stato recuperato il surnatante, contenente la miscela di idrolisi. Ai campioni è stato quindi aggiunto ACN, e le provette sono state vortexate e incubate per 15 minuti a TA. Dopo aver centrifugato, sono stati recuperati gli estratti, riuniti ai rispettivi surnatanti e i campioni sono stati acidificati, al fine di bloccare la reazione di idrolisi.

### ***Analisi delle miscele mediante MALDI-TOF***

Gli spettri di massa sono stati acquisiti su uno strumento MALDI micro (Waters, Micromass) costituito da una sorgente MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) equipaggiata con un analizzatore TOF (*Time Of Flight*) in modalità reflectron. I peptidi sono stati miscelati con un uguale volume di acido  $\alpha$ -ciano-4 idrossicinnamico come matrice (10 mg/ml in acetonitrile/0.2% TFA (70:30, v/v)), applicati alla piastra metallica per i campioni, e asciugati all'aria. La calibrazione di massa è stata condotta usando il mix standard fornito dal produttore.

I valori misurati, riportati come masse monoisotopiche ( $MH^+_{mon}$ ), sono stati inseriti nel programma di ricerca MASCOT (Matrix Science) con il metodo del *peptide mass fingerprinting* ed usati per l'identificazione della proteina.

### 2.35 Immunoblotting.

I gel sottoposti a separazione elettroforetica sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa per l'analisi degli antigeni. Il trasferimento è stato condotto con l'apparato Mini-trans blot della BioRad (Figura 34).



Figura 34: Apparato per l'immunoblotting (Mini TransBlot Cell, BioRad).

In breve, il gel è stato inserito in un sandwich composto da due fogli di carta 3M e due spugne disponendo un foglio di nitrocellulosa all'anodo e le proteine sono state trasferite sottoponendole a 250 mA per 1 ora. Dopo il trasferimento la membrana è stata colorata con rosso Ponceau (Sigma).

La membrana di nitrocellulosa è stata quindi bloccata con PBS-Tween 20 allo 0,05% (TPBS) addizionato con Skim milk al 5% (blocking solution) per un'ora. La membrana è stata lavata per 5 min in TPBS ed è stata incubata con l'anticorpo primario, rappresentato da sieri di pecore vaccinate contro diversi sierotipi di BTV diluiti 1:100 in TPBS e skim milk 2% (TPBS-M), per 1 ora oppure overnight a 4°C. La membrana è stata lavata 5 volte per 5 min con TPBS e quindi incubata per 1 ora con anticorpi anti-pecora coniugati con perossidasi 1:50.000 in TPBS-M. Dopo altri 5 lavaggi da 5 min con TPBS, la membrana è stata lavata per 5 min con PBS. Infine, è stata incubata con substrato per la rivelazione chemiluminescente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce) e l'immagine è stata acquisita su lastra.

### **2.36 ELISA.**

La VP7 purificata è stata precipitata con acetone freddo, incubata per 30 minuti a  $-20^{\circ}$  e centrifugata a  $10.000 \times g$  per 20 minuti a  $4^{\circ} C$ . I residui di acetone sono stati eliminati con lo speed vacuum. Il pellet è stato risospeso in PBS ad una concentrazione di  $100 \mu g/ml$  e lasciato in frigo qualche ora per favorire la solubilizzazione. In pozzetti di una piastra ELISA maxisorp (NUNC) sono stati dispensati  $50 \mu l$  di due diluizioni dell'antigene ( $50 ng$  e  $5 ng$  per pozzetto), e la piastra è stata lasciata asciugare a T ambiente. I pozzetti sono stati bloccati con  $250 \mu l$  di T-PBS e BSA al 3% per un'ora. Sono stati quindi depositati  $100 \mu l$  di siero di pecora, sia in singolo (diluizioni 1 a 100 e diluizioni 1 a 500) che in pool (diluizioni 1 a 100 e diluizioni 1 a 500) e la piastra è stata incubata per un'ora. I sieri erano stati ottenuti da pecore vaccinate contro diversi sierotipi di BTV tra il 2000 e il 2007. Si è quindi proceduto con 5 lavaggi utilizzando T-PBS e in seguito con l'aggiunta per un'ora dell'anticorpo secondario anti-sheep coniugato con perossidasi (diluizione 1 a 50.000). Come controlli negativi sono stati usati : 1) un cocktail di proteine MSP4 (anaplasma) e P48 (mycoplasma), e 2) PBS. Dopo i lavaggi a tutti i pozzetti è stato aggiunto un substrato cromogeno (Sigma Peroxidase ELISA Substrate) ed è stata letta l'assorbanza nei pozzetti a  $650 nm$  ogni 15 min per 1 h.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA.

### 2.37 Clonaggio S7 in piante.

Il gene S7 è stato inserito nel vettore di clonaggio per piante pCR 8.

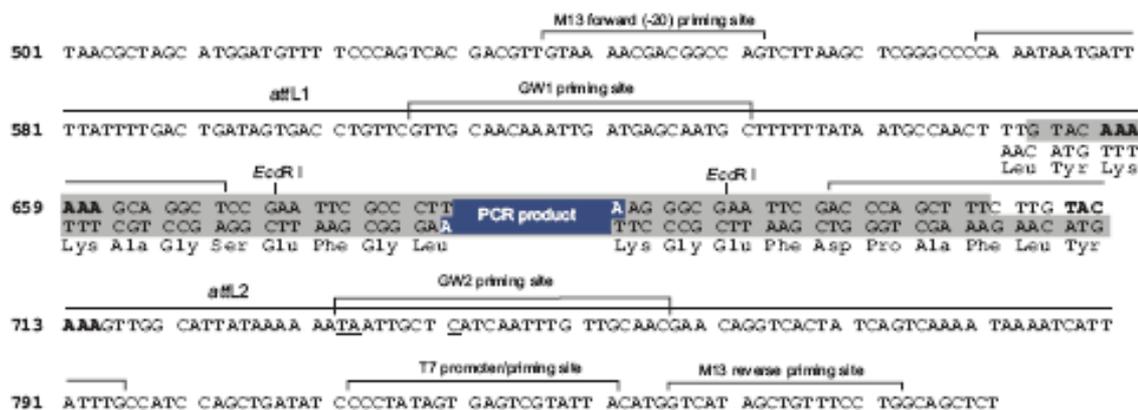
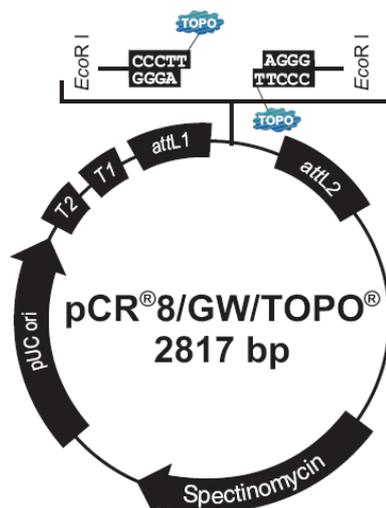


Figura 35: Mappa e regione multipla di clonaggio del plasmide pCR 8.

Il gene S7 da inserire nel plasmide è stato ottenuto tramite amplificazione dal cDNA, dal plasmide pCR 2.1/S7 non digerito diluito 1 a 100, e dal plasmide digerito, utilizzando la GoTaq e il seguente protocollo di temperature:

- |                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| 1) Denaturazione iniziale | 95°C, 2 minuti         |
| 2) Denaturazione          | 95°C, 1 minuto         |
| 3) Annealing              | 50°C, 1 minuto         |
| 4) Estensione             | 72°C, 1 minuto e mezzo |

Passaggi dal 2 al 4 ripetuti per 35 cicli

- |                      |                |
|----------------------|----------------|
| 5) Estensione finale | 72°C, 5 minuti |
|----------------------|----------------|

L'amplificato è stato purificato su gel di agarosio all'1% con il Quiaquick Gel Extraction kit e utilizzato per il clonaggio nel pCR 8.

**Ligation** dell'inserto entro il vettore pCR 8 :

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Prodotto di PCR fresco | 4 $\mu$ l |
| Soluzione salina       | 1 $\mu$ l |
| TOPO vector            | 1 $\mu$ l |
| Totale                 | 6 $\mu$ l |

Il campione è stato tenuto 30 minuti a temperatura ambiente e poi utilizzato per la trasformazione di *Escherichia coli*.

### **2.38 Trasformazione di *E.coli* TOP10 con il plasmide pCR8/S7.**

Il protocollo utilizzato è quello a pag 66. In questo caso però l' antibiotico- resistenza del vettore è alla spectinomicina. Alle piastre e al terreno liquido di LB si è quindi aggiunta spectinomicina 100µg/ml. Una volta ottenute le colonie su piastra queste sono state selezionate, messe a crescere in LB liquido+spectinomicina 100µg/ml e il giorno dopo si è proceduto con l'estrazione plasmidica ( protocollo a pagina 67-68).

### **2.39 Digestione di controllo del plasmide pCR8/S7.**

Il plasmide è stato digerito con l'enzima *EcoRI*, i cui siti di restrizione nella sequenza plasmidica fiancheggiano da entrambi i lati l'inserto. Mix di reazione:

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| 10X buffer EcoRI   | 3 µl         |
| <i>EcoRI</i>       | 0.2 µl       |
| DNA                | 1 µg         |
| H <sub>2</sub> OMQ | fino a 30 µl |

Le reazioni sono state incubate per due ore a 37° C in bagnetto termostato e controllate su gel di agarosio all'1%. Una volta verificata la presenza dell'inserto si è proceduto con il sequenziamento del plasmide pCR 8/S7 per verificare che l'inserzione fosse avvenuta correttamente e che la sequenza del gene S7 non presentasse mutazioni.

## ***2.40 Ricombinazione plasmidica dell'entry clone pCR 8/S7 con il Destination***

### ***Vector.***

Dopo aver generato l'entry clone (pCR 8/S7) si è proceduto con la ricombinazione plasmidica per trasferire il gene di interesse in un vettore di destinazione (pGreen PVX), in modo da creare un clone di espressione. La ricombinazione è stata fatta con il LR clonase II Enzyme mix (*Invitrogen 11791-020*).

Il mix di reazione per la ricombinazione tra il pCR 8/S7 e il destination vector (DV) è il seguente:

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| pCR 8 (entry clone) | circa 130 ng     |
| DV                  | 150 ng           |
| TE buffer           | a volume di 8 µl |

Quindi agli 8 µl di reazione sono stati aggiunti 2 µl di enzima e lasciati a 25° C O.N. Il giorno dopo è stato aggiunto 1 µl di proteasi k alla reazione che è poi stata lasciata a 37° C per 10 minuti.

## ***2.41 Trasformazione di Escherichia coli con il clone di espressione.***

Il protocollo utilizzato è quello a pag 66. In questo caso però nel vettore è presente il gene per l' antibiotico-resistenza alla kanamicina. Per le piastre e il terreno liquido si è quindi utilizzata kanamicina 100µg/ml. Una volta ottenute le colonie su piastra queste sono state selezionate, messe a crescere in LB liquido+kanamicina 100µg/ml e il giorno dopo si è proceduto con l'estrazione plasmidica ( protocollo a pagina 67-68).

#### ***2.42 Controllo della presenza dell'inserto nel clone di espressione.***

Il plamide ricombinato è stato utilizzato come template per l'amplificazione del gene S7. I primers utilizzati sono i VP7 corsican F ed R già utilizzati precedentemente per l'amplificazione del gene S7, e il protocollo delle temperature è il seguente:

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| 1) Denaturazione iniziale                 | 95° C, 2 minuti         |
| 2) Denaturazione                          | 95° C, 1 minuto         |
| 3) Annealing                              | 62° C, 1 minuto         |
| 4) Estensione                             | 72° C, 1 minuto e mezzo |
| Passaggi dal 2 al 4 ripetuti per 35 cicli |                         |
| 5) Estensione finale                      | 72° C, 5 minuti         |

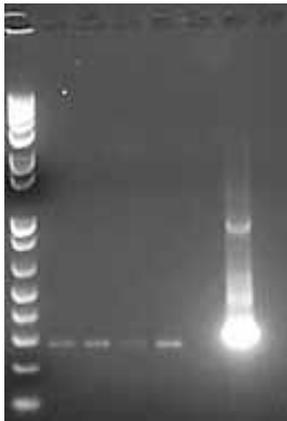
Il prodotto di PCR è stato controllato su gel di agarosio al 2% per verificare l'avvenuta amplificazione.

### **3. RISULTATI.**

#### **3.1 Determinazione del sierogruppo.**

Per la determinazione del sierogruppo di appartenenza del DNA virale isolato su colture cellulari si è proceduto all'amplificazione di un tratto della sequenza del gene M6 del BTV che codifica per la proteina NS1. Il tratto amplificato ha una lunghezza di 274 bp. L'amplificato è stato caricato su gel di agarosio al 2% e visualizzato alla luce ultravioletta. Il risultato ottenuto si può osservare nella foto sotto.

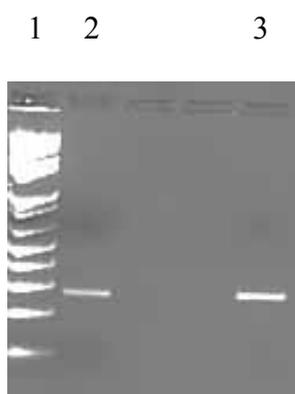
1 2 3 4 5 6 7



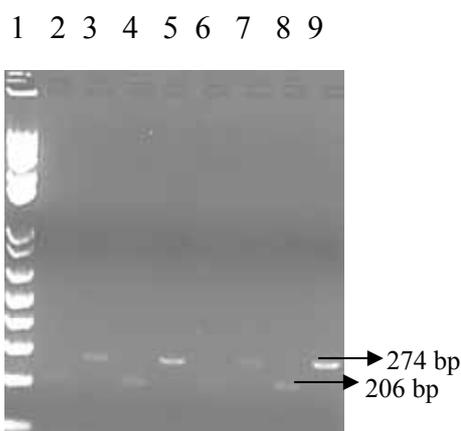
- 1: marker invitrogen 1 Kb plus DNA ladder
- 2: amplificato M6, di 274 bp, dal cDNA del ceppo di campo.
- 3: amplificato M6, di 274 bp, dal cDNA del BTV di referenza.
- 4: amplificato M6, di 274 bp, dal cDNA del ceppo di campo.
- 5: amplificato M6, di 274 bp, dal cDNA del BTV di referenza.
- 6: campione negativo, H<sub>2</sub>Omq.
- 7: positivo del kit di retrotrascrizione di 319 bp.

### 3.2 Analisi di restrizione degli amplificati della NS1

Gli amplificati dell'M6 sono stati purificati e sottoposti alla reazione di digestione con *HpaII*. L'enzima taglia l'amplificato del BTV di campo in due parti; una di 68 bp e l'altra di 206 bp, mentre non taglia l'amplificato del BTV di riferimento che non ha nella sua sequenza il sito di taglio per questo enzima. Nella foto raffigurante la digestione del ceppo di campo avremo quindi due bande (anche se quella corrispondente alle 68 bp non è visualizzabile), mentre nella foto raffigurante la digestione del ceppo di riferimento una sola banda di 274 bp.



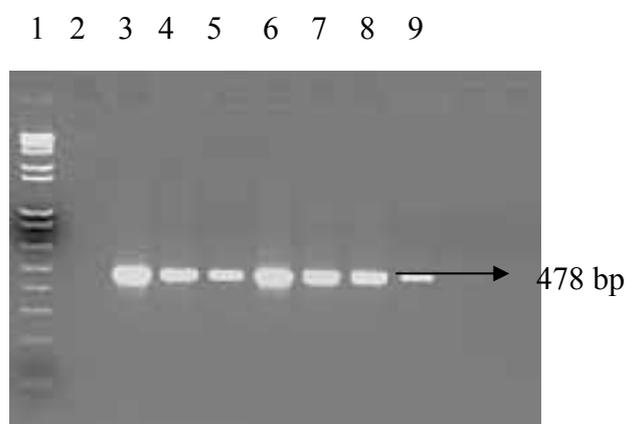
1: marker invitrogen 1 kb plus DNA ladder.  
2: amplificato non digerito M6 del ceppo di riferimento, 274bp.  
3: amplificato del ceppo di riferimento, digerito, che non ha il sito di taglio per l'enzima *HpaII* e non viene tagliato. L'altezza della banda rimane a 274 bp.



1: marker invitrogen 1 kb plus DNA ladder.  
2: amplificato M6 del ceppo di campo digerito con *HpaII*. Si osserva una banda all'altezza delle 206 bp.  
3: amplificato M6 del ceppo di campo non digerito.  
4: amplificato M6 del ceppo di campo digerito con *HpaII*.  
5: amplificato M6 del ceppo di campo non digerito.  
6: amplificato M6 del ceppo di campo digerito con *HpaII*.  
7: amplificato M6 del ceppo di campo non digerito.  
8: amplificato M6 del ceppo di campo digerito con *HpaII*.  
9: amplificato M6 del ceppo di campo non digerito.

### 3.3 Determinazione del sierotipo.

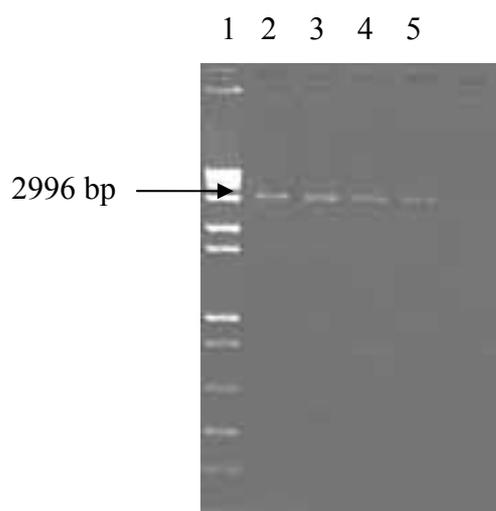
Per la determinazione del sierotipo è stata allestita una reazione di amplificazione per una parte del gene L2 del sierotipo 2 di BTV utilizzando dei primers disegnati sulla sequenza del ceppo corsicano. La banda corrispondente all'amplificato è di 478 bp. Il ceppo di BTV da noi isolato dai campioni di sangue prelevati nelle pecore sintomatiche durante l'epidemia di BT del 2000-2001 appartiene quindi al sierotipo 2 del virus.



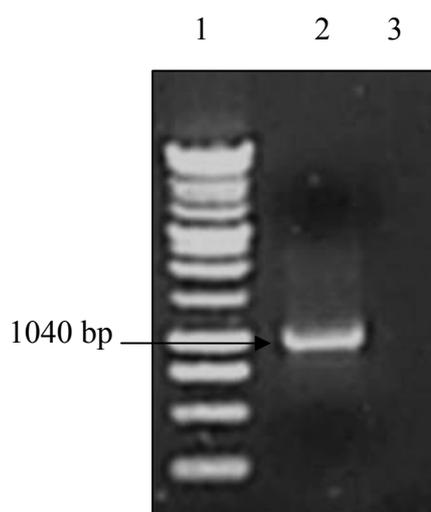
- 1: marker invitrogen 1 kb plus DNA ladder.
- 2: campione negativo, H<sub>2</sub>Omq.
- 3: L2 corso, amplificato dal DNA del ceppo di campo. Altezza della banda: 478 bp.
- 4: amplificato L2 corso di 478 bp.
- 5: amplificato L2 corso di 478 bp.
- 6: amplificato L2 corso di 478 bp.
- 7: amplificato L2 corso di 478 bp.
- 8: amplificato L2 corso di 478 bp.
- 9: amplificato L2 corso di 478 bp.

### 3.4 Amplificazione dei geni L2 e S7.

Con il DNA del ceppo corsicano sono state allestite due reazioni di PCR per amplificare l'intera sequenza del gene L2, codificante la proteina VP2 e quella del gene S7, codificante la proteina VP7. Il segmento L2 è lungo 2996 bp, mentre quello S7 circa 1040 bp.

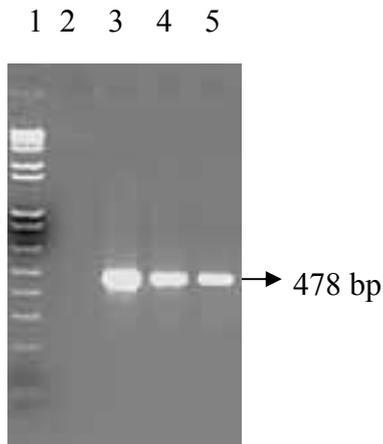


1: marker invitrogen 1 kb plus DNA ladder.  
2: amplificato L2 BTV2 ceppo di campo, 2996bp.  
3: amplificato L2 BTV2 ceppo di campo, 2996bp.  
4: amplificato L2 BTV2 ceppo di campo, 2996bp.  
5: amplificato L2 BTV2 ceppo di campo, 2996bp.



1: Marker promega 1 kb.  
2: Amplificato S7 dal DNA del ceppo di campo, 1040 bp.  
3: campione negativo, H<sub>2</sub>Omq.

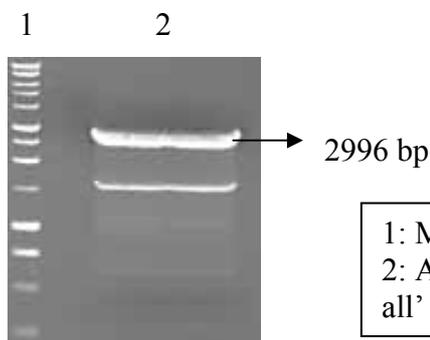
L'amplificato L2 è stato quindi diluito 1:10, 1:100 e 1:1000 e utilizzato come template per l'amplificazione con i primers BTV 2 corso per confermare ulteriormente che il ceppo isolato fosse quello corrispondente al sierotipo 2 corso.



- 1: marker invitrogen 1 kb plus DNA ladder.
- 2: negativo, H<sub>2</sub>Omq.
- 3: amplificato L2 corso, di 478 bp (diluizione 1 a 10).
- 4: amplificato L2 corso, di 478 bp (diluizione 1 a 100).
- 5: amplificato L2 corso, di 478 bp (diluizione 1 a 1000).

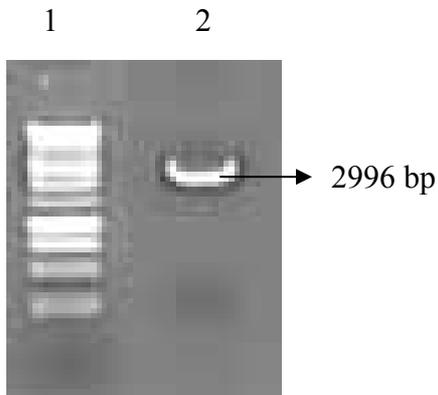
### ***3.5 Purificazione degli amplificati L2 e S7.***

A questo punto gli amplificati del segmento L2 sono stati riuniti e purificati da gel di agarosio all'1% così da ottenere l'amplificato purificato da utilizzare per il clonaggio in pCR2.1.



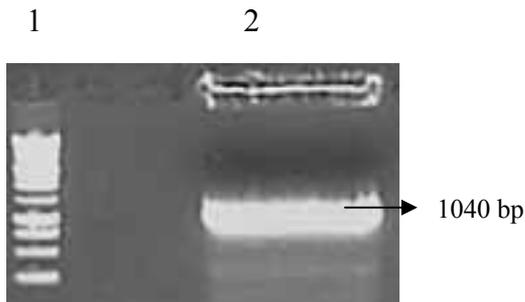
- 1: Marker 1 kb promega.
- 2: Amplificati L2, del ceppo di campo, riuniti e caricati su gel all' 1% per la purificazione.

L'amplificato purificato è stato controllato caricando 2  $\mu$ l del campione su un gel di agarosio all'1%.



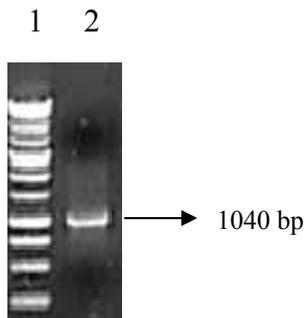
1: Marker 1 Kb promega.  
2: Amplificato purificato del gene L2; controllo dopo purificazione da gel di agarosio.

Anche gli amplificati del segmento S7 sono stati riuniti e purificati da gel di agarosio all'1%.



1: Marker promega 1 kb.  
2: Amplificati del gene S7, riuniti in un unico pozzetto per la purificazione da gel di agarosio all'1%, altezza della banda: 1040 bp.

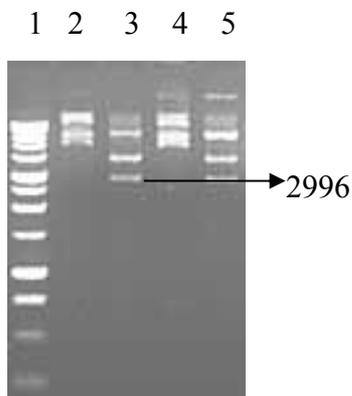
L'amplificato purificato è stato controllato caricandone 2  $\mu$ l su un gel di agarosio all'1%.



1: Marker promega 1 kb.  
2: Amplificato purificato del gene S7; controllo della purificazione su gel di agarosio all'1%.

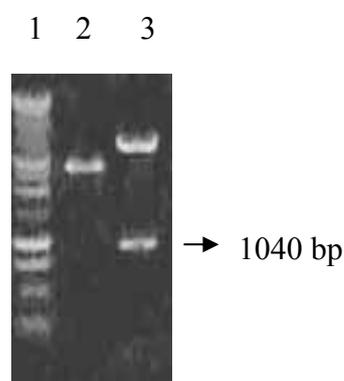
### 3.6 Digestione enzimatica dei vettori ricombinati dopo estrazione plasmidica in miniprep e maxiprep.

Dopo il clonaggio, la trasformazione e l'estrazione plasmidica, i plasmidi pCR 2.1/L2 e pCR 2.1/S7 sono stati sottoposti a digestione con l'enzima di restrizione *EcoRI* (Biolabs 20U/ $\mu$ l). Per quanto riguarda la digestione del plasmide pCR 2.1/L2, i prodotti attesi nella visualizzazione della digestione su gel di agarosio erano due bande, corrispondenti all'inserto L2 di 2996 bp e al plasmide aperto di 3900 bp. Per quanto riguarda il non digerito una banda corrispondente al plasmide vuoto.



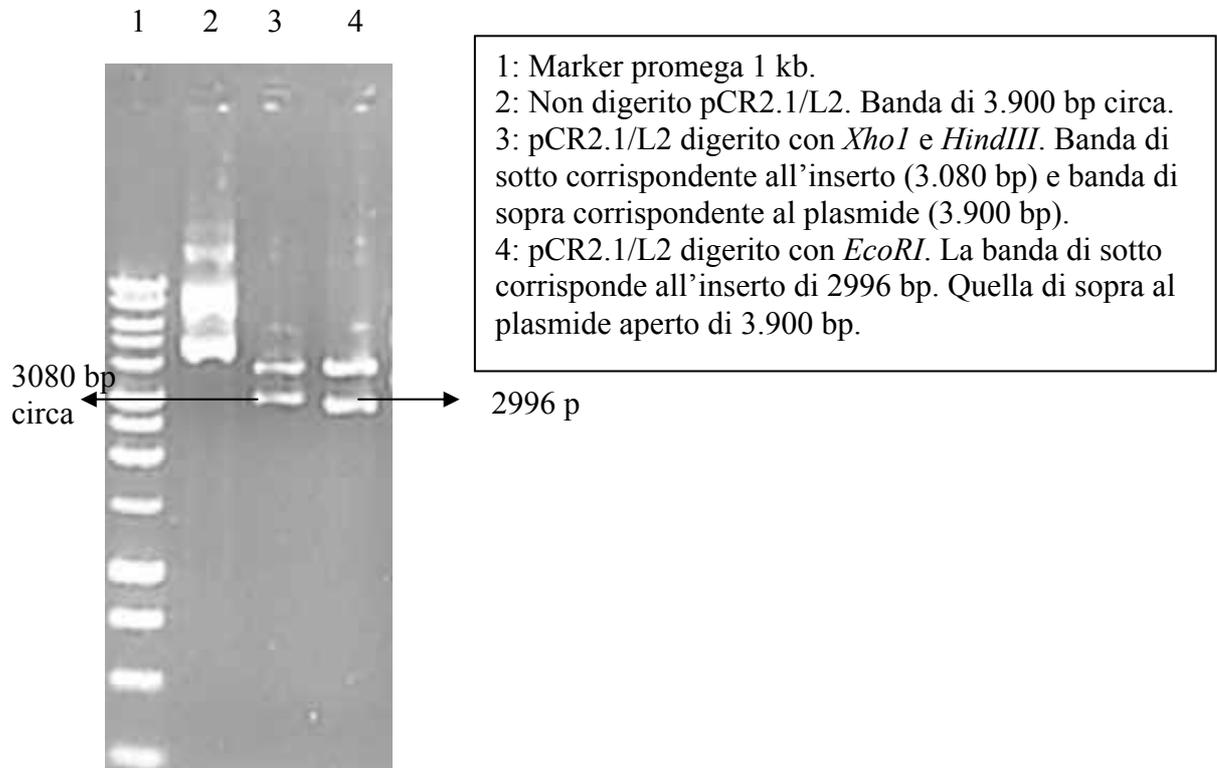
- 1: Marker 1 kb promega.
- 2: Non digerito pCR2.1/L2.
- 3: Digerito pCR2.1/L2 con *EcoRI*. Banda a 2996 bp corrispondente all'inserto L2.
- 4: Non digerito pCR 2.1/L2.
- 5: Digerito pCR 2.1/L2 con *EcoRI*. Banda a 2996 bp.

La digestione del plasmide pCR2.1/S7 con l'enzima *EcoRI* fa evidenziare due bande, una corrispondente all'inserto S7 di circa 1040 bp e una corrispondente al plasmide aperto di 3900 bp. Per il non digerito un'unica banda corrispondente al plasmide vuoto.

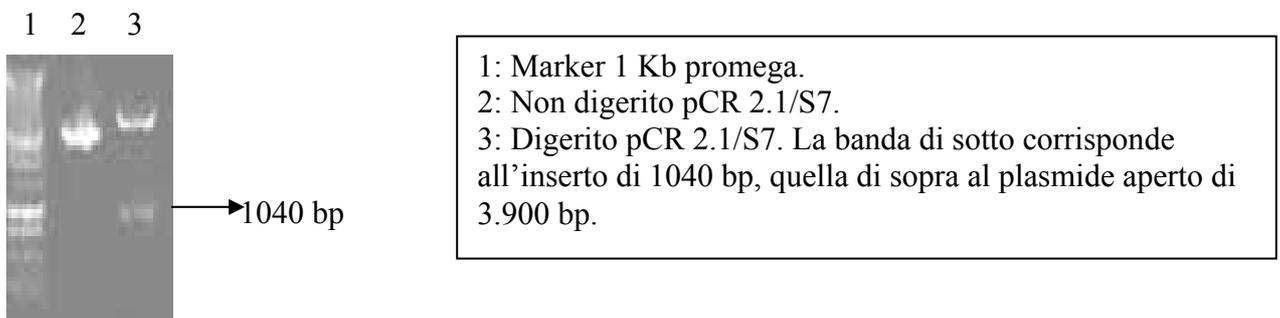


- 1: Marker 1 Kb promega.
- 2: non digerito pCR2.1/S7.
- 3: digerito pCR2.1/S7. La banda bassa corrisponde all'inserto di 1040 bp, quella alta al plasmide aperto di 3900 bp.

Per il pCR2.1/L2 dopo l'estrazione plasmidica in maxiprep è stata allestita una doppia digestione con gli enzimi *XcoI* e *HindIII* e una con *EcoRI*. La doppia digestione dovrebbe risultare in due bande, una di circa 3.080 bp (questi enzimi tagliano più esternamente la sequenza di interesse rispetto a *EcoRI*) e una di 3.900 corrispondente al plasmide aperto.



Il plasmide pCR2.1/S7 dopo estrazione in maxiprep è stato digerito con l'enzima *EcoRI*. Il risultato è quello di due bande, una corrispondente all'inserto S7 di circa 1040 bp e una al plasmide di 3.900 bp.



### 3.7 Sequenziamento del plasmide pCR2.1/L2.

Il plasmide è stato sequenziato per verificare che non ci fossero mutazioni nella sequenza del gene L2. Dal sequenziamento si è visto che il plasmide ha la delezione di una T in posizione 448 che fa saltare la frame (il nostro plasmide ha TTATCTA mentre la sequenza corsicana in quel tratto ha TTATCTTA). In più ci sono tre sostituzioni che risultano in aminoacidi diversi ma che non dovrebbero comportare problemi dal momento che il BTV in coltura muta velocemente.

```
ATG GATGAACTTGGCATTCCGATTTATGGACGTAAC TACCCAGAGCATT TATTTAAAAGGATATGAGTTTTTGATT
AATACCGGCGTGAGATATCCAAGTCAAGGTGGACGTCATGATGTTTCCAAGATTCCTGAGATGTTTGCTTACGAT
ATCAAAGATGAGGGGATACGGGAAGCACTCAAATATATGCCAACACGAAATGATGGGGTGGTCTGCCAAGGATC
GTTGACATTAGCTTGAAGGGATATGATATACGGAAATCAGTTATTGAAGCGAATAAGAGTAACAGCTTCCATACT
GACACAAACTGGGTTCAGTGGATGATTAAGATAGTATGGATCAACAGCCGCTTAAGATATCGATTGACGAGGAA
CATAGCCGGGTGTACTCCCTATTTAATTGTCAAGTGAAGATTGATGCGAAAAAAGCAGATACC TTATCTAACC
ATCTCGAAGCAATTGAAGATGCAGAGAAAGCATGTTTGCACACGAGGGGTCAATTATGTAATCATCTGGCGAGGA
TGGATCTGTTACACGCGGCACAAGAAAT TGGCTATGCAATTAAGCCGACGTATCAGTTAATAGTGCATTCAGAGA
GAGCGTCAACTTCAGATAACTTCGAATTAGGGAGGCAGGATGTAATTACTTTGAGAAGGGGACATAGAATACAAA
TGGGTGACGAAGCGTATACTAAGCTGATGGAACGTTTAGTGAGGTTaACGGTGCaAGGGAATGTGCCGAGAAAGA
TACAAAGTGAGATAGAGCAGCTTGAGGCGATTCGAAC TAGGTGGGCAACTGGCAGATATGATCCAGCTCATATCA
ATTCACAAGATCTGTGTCGGATATTGTCACGCATAGGCAGAAAT TATGTTGGACCAAGAAGCGGAACCGGTTGATG
AAGATAGCTTATCTTTGCGGTTTCAGCGAGCTCTCGATGAGAAGTCCGCTTAACGATTCTGAGAGAAATAAGA
TATTTGAGCCCAAATCGCATAGGAAGGATGAGGATAGGTTCTACGTTTTGTTAGCTATCGCTGCTTCCGACACTT
ACAATTCGAGAATTTGGTGGTCAAATCCGTATCCATGCTTGCGCGGCGGTTGATTGCGGCGGAGACAAAATTAG
GCGATGTTTACTTTACTCTACGATCTTGGTATGACTGGAGTGTTAGAAGTAGCTATGTACC GCGTGAAAGAGAGC
GGGAAACGGGAGAAGTATATATTTAGTAAGATAAACTATTTGATTACGAAGCTGGTCCATCGAGCAAGGTCATAC
ATTGGGAATATCAGTTATATAAACGAGAGCGGGTGGTTACCC TAGAGAGAGGCAATCCTTGTGACTTGTATCCTG
ATGAAGATGATGAAGTTATTTATCACGAAATTTGATGACGCCAAATACTCTGAGATGGTCCGGGAAATTTATAGATG
GTGGATGGAATGATGAGGAATTTAAAATGTATAAGTTACTTCAGGAAAAAGGCAATGTTCTCACAATTTGACTTCG
AAAAGGATACGAAGCTGAATAGTACTTCAGAGGTGGTTTTACC GGATTATTTATGGTAAGTGGATAGTTGCGCCGA
TGTTCAACTCTAAAATGAGAATTAATGAAACGGAGATCGCAACCAAGAAGTGATGATCCCATGATTTAAAAGGA
CGCTCAAACCGATGACTGATGATCCCGTTAAGCTACAGAGATATGCTTTGGCCAGATACTATGATATTCGTCCCG
GACTAATGGGTTCGTTTCGCTAAATAGGACACAGACTCAATCAACATTTGACGCGAAGGTGTCAGAATTTGCCGACT
ATGAAAAGGTGGTGTACCGGTTTGGTGTAAATCAAGAAACCGACAAGACCTTGCCTAACTTTGACTGGACGATACA
TCCTGGAGAAATATCTTTACTTCTTATAGATATATTTGAAGTATCATACTGAGGTTGAAGAGAATCCACAAGAAG
AATTTACTCATCCGAGGATGATTCACAGTTTAAATTC AACGGTAATACATTATCTGATCTGAATCAAACGGTCTG
TTTTCATAGTGGATTATTTGCATGAGAAGCGTAACTATGTACGATCGGTATACGAGGCGAGATACATTACATCTA
GGATAAGGTCTGTACCGGTGCGGCGCGTATGAGTATCCTCGAATTTTATTTCCCAACATTCGCACGCTTGATTT
CGAATGCGCGGGAACCGACTTATGTGAAAGATCTGATGGCGTTGAACTTCTTGCCGTTACTATTCATAGTAGGTG
ATAATATGATATATAAACATAGGCAGTGGTCGATACCATTATTACTGTATACAGACCGAGTGAAGGTGATTCAT
TGGAAGTGGGCTCATCGAACAAATAGACAGGGACTCGTATCCTATCTAGAGTATATGTTCTTTTTTCCATCGTTAG
CTGATCGAACATCTAAGGTGGATGAATCGATGATTAAGGTGTCAAAGGAGGTGGTTAATTACTATATGAAAACAA
CAATATCGGAAGGGGGCGTGAATTTGAAATGTTGTTTCCACCAAGTCATTGCTATATGACATCTATCTCTCATCAG
TGTGCGGTGGTGTGTCGGATGGTGTAGTCTGGTACC TACCGATCACTCATCCATATAAATGTGTAGTCGCTATTG
TGGTGTGCGACGATAGAGTGCCCGCGCGCTTACGTTGTGGTAGATTGAGGTTGCGTTTTCCCTTAAGTGCACAGC
ATTTAAAGGGTATAGTAGTGATTCAAATAAATGAGGAGGGCGGATTTGATGTGTATACAGAGGGGATAGTAACGC
ATAGGGTTTGTAAAGAAAAGTTTACTTAAACATGTATGCGACATTTGTTCTCTCTAAATTTTCATGGGCACGTCTTTG
GAAACGATGAAATGCTAACAAAGTTACTCAATGTATGACCTGCGTG
```

### 3.8 Sequenziamento del plasmide pCR2.1/S7.

Il plasmide pCR2.1/S7 è stato sequenziato per verificare che non ci fossero mutazioni nella sequenza del gene S7. La sequenza corrisponde perfettamente a quella corsicana.

```
ATG G A C A C T A T C G C G G C A A G A G C A C T C A C T G T A A T G C G G G C A T G T G C C A C T T T A C A G G A A G C A A G A A T C G T T T T G  
G A G G C A A A T G T G A T G G A A A T A C T G G G C A T T G C A A T T A A C A G G T A T A A T G G A T T A A C A T T G C G T G G A G T T A C A A T G  
A G A C C C A C A T C A T T G G C G C A A G G A A T G A A A T G T T C T T C A T G T G C T T A G A C A T G A T G C T A T C A G C T G C G G G G A T T  
A A T G T G G G A C C A A T A T C A C C A G A T T A C A C A C A G C A T A T G G C G A C C A T A G G A G T A T T G G C A A C A C C A G A A A T A C C A  
T T C A C G A C T G A G G C A G C G A A T G A G A T C G C T C G C G T T A C G G G T G A G A C T T C A A C A T G G G G A C C T G C A C G C C A A C C G  
T A T G G T T T T T T C T T A G A A A C A G A A G A G G T T A C C A G C C T G G G A G A T G G T T T A T G C G A G C T G C A C A G G C A G T A A C G  
G C T G T T G T G T G T G G G C C C G A C A T G A T A C A A G T A T C G T T G A A C G C A G G G G C G C G A G G A G A T G T A C A A C A A A T G T T T  
C A G G G T C G T A A C G A C C C C A T G A T G A T A T A T C T G G T T T G G A G A A G G A T T G A G A A C T T C G C T A T G C C T C A A G G T A A T  
T C G C A G C A A A C G C T A G C C G G C G T T A C T G T G A G C G T T G G T G G C G T C G A C A T G A G G G C T G G A C G T A T A A T A G C G T G G  
G A T G G T C A G G C T G C G T T A C A A A T T C A T A A C C C G A C A C A G C A G A A T G C T A T G G T T C A G A T T C A G G T A G T T T T T T A C  
A T T T C G A T G G A T A A G A C C T T A A A C C A G T A T C C A G C T C T A A C G G C G G A G A T T T T T A A C G T G T A T A G T T T C A G G G A C  
C A C A C T T G G C A T G G T T T G A G A A C T G C G A T T T T G A A C A G A A C C A C C T T A C C A A A C A T G T T G C C G C C A A T T T T C C C G  
C C A A A C G A T C G A G A T A G C A T C T T A A C C T T A C C T C T A C T G T C T A C T T T A G C A G A T G T G T A T A C T G T C C T T C G A C C C  
G A A T T C G C A A T A C A C G G C G T A A A T C C A A T G C C C G G C C C G C T A A C A C G T G C A A T T G C G C G C C C G C T T A T G T G T A G  
T C C A
```

### 3.9 Amplificazione del gene S7 con primers *NcoI* e *BglII*.

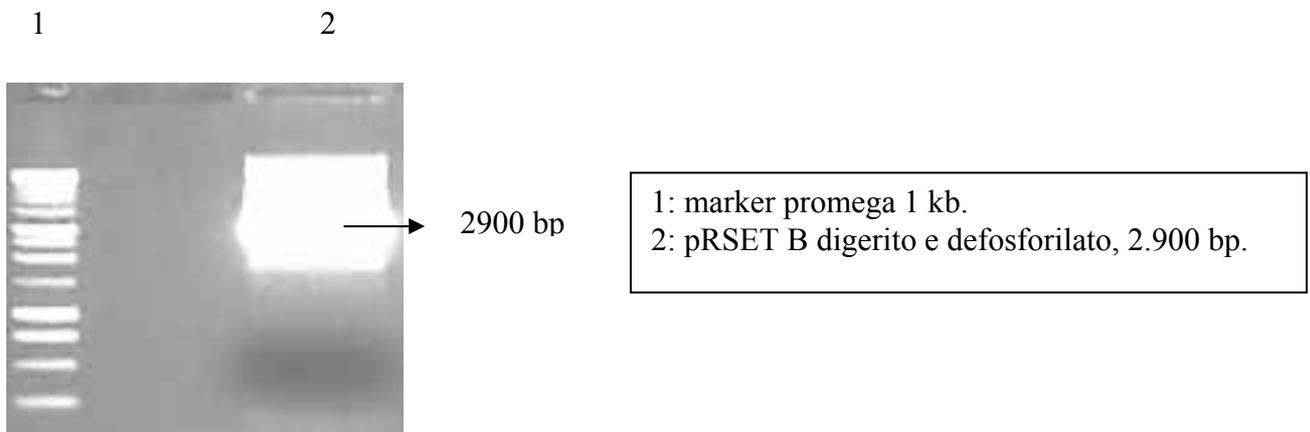
A questo punto il gene S7 è stato amplificato con dei primers contenenti i siti di restrizione per gli enzimi *NcoI* e *BglII*. I campioni di partenza erano il DNA del BTV2 corsicano di campo e il plasmide pCR2.1/S7 non digerito e digerito. Questa amplificazione è necessaria per poter poi inserire l'amplificato nel plasmide di espressione pRSET B.



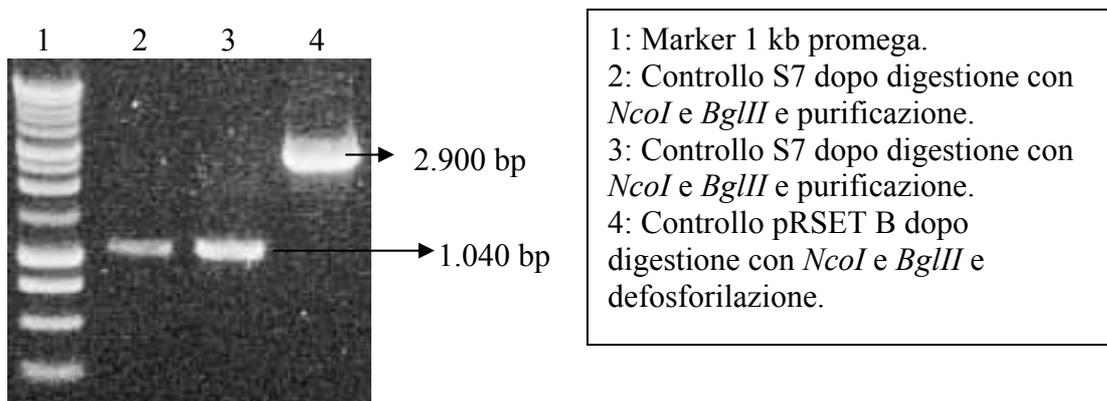
M: marker promega 1 kb  
1-5= amplificato S7 da  
DNA BTV sierotipo 2  
corsicano.  
6-10= amplificato S7 dal  
pCR2.1/S7 non digerito.  
11-12= amplificato  
pCR2.1/S7 digerito con  
*EcoRI*.  
13= negativo della PCR,  
acqua mQ.

### 3.10 Digestione e defosforilazione del plasmide pRSET B e digestione dell'amplificato S7.

Il pRSET B è stato sottoposto alla reazione di digestione con gli enzimi *NcoI* e *BglII* e subito dopo alla reazione di digestione è stato aggiunto il mix per la defosforilazione plasmidica. Quindi la reazione è stata caricata su gel di agarosio all'1% per la purificazione della banda corrispondente da gel.

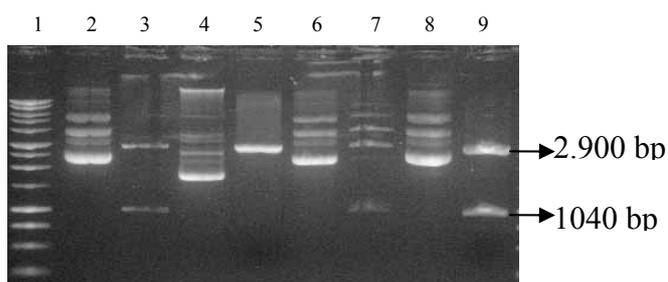


Dopo le digestioni con *NcoI* e *BglII*, la defosforilazione plasmidica e la purificazione dell'amplificato S7 digerito, i campioni S7 e pRSET B sono stati caricati su gel di agarosio per un controllo.



### 3.11 Digestioni di controllo delle miniprep pRSETB/S7.

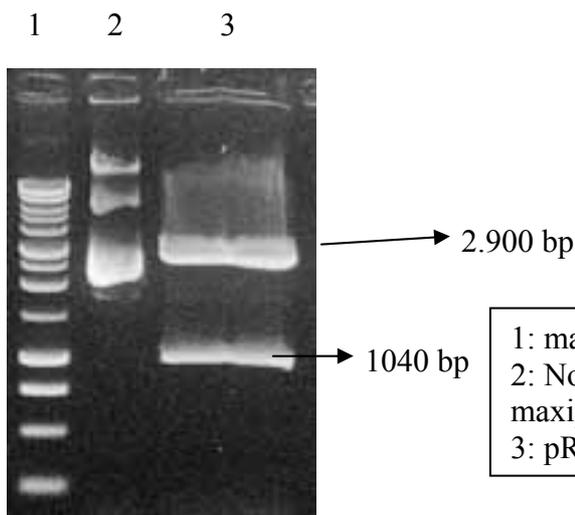
Dopo estrazione plasmidica in miniprep, il pRSET B/S7 è stato digerito in doppia digestione con gli enzimi *EcoRI* e *BamHI* per controllare la presenza dell'S7 all'interno del plasmide.



- 1: marker 1 kb promega.
- 2: Plasmide pRSET B/S7 non digerito.
- 3: Plasmide pRSETB/S7 digerito. Insetto di 1040 bp e plasmide aperto di 2.900 bp.
- 4: Plasmide pRSET B/S7 non digerito.
- 5: Plasmide pRSETB/S7 digerito. Digestione non riuscita..
- 6: Plasmide pRSET B/S7 non digerito.
- 7: Plasmide pRSETB/S7 digerito. Insetto di 1040 bp e plasmide aperto di 2.900 bp.
- 8: Plasmide pRSET B/S7 non digerito.
- 9: Plasmide pRSETB/S7 digerito. Insetto di 1040 bp e plasmide aperto di 2.900 bp.

### 3.12 Digestioni delle maxiprep pRSET B/S7.

La maxiprep del plamide pRSET B/S7 è stata digerita con *EcoRI* e *BamHI*.



- 1: marker 1 kb promega.
- 2: Non digerito pRSET B/S7 dopo estrazione in maxiprep.
- 3: pRSET B/S7 digerito dopo estrazione in maxiprep.

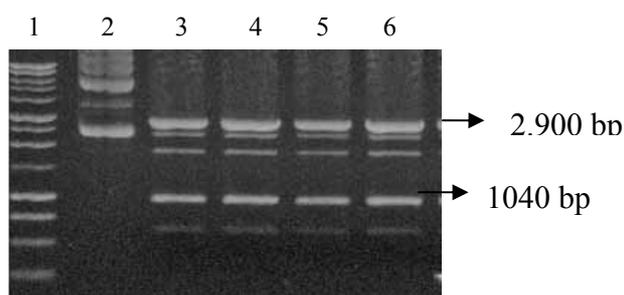
### 3.13 Sequenziamento del plasmide pRSETB/S7.

Il plasmide pRSET B/S7 è stato sequenziato per verificare che la sequenza S7 non contenesse mutazioni. La sequenza corrisponde perfettamente a quella corsicana.

```
ATGGACACTATCGCGGCAAGAGCACTCACTGTAATGCGGGCATGTGCCACTTTACAGGAAGCAAGAATCGTTTTG
GAGGCCAAATGTGATGGAAATACTGGGCATTGCAATTAACAGGTATAATGGATTAACATTGCGTGGAGTTACAATG
AGACCCACATCATTGGCGCAAAGGAATGAAATGTTCTTCATGTGCTTAGACATGATGCTATCAGCTGCGGGGATT
AATGTGGGACCAATATCACCAGATTACACACAGCATATGGCGACCATAGGAGTATTGGCAACACCAGAAATACCA
TTCACGACTGAGGCAGCGAATGAGATCGCTCGCGTTACGGGTGAGACTTCAACATGGGGACCTGCACGCCAACCG
TATGGTTTTTTCTTAGAAACAGAAGAGGTTTACCAGCCTGGGAGATGGTTTTATGCGAGCTGCACAGGCAGTAACG
GCTGTTGTGTGTGGGCCCGACATGATACAAGTATCGTTGAACGCAGGGGCGGAGGAGATGTACAACAAATGTTT
CAGGGTCGTAACGACCCCATGATGATATATCTGGTTTGGAGAAGGATTGAGAACTTCGCTATGCCTCAAGGTAAT
TCGCAGCAAACGCTAGCCGGCGTTACTGTGAGCGTTGGTGGCGTCGACATGAGGGCTGGACGTATAATAGCGTGG
GATGGTTCAGGCTGCGTTACAAATTCATAACCCGACACAGCAGAATGCTATGGTTCAGATTCAGGTAGTTTTTTTAC
ATTTTCGATGGATAAGACCTTAAACCAGTATCCAGCTCTAACGGCGGAGATTTTTAACGTGTATAGTTTCAGGGAC
CACACTTGGCATGGTTTGGAGAACTGCGATTTTTGAACAGAACCACCTTACCAAACATGTTGCCGCCAATTTTCCCG
CCAAACGATCGAGATAGCATCTTAACCTTACCTCTACTGTCTACTTTAGCAGATGTGTATACTGTCCTTCGACCC
GAATTCGCAATACACGGCGTAAATCCAATGCCCGGCCCGCTAACACGTGCAATTGCGCGCGCCGCTTATGTG TAG
```

### 3.14 Digestione del pRSET B/S7 dopo estrazione da *E. coli* BL21.

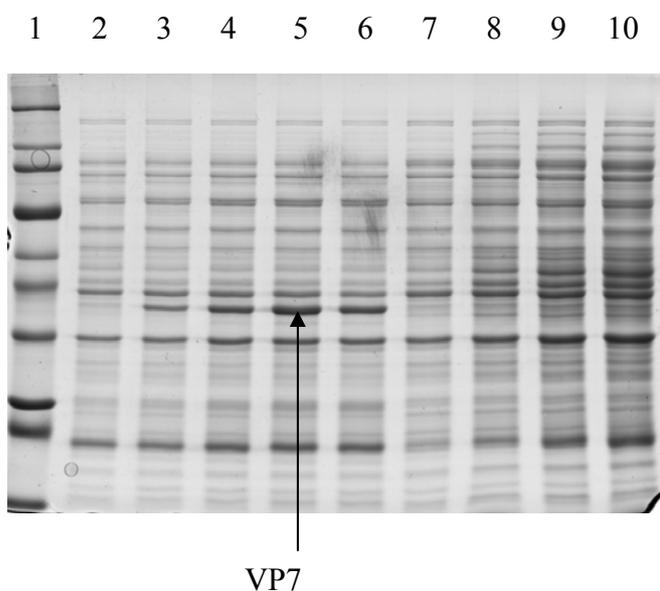
Dopo la trasformazione e l'estrazione da *E. coli* BL21 il plasmide pRSET B/S7 è stato digerito con *EcoRI* e *BamHI* per il controllo.



- 1: marker 1 kb promega.
- 2: pRSET B/S7 non digerito dopo estrazione plasmidica da *E. coli* BL21.
- 3: digestione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da *E. coli* BL21.
- 4: digestione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da *E. coli* BL21.
- 5: digestione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da *E. coli* BL21.
- 6: digestione pRSET B/S7 dopo estrazione plasmidica da *E. coli* BL21.

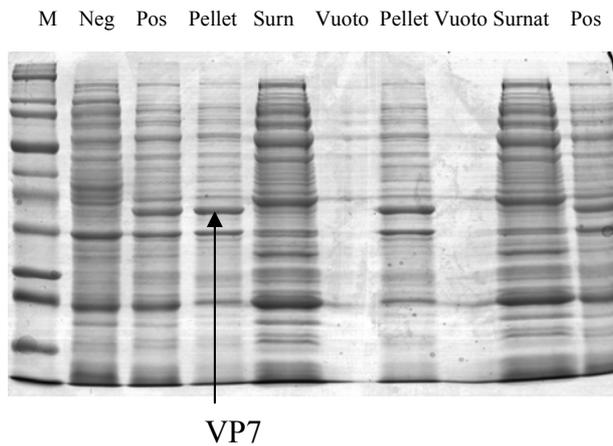
### 3.15 Frazionamento in tampone fosfato

Dopo l'induzione dell'espressione proteica in *E.coli* BL21 mediante IPTG i pellet cellulari dei diversi tempi di espressione sono stati sottoposti a frazionamento in tampone fosfato. Quindi i pellet e i surnatanti ottenuti sono stati caricati su SDS-PAGE al 10% per verificare se la proteina fosse insolubile o solubile. La proteina è evidenziata nei pellet del frazionamento ed è quindi insolubile. E' assente nei surnatanti (frazione solubile).



- 1: marker Wide Range Sigma.
- 2: pellet cellulare T0 dopo frazionamento in tampone fosfato.
- 3: pellet cellulare T1 dopo frazionamento in tampone fosfato.
- 4: pellet cellulare T2 dopo frazionamento in tampone fosfato.
- 5: pellet cellulare T3 dopo frazionamento in tampone fosfato.
- 6: pellet cellulare T4 dopo frazionamento in tampone fosfato.
- 7: *E.coli* BL21 non trasformati, T0.
- 8: *E.coli* BL21 non trasformati, T1.
- 9: *E.coli* BL21 non trasformati, T2.
- 10: *E.coli* BL21 non trasformati, T3.

Nella foto sotto è evidenziata la presenza della proteina nel pellet dopo il frazionamento e l'assenza nel surnatante.



M: marker Wide Range Sigma.

Neg: *E. coli* negativi.

Pos: *E. coli* positivi.

Pellet: pellet del frazionamento cellulare.

Surn: surnatante del frazionamento cellulare.

Vuoto

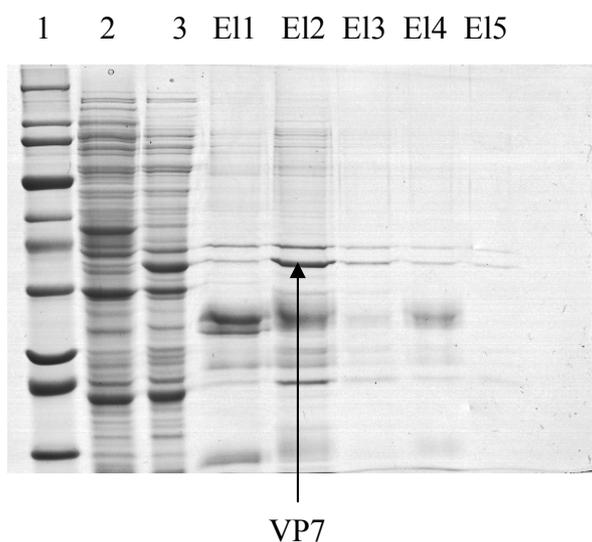
Pellet : pellet del frazionamento cellulare.

Surn: surnatante del frazionamento cellulare.

Pos: *E. coli* positivi.

### 3.16 Purificazione della proteina.

Dopo il frazionamento l'espressione della proteina è stata indotta in 50 ml di *E.coli* BL21 trasformati con il pRSET B/S7. Dal pellet cellulare la proteina è stata poi purificata e la purificazione è stata controllata su SDS-PAGE al 10%.

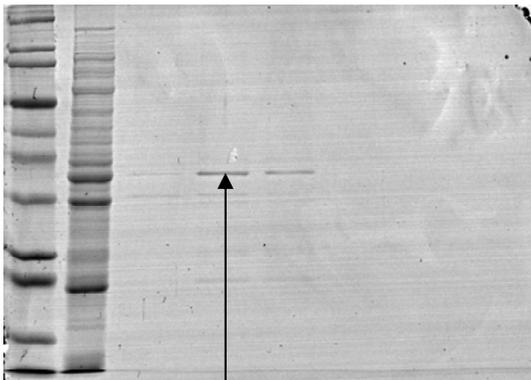


1: Marker Wide Range Sigma.  
2: *E.coli* negativi.  
3: *E.coli* positivi.  
E11: eluato 1 della purificazione proteica.  
E12: eluato 2 della purificazione proteica.  
E13: eluato 3 della purificazione proteica.  
E14: eluato 4 della purificazione proteica.  
E15: eluato 5 della purificazione proteica.

### 3.17 Purificazione ottimizzata su colonna impaccata mediante cromatografia di affinità.

La purificazione della VP7 è stata ottimizzata mediante cromatografia di affinità su colonna impaccata.

M pos E19 E110 E11

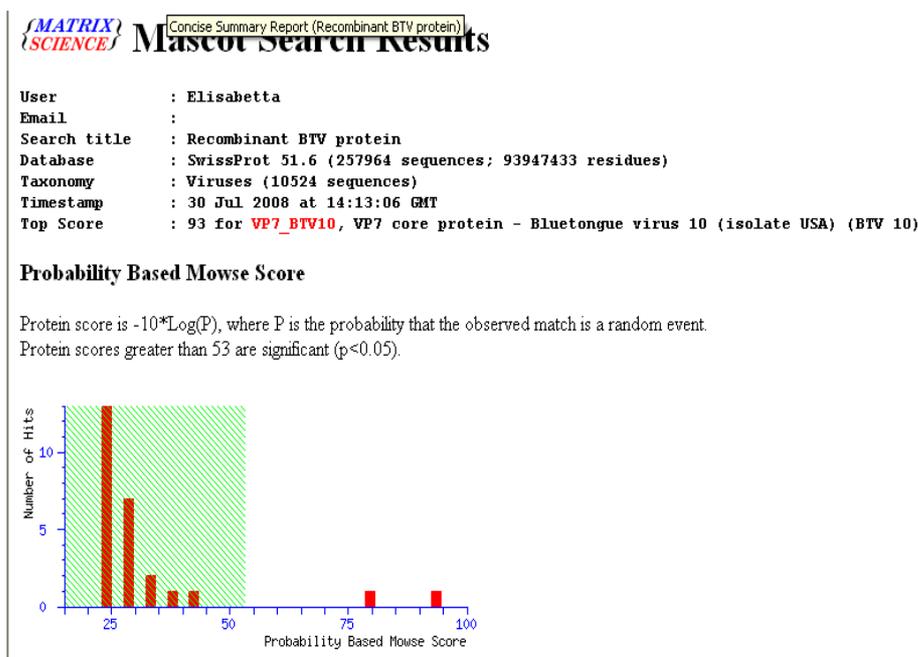


VP7

M= marker Wide Range sigma.  
Pos= *E.coli* esprimenti VP7.  
E19= frazione 9 dell'eluizione della proteina VP7 purificata.  
E110= frazione 10 dell'eluizione della proteina VP7 purificata.  
E11= frazione 11 dell'eluizione della proteina VP7 purificata.

### 3.18 Analisi della proteina mediante spettrometria di massa.

L'analisi è stata effettuata al MALDI-TOF e ha confermato l'identità della proteina.



#### Concise Protein Summary Report

Format As  [Help](#)

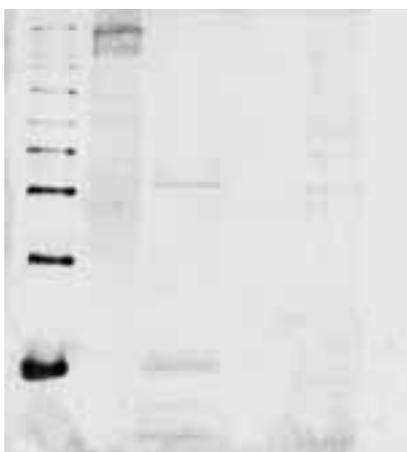
Significance threshold  $p <$   Max. number of hits

- [VP7\\_BT10](#) Mass: 38694 Score: **93** Expect: 4.8e-006 Queries matched: 8  
VP7 core protein - Bluetongue virus 10 (isolate USA) (BTV 10)
- [VP7\\_BT11](#) Mass: 38694 Score: **93** Expect: 4.8e-006 Queries matched: 8  
VP7 core protein - Bluetongue virus 11 (isolate USA) (BTV 11)
- [VP7\\_BT17](#) Mass: 38708 Score: **93** Expect: 4.8e-006 Queries matched: 8  
VP7 core protein - Bluetongue virus 17 (isolate USA) (BTV 17)
- [VP7\\_BT1A](#) Mass: 38678 Score: **93** Expect: 4.8e-006 Queries matched: 8  
VP7 core protein - Bluetongue virus 1 (isolate Australia) (BTV 1)
- [VP7\\_BT1S](#) Mass: 38790 Score: **76** Expect: 0.00024 Queries matched: 7  
VP7 core protein - Bluetongue virus 1 (isolate South Africa) (BTV 1)
- [VP7\\_BT2A](#) Mass: 38664 Score: **76** Expect: 0.00024 Queries matched: 7  
VP7 core protein - Bluetongue virus 2 (isolate USA) (BTV 2)
- [IL17\\_SHV2C](#) Mass: 17577 Score: 32 Expect: 7.3 Queries matched: 3  
Viral interleukin-17 precursor (vIL-17) (Immediate early gene 13 protein) - Saimiriine herpesvirus 2 (strain 488)

### 3.19 Immunoblotting.

La VP7 è stata testata in Immunoblotting utilizzando come anticorpo primario il siero di una pecora vaccinata contro diversi sierotipi del virus e, come secondario, l'anti sheep. I controlli negativi sono rappresentati da un mix di proteine purificate non virali e da proteine di muscolo di orata con carico totale molto elevato.

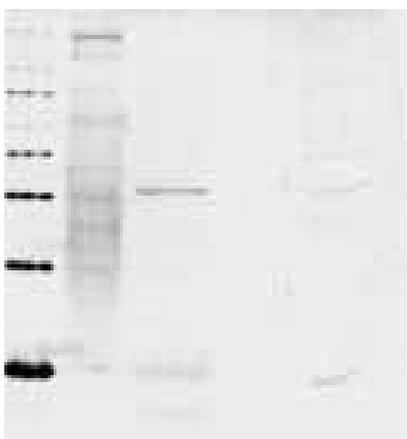
M RBC Vp7 mix orata



◀VP7

IB utilizzando come anticorpo primario un siero diluito 1 a 500:  
M: marker.  
RBC: globuli rossi con virus adsorbito.  
VP7: proteina purificata.  
Mix: mix di proteine purificate non virali.  
Orata: Proteine di muscolo con un carico totale molto elevato.

M RBC Vp7 mix orata



◀VP7

IB utilizzando come anticorpo primario il pool di sieri diluito 1 a 500:  
M: marker.  
RBC: globuli rossi con virus adsorbito.  
VP7: proteina purificata.  
Mix: mix di proteine purificate non virali.  
Orata: Proteine di muscolo con un carico totale molto elevato.

### 3.20 ELISA

L'ELISA è stata allestita utilizzando come antigene la proteina VP7 del bluetongue virus, come anticorpi primari sieri di pecore vaccinate per il virus e come secondario, un anti-pecora. I sieri sono stati testati anche con un cocktail delle proteine MSP4 di Anaplasma e P48 di Mycolplasma e non hanno reagito con queste proteine.

I valori ottenuti in ELISA da sieri positivi e negativi sono i seguenti:

| Positivi | Negativi |
|----------|----------|
| 0.0562   | 0.0401   |
| 0,0565   | 0,0395   |
| 0.0568   | 0.0377   |
| 0.0495   | 0.0437   |
| 0.0583   | 0.0452   |
| 0.0763   | 0.0396   |
| 0,0651   |          |
| 0,0598   |          |
| 0,0683   |          |
| 0,0805   |          |

L'analisi della varianza dei valori ottenuti in ELISA dai sieri, è stata valutata con il programma Minitab versione 13 ed ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra quelli positivi e quelli negativi.

```

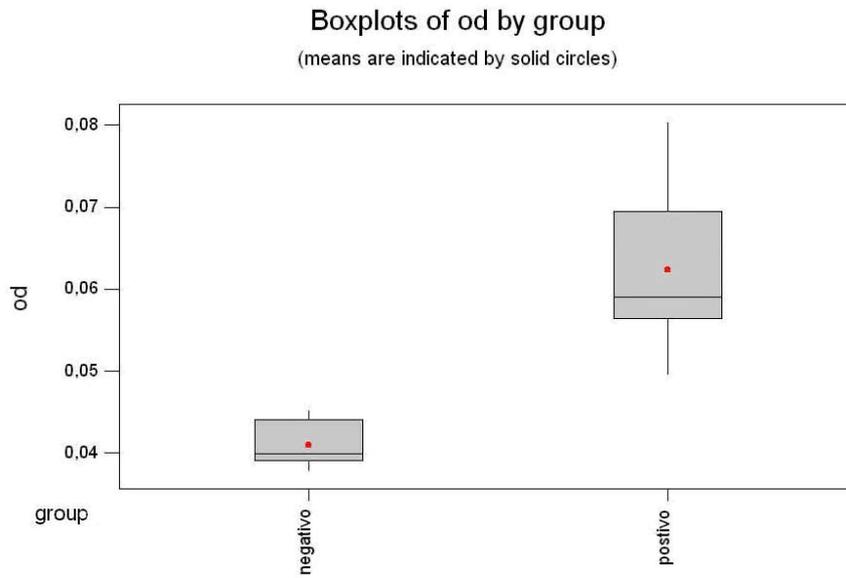
Analysis of Variance for od
Source      DF      SS      MS      F      P
group       1 0,0017227 0,0017227 29,50 0,000
Error      14 0,0008175 0,0000584
Total      15 0,0025402

Level      N      Mean      StDev
negativo   6 0,040967 0,002858
postivo    10 0,062400 0,009290

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev
-----+-----+-----+-----+
(-----*-----)
(-----*-----)
-----+-----+-----+-----+

```

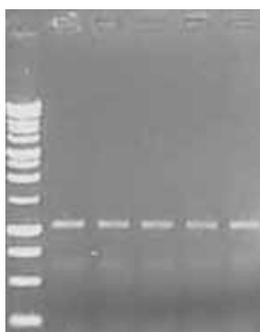
La differenza è statisticamente evidente anche con Boxplot , che rappresenta la densità ottica dei sieri positivi e di quelli negativi.



### 3.21 Amplificazione del gene S7 a partire dal plasmide pCR2.1/S7.

Per il clonaggio del gene S7 nel plasmide pCR 8, il gene è stato amplificato in PCR a partire dal plasmide pCR2.1.

1 2 3 4 5 6



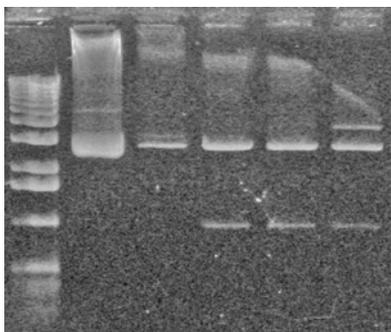
1: marker 1 kb promega.  
2-6: amplificati S7 a partire dal plasmide pCR 2.1, 1040 bp.

→ 1040 bp

### 3.22 Digestione del plasmide pCR8/S7.

Dopo la trasformazione di *E.coli* con il plasmide pCR8/S7 è stata allestita una digestione di controllo per verificare che l'inserimento del gene all'interno del plasmide fosse avvenuto in maniera corretta.

1 2 3 4 5 6



1: marker 1 kb promega.  
2: pCR 8/S7 non digerito.  
3: digestione non riuscita del plasmide pCR8/S7.  
4-5-6: digestioni plasmidiche del pCR8/S7. Banda di 1040 bp corrispondente all'inserto S7 e banda di 2.817 corrispondente al plasmide aperto.

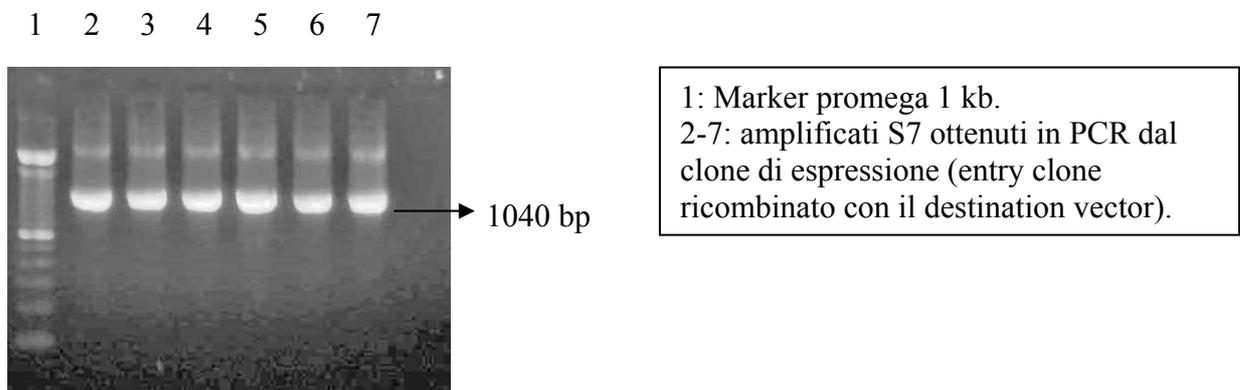
### 3.23 Sequenziamento del plasmide pCR8/S7.

Il plasmide pCR8/S7 è stato sequenziato per verificare che l'inserimento del segmento S7 fosse avvenuto correttamente. La sequenza era inserita correttamente e non presentava mutazioni.

```
ATG G A C A C T A T C G C G G C A A G A G C A C T C A C T G T A A T G C G G G C A T G T G C C A C T T T A C A G G A A G C A A G A A T C G T T T T G
G A G G C A A A T G T G A T G G A A A T A C T G G G C A T T G C A A T T A A C A G G T A T A A T G G A T T A A C A T T G C G T G G A G T T A C A A T G
A G A C C C A C A T C A T T G G C G C A A A G G A A T G A A A T G T T C T T C A T G T G C T T A G A C A T G A T G C T A T C A G C T G C G G G G A T T
A A T G T G G G A C C A A T A T C A C C A G A T T A C A C A C A G C A T A T G G C G A C C A T A G G A G T A T T G G C A A C A C C A G A A A T A C C A
T T C A C G A C T G A G G C A G C G A A T G A G A T C G C T C G C G T T A C G G G T G A G A C T T C A A C A T G G G G A C C T G C A C G C C A A C C G
T A T G G T T T T T C T T A G A A A C A G A A G A G G T T T A C C A G C C T G G G A G A T G G T T T A T G C G A G C T G C A C A G G C A G T A A C G
G C T G T T G T G T G T G G G C C C G A C A T G A T A C A A G T A T C G T T G A A C G C A G G G G C G C G A G G A G A T G T A C A A C A A A T G T T T
C A G G G T C G T A A C G A C C C C A T G A T G A T A T A T C T G G T T T G G A G A A G G A T T G A G A A C T T C G C T A T G C C T C A A G G T A A T
T C G C A G C A A A C G C T A G C C G G C G T T A C T G T G A G C G T T G G T G G C G T C G A C A T G A G G G C T G G A C G T A T A A T A G C G T G G
G A T G G T C A G G C T G C G T T A C A A A T T C A T A A C C C G A C A C A G C A G A A T G C T A T G G T T C A G A T T C A G G T A G T T T T T T A C
A T T T C G A T G G A T A A G A C C T T A A C C A G T A T C C A G C T C T A A C G G C G G A G A T T T T T A A C G T G T A T A G T T T C A G G G A C
C A C A C T T G G C A T G G T T T G A G A A C T G C G A T T T T G A A C A G A A C C A C C T T A C C A A A C A T G T T G C C G C C A A T T T T C C C G
C C A A A C G A T C G A G A T A G C A T C T T A A C C T T A C C T C T A C T G T C T A C T T T A G C A G A T G T G T A T A C T G T C C T T C G A C C C
G A A T T C G C A A T A C A C G G C G T A A A T C C A A T G C C C G G C C C G C T A A C A C G T G C A A T T G C G C G C G C C G C T T A T G T G T A G
T C C A A A G G G C G A A T T C G A C C C A G C T T T C T G T A C A A A G T G G C A T T T A A A A A T
```

### 3.24 Amplificazione S7 dal clone di espressione dopo ricombinazione plasmidica.

Una volta creato il clone di espressione dopo la ricombinazione tra l'entry clone (pCR 8/S7) e il vettore di destinazione, la presenza del gene S7 al suo interno è stata testata mediante PCR.



#### ***4. Conclusioni e discussione.***

Il bluetongue virus è l'agente eziologico della bluetongue, una malattia infettiva che colpisce i piccoli ruminanti.

Nel 2001 in Sardegna la malattia ha causato la perdita di circa 90.000 capi ovini evidenziando quanto essa rappresenti un grosso problema per la salute animale e per le ingenti perdite economiche che comporta.

Il genoma del virus va spesso incontro a fenomeni di drift e shift antigenico. Il primo è da attribuire alla mancanza di una efficace attività proofreading da parte dell'RNA polimerasi del virus che causa l'insorgere di frequenti mutazioni all'interno del genoma e porta quindi ad una pressione selettiva che va a favore dei ceppi antigenici più resistenti, mentre il secondo è reso possibile dalla struttura segmentata del genoma ed è un altro strumento che il virus utilizza per dare vita a nuovi ceppi e aumentare la sua resistenza in vivo. Entrambi i fenomeni fanno del BTV un virus difficile da eradicare ed è per questo che è importante la ricerca di strategie diagnostiche e preventive nei confronti della malattia.

Il contenimento della malattia nella situazione di alta emergenza verificatasi nel 2000 è stato tentato ricorrendo a vaccini tradizionali attenuati che però hanno presentato una serie di problematiche dovute all'alta frequenza di reversione del virus da attenuato a patogeno e all'insorgenza di effetti collaterali come aborti e nascita di agnelli con evidenti malformazioni.

In questo lavoro è stata allestita una library di DNA di bluetongue virus, una PCR per l'identificazione del sierotipo 2 corsicano di BTV; inoltre la VP7 del sierotipo 2 del virus è stata clonata, sequenziata, espressa in batteri, purificata e caratterizzata mediante le metodiche di immuno-blotting ed ELISA. In aggiunta sono stati portati avanti i primi step per l'espressione della stessa proteina in pianta.

Già diversi sono stati i tentativi per la produzione di vaccini ricombinanti, basati su subunità del BTV, che in effetti conferiscono immunità protettiva con proprietà DIVA agli

animali e si sono dimostrati sicuri per questi ultimi. Perché questi strumenti siano efficaci però sono necessarie diverse inoculazioni come per i vaccini inattivati e inoltre gli alti costi di produzione in sistemi di espressione convenzionale per adesso ne impediscono l' utilizzo nelle campagne di vaccinazione.

Un approccio diverso per l'utilizzo di questi sistemi ricombinanti è quello dell'espressione in pianta. Infatti le piante potrebbero essere un valido modello alternativo ai sistemi di espressione classici grazie al fatto che con esse si possono avere alti livelli di espressione proteica, che alcuni organi vegetali accumulano per loro predisposizione grandi quantità di proteine, grazie poi alla notevole facilità con cui in breve tempo si possono aumentare o diminuire i livelli di produzione e ai costi sicuramente meno elevati che la produzione di antigeni ricombinanti in questo sistema comporterebbe. Le proprietà antigeniche delle proteine prodotte in piante potrebbero poi essere saggiate su modelli animali.

Si spera quindi che nel futuro questo approccio di lavoro possa portare all'allestimento di test diagnostici e strumenti profilattici innovativi per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione della malattia.

## 5. Riferimenti bibliografici:

- 1) Mertens P.P.C., Diprose J. (2004). "The Bluetongue virus core: a nano –scale trascription maschine". *Virus research* 101, 29-43.
- 2) Roy P. (2008). "Bluetongue virus: dissection of the polymerase complex". *Journal of General Virology* 89, 1789-1804.
- 3) Wittman E.J., Mellor P.S., Baylis M. (2002). "Effect of temperature on the trasmission of orbiviruses by the miting midge, *Culicoides Sonorensis*". *Med. and Vet. Entomology* 16, 147-156.
- 4) Roy P. (1995). "Orbivirus Structure and Assembly", *Virology* 216,1-11. Article No.0028.
- 5) Farina R., Scatozza F. (1998). Trattato di malattie infettive degli animali, 2<sup>a</sup> edizione , UTET, Torino.
- 6) Eaton B.T., Hyatt A.D. (1989). "Association of bluetongue virus with the cytoskeleton". *Subcellular Biochemistry* 15, 233-273.
- 7) Forzan M., Marsh M., Roy P. (2007). "Bluetongue virus entry into the cells". *J Virol* 81, 4819-4827.
- 8) Forzan M., Wirblich C., Roy,P. (2004). "A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity". *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2100-2105.
- 9) Hassan S.H., Wirblich C., Forzan M., Roy P. (2001). "Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization". *J. Virol* 75, 8356-8367.
- 10) Van Dijk A.A., Huismans H. (1982). "The effect of the temperature on the *in vitro* trascriptase reaction of bluetongue virus, epizootic haemorrhagic disease virus and African Horsesickness virus". *Onderstepoort J Vet Res* 49, 227-232.
- 11) Huisman H., Van Dijk A., Els H.J(1987) . "Uncoating of parental bluetongue virus to core and subcore particles in infected L cells". *Virology* 157, 180-188.
- 12) Mertens P., Burroughs J.N., Anderson J. (1987). "Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotype 1 and 4". *Virology* 157, 375-386.

- 13) Verwoerd D.W., Louw H., Oellermann R.A. (1970). "Characterization of bluetongue virus ribonucleic acid". *J Virol* 5, 1-7.
- 14) Fukusho A., Yu Y., Yamaguchi S., Roy P. (1989). "Completion of the sequence of bluetongue virus serotype 10 by the characterization of structural protein ,VP6, and a non-structural protein , NS2". *J gen Virol* 70,1677-1689.
- 15) Roy P., Marshall J.J., and French T.J. (1990a). "Structure of the bluetongue virus genome and its encoded proteins". *Curr Top Microbiol Immunol* 162, 43-87.
- 16) Roy P. (1995). "Orbivuses and their replication". In *Fields Virology* 3<sup>rd</sup> edn, pp, 1709-1734. Edited by B.N Fields, Philadelphia, PA: Lippincott- Raven.
- 17) Lecatsas G. (1968). "Electron microscopic study of the formation of bluetongue virus". *Onderstepoort J Vet Res* 35,139-149.
- 18) Eaton B.T., Hyatt A.D., Brookes S.M. (1990). "The replication of bluetongue virus". *Curr Top Microbiol Immunol* 162,89-118.
- 19) Thomas C.P., Booth T.F., Roy P. (1990). "Synthesis of bluetongue virus-encoded Phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells; it binds the single-stranded RNA species". *J Gen Virol* 71, 2073-2083.
- 20) Kar A.K., Roy P. (2003). "Defining the structure-function relationships of bluetongue virus helicase protein VP6". *J Virol* 77, 11347-11356.
- 21) Lymperopoulos K., Wirblich C., Brierley I., Roy P. (2003). "Sequence specificity in the interaction of bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA". *J Biol Chem* 278, 31722-31730.
- 22) Modrof J., Lymperopoulos K., Roy P. (2005). "Phosphorylation of bluetongue virus non-structural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies". *J Virol* 79, 10023-10031.
- 23) French T.J., Inumaru S., Roy P. (1989). "Expression of two related non-structural proteins of bluetongue virus (BTV) type 10 in insect cells by a recombinant baculovirus: production of polyclonal ascitic fluid and characterization of the gene product in BTV-infected BHK cells". *J Virol* 63, 3270-3278.
- 24) Xu ., Chen S.Y., Iwata H., Compans R.W., Roy P. (1992). "Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus". *J Virol* 66, 7104-7112.

- 25) Beaton A.R., Rodriguez J., Reddy Y.K., Roy P. (2002). "The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release". *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13154-13159.
- 26) Hyatt A.D., Zhao Y., Roy P. (1993). "Release of bluetongue virus-like particles from insect cells in mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A" .*Virology* 193, 592-603.
- 27) Wirblich C., Bhattacharya B., Roy P. (2006). "Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101". *J Virol* 80,460-473.
- 28) Huisman H., Els H.J. (1979). "Characterization of the tubules associated with the replication of three defferent orbiviruses". *Virology* 92, 397-406.
- 29) Urakawa T., Roy P. (1988). "Bluetongue virus tubules made in insect cells by recombinant baculoviruses: expression of the NS1 gene of bluetongue virus serotype 10". *J Virol* 62, 3919-3927.
- 30) Owens RJ., Limn C., Roy P. (2004). "Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular phatogenesis in virus release". *J Virol* 78, 6649-6656.
- 31) Prasad B.V.V., Yamaguchi S., Roy P. (1992). "Three-dimensional structure of single-shelled bluetongue virus". *J Virol* 66, 2135-2142.
- 32) Grimes J.M., Jacana J., Ghosh M., Basak A.K., Roy P., Chiu W., Stuart D.I., Prasad B.V.V. (1997). "An atomic model of the outer layer of bluetongue virus core derived from X-ray crystallography an electron criomicroscopy". *Structure* 5, 885-893.
- 33) Grimes J.M., Burroughs J.N., Gouet P., Diprose J.M., Malby R., Zientara S., Mertens P.P.C., Stuart D.I. (1998). "The atomic structure of the bluetongue virus core" .*Nature* 395, 470-478.
- 34) Stuart D.I., Grimes J.M. (2006). "Structural studies on orbivirus proteins and particles" .*Curr Top Microbiol Immunol* 309, 221-244.
- 35) Schwartz-Cornil I., Mertens P.P.C., Contreras V., Hemati B., Pascale F., Breard E., Mellor P., Maclachlan N.J., Zientara S. (2008). "Bluetongue virus: virology, phatogenesis and Immunity". *Vet. Res* 39:46.
- 36) Delrio Gavino: "Lotta integrata a Culicoides imicola vettore della Febbre Catarrale Ovina". WWW/ agrometeo. sar.sardegna.it.
- 37) Fu H., Leake C.J., Mertens P.P.C., Mellor P.S. (1999). "The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and trasmission in the vector, *Culicoides variipennis* (*Diptera;Ceratopogonidae*)". *Arch. Virol.*144, 747-761.

- 38) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale"  
www.izs.it.
- 39) Monath T.P., Guirakhoo F., "Orbiviruses and Coltiviruses". (1996). In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Virology*, Lippincott, Raven, Boston, Massachusetts, USA, pp. 1735–1766.
- 40) Mellor P.S., Boorman J. (1995). "The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses". *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89, 1–15.
- 41) Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M. (2005). "Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe", *Nat. Rev. Microbiol* 3, 171–181.
- 42) Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S. (2008). "Bluetongue Epidemiology in the European Union". *Emerging Infect. Dis.* 14, 539–544.
- 43) Mellor P.S., Wittmann E.J. (2002). "Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001". *Vet.J.* 164, 20–37.
- 44) Johnson D.J., Ostlund E.N., Stallknecht D.E., Goekjian V.H., Jenkins-Moore M., Harris S.C. (2006). "First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States". *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 398–401.
- 45) MacLachlan N.J. (2004). "Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia". *Vet. Ital* 40 (4), 462-467.
- 46) Koumbati M., Mangana O., Nomikou K., Mellor P.S., Papadopoulos O. (1999). "Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats". *Vet. Micro* 64, 277-285.
- 47) Chiang E.T., Persaud-Sawin D.A., Kulkarni S., Garcia J.G., Imani F. (2006). "Bluetongue virus and doublestranded RNA increase human vascular permeability: role of p38 MAPK". *J. Clin. Immunol.* 26, 406–416.
- 48) Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P., Kirkham P.A., Burroughs J.N., Parkhouse R.M. (2003). "A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector". *J. Gen. Virol.* 84, 227–235.
- 49) Mortola E., Noad R., Roy P. (2004). "Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells". *J. Virol.* 78, 2875–2883.

- 50) Barratt-Boyes S.M., Rossitto P.V., Stott J.L., MacLachlan N.J. (1992). "Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells". *J. Gen. Virol* 73, 1953–1960.
- 51) DeMaula C.D., Leutenegger C.M., Bonneau K.R., MacLachlan N.J. (2002). "The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue". *Virology* 296, 330–337.
- 52) Foster N.M., Luedke A.J., Parsonson I.M., Walton T.E. (1991). "Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains". *Am. J. Vet. Res.* 52, 192–196.
- 53) MacLachlan N.J., Thompson J. (1985). "Bluetongue virus-induced interferon in cattle". *Am. J. Vet. Res.* 46, 1238–1241.
- 54) Jameson P., Schoenherr C.K., Grossberg S.E. (1978). "Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice". *Infect. Immun* 20, 321–323.
- 55) Fulton R.W., Pearson N.J. (1982). "Interferon induction in bovine and feline monolayer cultures by four bluetongue virus serotypes". *Can. J. Comp. Med.* 46, 100–102.
- 56) Huismans H. (1969). "Bluetongue virus-induced interferon synthesis". *Onderstepoort J. Vet. Res.* 36, 181–185.
- 57) Jameson P., Grossberg S.E. (1978). "Production of interferon in human cell cultures by a new, potent viral inducer". *Adv. Exp. Med. Biol.* 110, 37–53.
- 58) Rinaldo C.R. Jr., Overall J.C. Jr., Glasgow L.A. (1975). "Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells". *Infect. Immun.* 12, 1070–1077.
- 59) Jeggo M.H., Wardley R.C., Taylor W.P. (1984). "Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection". *Res. Vet. Sci.* 36, 81–86.
- 60) Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J. (1985). "Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection". In: Barber T.L., Jochim M.M. (Eds.), *Bluetongue and related orbiviruses*, New York, Alan R. Liss, pp 447–487.
- 61) Roy P., Urakawa T., Van Dijk A.A., Erasmus B.J. (1990). "Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep". *J. Virol.* 64, 1998–2003.
- 62) Huismans H., Erasmus B.J. (1981). "Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus". *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48, 51–58.

- 63) Mertens P.P., Pedley S., Cowley J., Burroughs J.N., Corteyn A.H., Jeggo M.H., et al. (1989). "Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype". *Virology* 170, 561–565.
- 64) Huismans H., Van Der Walt N.T., Cloete M., Erasmus B.J. (1987). "Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep". *Virology* 157, 172–179.
- 65) DeMaula C.D., Bonneau K.R., MacLachlan N.J. (2000). "Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies". *Virus Res* 67, 59–66.
- 66) Lobato Z.I., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E. (1997). "Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus expressed bluetongue virus antigens". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 293–309.
- 67) Roy P., French T., Erasmus B.J. (1992). "Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease". *Vaccine* 10, 28–32.
- 68) Roy P., Bishop D.H., LeBlois H., Erasmus B.J. (1994). "Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection". *Vaccine* 12, 805–811.
- 69) Cowley J.A., Gorman B.M. (1989). "Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21". *Vet. Microbiol.* 19, 37–51.
- 70) Jeggo M.H., Gumm I.D., Taylor W.P. (1983). "Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types". *Res. Vet. Sci.* 34, 205–211.
- 71) Maan S., Maan N.S., Samuel A.R., Rao S., Attoui H., Mertens P.P. (2007). "Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes". *J.Gen. Virol.* 88, 621–630.
- 72) Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L., Sawyer M.M. (1979). "Immunological response of sheep to an experimental inactivated BTV vaccine". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 611–615.
- 73) Jones L.D., Chuma T., Hails R., Williams T. Roy P. (1996). "The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants". *J. Gen. Virol* 77:997–1003.
- 74) Jones L.D., Williams T., Bishop D., Roy P. (1997). "Baculovirus expressed non-structural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection". *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 4, 297-301.

- 75) Takamatsu H., Jeggo M.H. (1989). "Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their crossreactivity with different serotype viruses". *Immunology* 66, 258–263.
- 76) Andrew M., Whiteley P., Janardhana V., Lobato Z., Gould A., Coupar B. (1995). "Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus". *Vet. Immunol. immunopathol.* 47, 311–322.
- 77) Janardhana V., Andrew M.E., Lobato Z.I., Coupar B.E. (1999). "The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus". *Res. Vet. Sci.* 67, 213–221.
- 78) Takamatsu H., Burroughs J.N., Wade-Evans A.M., Mertens P.P. (1992). "Analysis of bluetongue virus serotype-specific and cross reactive ovine T-cell determinants in virus structural proteins". In: Walton T.E., Osburn B.I. (Eds.), *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 491–497.
- 79) Wade-Evans A.M., Romero C.H., Mellor P., Takamatsu H., Anderson J. Thevasagayam J., et al. (1996). "Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge". *Virology* 220, 227–231.
- 80) MacLachlan N.J., Nunamaker R.A., Katz J.B., Sawyer M.M., Akita G.Y., Osburn B.I., Tabachnick W.J. (1994). "Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*". *Arch. Virol.* 136, 1–8.
- 81) Shad G., Wilson W.C., Mecham J.O., Evermann J.F. (1997). "Bluetongue virus detection: a safer reverse transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep". *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 118–124.
- 82) Afshar A. (1994). "Bluetongue: laboratory diagnosis". *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 221–242.
- 83) Thomas F.C. (1984), "Comparison of some storage and isolation methods to recover bluetongue virus from bovine blood". *Can. J. Comp. Med.* 48, 108–110.
- 84) Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A. (2000), "Isolation and identification of bluetongue virus". *J. Virol. Methods* 87, 13–23.
- 85) Hosseini M., Hawkes R.A., Kirkland P.D., Dixon R.J. (1998). "Rapid screening of embryonated chicken eggs for bluetongue virus infection with an antigen capture enzyme linked immunoabsorbent assay". *J. Virol. Methods* 75, 39–46.

- 86) Hawkes RA., Kirkland PD., Sanders DA., Zhang F., Li Z., Davis RJ., Zhang N. (2000). "Laboratory and field studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus". *J. Virol Methods* 85, 137-149.
- 87) Wang L., Kemp M. C., Roy P., Collisson E. (1988). "Tissue tropism and Target Cells of Bluetongue virus in the Chicken Embryo". *J. of Virol* 62 887-893.
- 88) Wechsler S.J., McHolland L.E. (1988). "Susceptibilities of 14 Cell Lines to Bluetongue Virus Infection". *J.of clin, microbiol* 26, 2324-2327.
- 89) Wechsler S.J., Luedke A.J. (1991). "Detection of Bluetongue Virus by Using Bovine Endothelial Cells and Embryonated Chicken Eggs". *J.of clin, microbiol* 29, 212-214.
- 90) Mecham J.O., Dean V.C., Wigington J.G., Nunamaker R.A (1990). "Detection of Bluetongue virus in *Culicoides Variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) by an antigene capture enzyme-linked immunossorbent assay". *J. Med. Entomol* 27, 602-606.
- 91) Billinis C., Koumbati M., Spyrou V., Nomikou K., Mangana O., Panagiotidis C.A., Papadoupoulos. O (2001). "Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse trascription- PCR: a comparison with conventional methods". *J. Virol. Methods* 98, 77-89.
- 92) Johnson D.J., Wilson W.C., Paul P.S (2000). "Validation of a reverse trascriptase multiplex PCR test for the serotype determination of U.S. isolates of bluetongue virus. *Vet. Microbiol* 76, 105-115.
- 93) Savini G., Maclachlan N.J., Sanchez-Vizcaino J.M., Zientara S. (2008). "Vaccines against bluetongue in Europe". *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 31, 101–120.
- 94) Veronesi E., Hamblin C., Mellor P.S. (2005). "Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (*Diptera: Ceratopogonidae*)". *Vaccine* 23, 5509–5516.
- 95) Enserink M. (2008). "Animal disease. Exotic disease of farm animal tests Europe's responses". *Science* 319, 710–711.
- 96) Hervas-Stubbs S., Rueda P., Lopez L., Leclerc C. (2007). "Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN". *J. Immunol.* 178, 2361–2369.
- 97) Perrin A., Albina E., Bréard E., Sailleau C., Promé S., Grillet C., et al. (2007). "Recombinant capripoxvirus esexpressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants". *Vaccine* 25, 6774–6783.

- 98) Tan B.H., Nason E., Staeuber N., Wenrong J., Monastyrskaya K., Roy P.(2001). “RGD Tripeptide of Bluetongue Virus VP7 Protein is Responsible for Core Attachment to *Culicoides* Cells”. *J. Virol*, Apr, 3937-3947.
- 99) Zientara S., Sailleau C., Moulay S., Wade-Evans A., Cruciere C.(1995). “Application of the polymerase chain reaction to the detection of African horse sickness viruses”. *J.of Virol Meth* 53, 47-54.
- 100) Aradaib I.E., Wilson W.C., Schore C.E., Mohammed M.E.H., Tilahun D.Y., Cullor J.S., Osburn B.(1998). “PCR Detection of North American and Central African Isolates of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV) Based on Genome Segment 10 of EHDV Serotype 1”. *J.of.clin.Microb*, Sept, p 2604-2608.
- 101) Katz J.B., Gustafson G.A., Alstad A.D., Adler K.A., Moser K.M (1993). Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *Am. J. Vet. Res.*54, 2021.