



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE
BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE**

**INDIRIZZO MICROBIOLOGIA MOLECOLARE E CLINICA
XXIV Ciclo**

**Allestimento e Test in vivo di un
Vaccino a DNA contro l'Agalassia
Contagiosa**

Direttore:
Prof. Bruno Masala

Tutor:
Prof. Marco Pittau

Tesi di dottorato della
Dott.ssa Laura Carcangiu

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

Indice

Capitolo 1

I Mycoplasmi

- 1.1- Generalità e tassonomia
- 1.2- Coltivazione in vitro
- 1.3- Invasività e patogenicità
- 1.4- Interazione dei micoplasmi col sistema immunitario

Capitolo 2

Agalassia Contagiosa

- 2.1- *Mycoplasma agalactiae* e Agalassia Contagiosa
- 2.1- Strategie di controllo della Agalassia Contagiosa
- 2.3- Diagnosi delle infezioni sostenute da micoplasmi
- 2.4- Interazione dei micoplasmi col sistema immunitario

Capitolo 3

I Vaccini

- 3.1- Generalità sui vaccini

3.2 I vaccini a DNA

3.3- Vantaggi e svantaggi dei vaccini a DNA

Capitolo 4

Scopo del lavoro

Capitolo 5

Materiali e metodi

5.1- Terreni e reagenti

5.2- Costruzione dei plasmidi

5.3- Controllo espressione e traduzione in vitro

5.4- Messa a punto delle preparazioni vaccinali

5.5- Espressione e purificazione dell'antigene P48

5.6- Produzione del vaccino a DNA

5.7- Protocollo di vaccinazione degli ovini

5.8- Valutazione della risposta immunitaria umorale

5.9- Valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata

5.10- Isolamento di *M. agalactiae* da latte

Capitolo 6

Risultati

6.1- Costruzione dei plasmidi

6.2- Controllo espressione e traduzione in vitro

6.3- Espressione e purificazione dell'antigene P48

6.4- Produzione del vaccino a DANN

6.5-Trial 1: Valutazione della risposta immunitaria

6.6- Trial 1: Isolamento dal latte di *M. agalactiae*

6.7- Trial 2: Valutazione della risposta immunitaria umorale

6.8- Trial 2: Valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata

6.9- Trial 2: Isolamento dal latte di *M. agalactiae*

Capitolo 7

Discussione e conclusioni

Bibliografia

Capitolo 1

I Mycoplasmi

1.1 Generalità e tassonomia

I micoplasmi sono ritenuti i più piccoli procarioti capaci di vita autonoma e di auto replicarsi. Le loro dimensioni infatti oscillano tra 0,2 - 0,8 μm .

Attualmente sono conosciute circa 180 specie di micoplasmi, complessivamente classificate nella divisione Tenericutes, classe Mollicutes (mollis: tenera, cutis: pelle), ordine Mycoplasmatales, famiglia Mycoplasmataceae, genere Mycoplasma (Razin & Freundt, 1984; Razin, 1991, 1993). (Fig. 1.1)

Classe:	<i>Mollicutes</i>
Ordine:	<i>Mycoplasmatales</i>
Famiglia:	<i>Mycoplasmataceae</i>
Genere I:	<i>Mycoplasma</i> (85 specie) — Richiesta di steroli per la crescita — Non idrolizza l'urea — Basi G+C del DNA: 27-40 mol % — Ospiti: uomo e animali
Genere II:	<i>Ureaplasma</i> (5 specie) — Richiesta di steroli per la crescita — Idrolizza l'urea — Basi G+C del DNA: 27-30 mol % — Ospiti: uomo e animali
Ordine:	<i>Entomoplasmatales</i>
Famiglia:	<i>Entomoplasmataceae</i>
Genere I:	<i>Entomoplasma</i> (5 specie) — Richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 27-29 mol % — Ospiti: insetti e piante
Genere II:	<i>Mesoplasma</i> (4 specie) — Non richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 27-30 mol %
Famiglia:	<i>Spiroplasmataceae</i>
Genere:	<i>Spiroplasma</i> (11 specie) — Richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 25-30 mol %
Ordine:	<i>Acholeplasmatales</i>
Famiglia:	<i>Acholeplasmataceae</i>
Genere:	<i>Acholeplasma</i> (10 specie) — Non richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 26-36 mol % — Ospiti: animali, piante e insetti
Ordine:	<i>Anaeroplasmatales</i>
Famiglia:	<i>Anaeroplasmataceae</i>
Genere I:	<i>Anaeroplasma</i> (4 specie) — Richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 29-34 mol % — Habitat: ruminanti di bovini e ovini
Genere II:	<i>Asteroplasma</i> (1 specie) — Non richiesta di steroli per la crescita — Basi G+C del DNA: 40 mol %

Fig. 1.1 - Tassonomia della classe Mollicutes (Tully, 1993)

Questi microrganismi hanno una distribuzione ubiquitaria nel mondo animale potendo essere isolati in molti mammiferi e uccelli, così come in rettili, anfibi e pesci.

Una caratteristica molto importante dei micoplasmi è l'assenza di parete cellulare. Si ritiene che il micoplasma sia originato da un progenitore ancestrale staccatosi da un ramo filogenetico degli streptococchi circa 600 milioni di anni fa. Il processo di evoluzione riduttiva del genoma (Razin *et al.*, 1972; Maniloff, 1996a) ha portato alla perdita di alcune parti di geni non necessari per la sopravvivenza e la replicazione, tra cui quelli per la sintesi della parete cellulare (Razin, 1992; Maniloff, 1996a).

L'assenza della parete cellulare, in associazione con la notevole plasticità della membrana, determina in questi microrganismi un elevato pleomorfismo che permette loro di assumere diverse forme, che variano da quella coccica a quella filamentosa, a fiasca, a spirale, ad anello. In coltura su terreno solido (in condizioni di aerobiosi, a 37 °C e ad un pH compreso tra 7.6 e 7.8), analogamente a quanto si osserva in altri microrganismi privati artificialmente di parete cellulare, abbiamo la formazione di colonie con aspetto tipico, comunemente detto “ad uovo fritto” (Fig.1.2).



Fig. 1.2 Colonie di *Mycoplasma agalactiae* in coltura su terreno solido.

I micoplasmi sono in possesso di una tipica membrana cellulare composta da un film lipidico ricco di fosfolipidi e colesterolo in cui si trovano le proteine di membrana, secondo il modello del mosaico fluido. Questi microrganismi sono

considerati a tutti gli effetti dei Gram-negativi anche se per le loro caratteristiche fisiche tendono a colorarsi molto debolmente con questo meccanismo.

Il genoma dei micoplasmi è costituito da una molecola di dsDNA con un peso di circa 5×10^8 Da e una lunghezza piuttosto variabile (dalle 580 kb di *Mycoplasma genitalium* alle 1380 kb di *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC, Razin et al., 1972); questa estrema variabilità, riscontrabile sia all'interno del genere che della specie, è data dalla presenza di elementi di inserzione e ripetuti, costituiti da segmenti di sequenze codificanti che differiscono per numero e lunghezza nelle varie specie (Razin, 1985; Ladefoged et al., 1992; Rink et al., 1992; Carle et al., 1995; Huang et al., 1995; Himmelreich et al., 1996).

Prendendo in considerazione i generi *Acholeplasma* e *Spiroplasma*, che sono considerati antichi Mollicutes, bisogna evidenziare come questi possiedano un genoma di dimensioni maggiori rispetto a quello dei generi *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, considerati filogeneticamente più recenti (ad es. il genoma di *Spiroplasma* varia da 780 a 2200 kb). Questo potrebbe costituire un'ulteriore prova dell'evoluzione riduttiva dei Mollicutes, che ha portato a consistenti perdite di sequenze genomiche. (Razin S.; 1998). Nella Tab.1 sono riassunte schematicamente le caratteristiche fin qui illustrate e la tassonomia della classe *Mollicutes*, mentre nella Tab.2 vengono confrontate le caratteristiche principali dei *Mollicutes* e degli altri eubatteri.

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

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

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

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

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

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

Tab. 3 — principali micoplasmi che colpiscono le specie avicole

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

Tab.4 — principali micoplasmi che presenti nel suino

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

Tab. 5 — principali micoplasmi presenti nella specie equina

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

Tab. 6 — principali micoplasmi presenti nel bovino

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

Tab.7 — principali micoplasmi degli ovi - caprini

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

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

Un'altra caratteristica peculiare dei micoplasmi è data dal contenuto in Guanina e Citosina nel genoma; questo infatti risulta essere decisamente più basso rispetto a quello che si può osservare negli altri eubatteri (24-33 mol.%).

L'alta pressione selettiva verso un maggior contenuto in A+T (Razin *et al.*, 1998; Muto & Osawa, 1987) ha provocato uno shift nella funzione del codone UGA che, nei micoplasmi, codifica per il triptofano (come nel DNA mitocondriale), mentre nel codice genetico universale rappresenta un codone di stop. Quest'ultima caratteristica rende difficoltosa l'espressione dei geni di micoplasmi clonati in *Escherichia coli* (Smiley & Minion, 1993).

A causa dell'esiguità del corredo genetico anche le capacità metaboliche dei micoplasmi sono piuttosto ridotte. Questi microrganismi, infatti, non effettuano la biosintesi di amminoacidi e vitamine, spesso non sintetizzano i cofattori e nemmeno gli acidi grassi ed il colesterolo (Razin *et al.*, 1998). I geni e gli enzimi per la sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche sono scarsi ed il fabbisogno in nucleotidi viene soddisfatto da nucleasi che degradano gli acidi nucleici delle cellule ospiti.

Buona parte dei sistemi di produzione di energia sono andati perduti, perché la richiesta di ATP è piuttosto bassa, considerando il fatto che vengono operate pochissime biosintesi (Razin *et al.*, 1998); in nessun micoplasma è stato inoltre possibile rintracciare elementi del ciclo di Krebs né i citocromi, mentre la glicolisi viene eseguita normalmente.

Una buona percentuale dei geni codifica per proteine implicate nel trasporto transmembrana dei nutrienti necessari per la crescita e la sopravvivenza ma, al contrario di quanto si possa pensare, i sistemi di trasporto non sono molto sviluppati. Una possibile spiegazione di questo fenomeno risiede nel fatto che i nutrienti devono attraversare solo una barriera di permeabilità, costituita dalla membrana citoplasmatica, e che un singolo canale possa permettere l'ingresso di più substrati (es. diversi amminoacidi) (Razin *et al.*, 1998).

Nel corso della loro evoluzione i micoplasmi hanno perduto apparentemente tutti i geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi e delle vitamine, ed un ulteriore “risparmio” di geni si è attuato a livello del metabolismo dei lipidi: mentre alcuni micoplasmi sintetizzano essi stessi i fosfolipidi di membrana ed i glicolipidi a partire però da acidi grassi esogeni, altri non possiedono neppure queste vie metaboliche e sono costretti ad incorporare nella propria membrana plasmatica fosfolipidi preformati derivanti dai tessuti dell’ospite (Razin S., 1998). Al contrario sono estremamente conservati i geni implicati nella traduzione, nella sintesi del tRNA e quelli ribosomiali.

I geni coinvolti nella replicazione, trascrizione e traduzione del materiale genetico, pur se in valore assoluto inferiori numericamente rispetto ad altri batteri, sono in percentuale (sul totale del genoma) addirittura superiori ai valori presenti in batteri del genere *Haemophilus*, sottolineandone il ruolo biologico essenziale; la delezione genetica evolutiva ha quindi risparmiato questo gruppo di geni limitandone la distruzione (Razin S., 1998).

Sulla base di tutto questo si è a lungo ipotizzato uno sviluppo eccezionale in questi microrganismi dei sistemi di trasporto volti ad assicurare un costante e pronto apporto esogeno di molecole organiche: in realtà le ricerche svolte su questo argomento hanno subito smentito questa possibilità (Razin S., 1998), dimostrando come il numero di sistemi di trasporto sia alquanto limitato nei micoplasmi, in contraddizione con ogni logica aspettativa.

Una possibile spiegazione del non elevatissimo numero di sistemi di trasporto nei micoplasmi potrebbe essere innanzitutto la presenza di una sola barriera rappresentata dalla membrana plasmatica e anche l’apparente bassa specificità di substrato di alcuni sistemi di trasporto tipici di questi microrganismi.

Un esempio può essere quello dell’ABC transporter ATP dipendente, coinvolto nell’importazione o esportazione di una grande varietà di substrati, quali zuccheri, peptidi, proteine e tossine, grazie alla presenza di un dominio, probabilmente una lipoproteina superficiale soggetta a variazioni di fase, che garantisce un certo adattamento ai diversi substrati. Il sistema è costituito da due domini che legano

l'ATP, due canali di membrana e un dominio legante il substrato, spesso presenti su peptidi separati (Fig. 1.3).

Solitamente, nei sistemi ABC batterici ritroviamo delle substrate binding proteins specifiche per le differenti molecole, mentre nei micoplasmi non è stato possibile trovarle. E' stata avanzata l'ipotesi che non siano state rinvenute perché molto differenti da quelle batteriche, ma la recente caratterizzazione di un sistema ABC di *Mycoplasma fermentans* (Higgins, 2001) ha parzialmente chiarito la questione: uno dei componenti del sistema era una lipoproteina di superficie, che probabilmente aveva la funzione di legare i substrati ed era soggetta a variazioni di fase; questo fenomeno verosimilmente le conferiva una variabile specificità di legame e di trasporto del substrato.

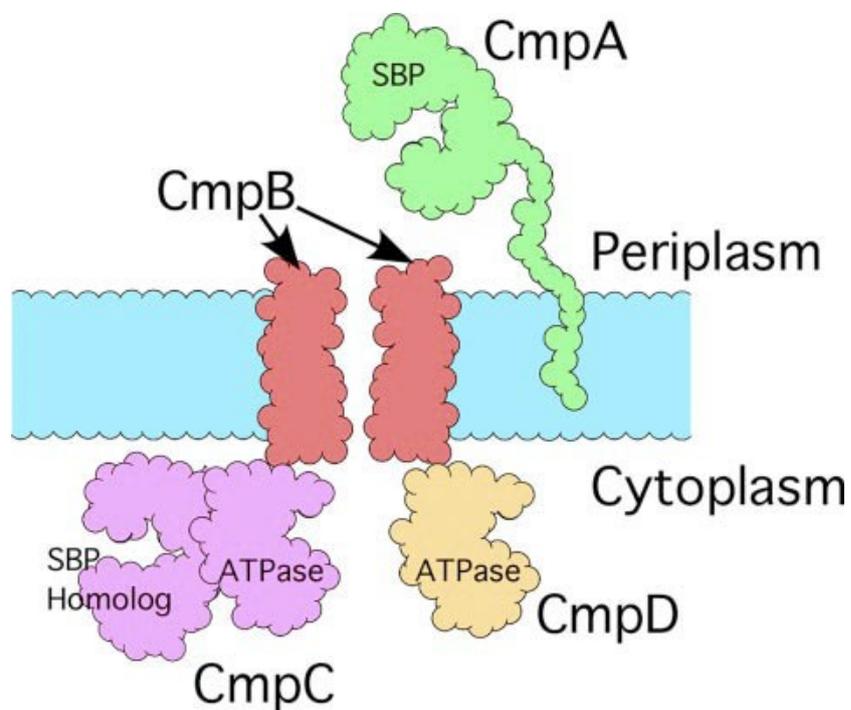


Fig. 1.3: Organizzazione di un ABC transporter nei micoplasmi

Un altro importante sistema di trasporto ritrovato nei micoplasmi è il sistema PTS (Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase Transport System),

identificato nei Mollicutes parecchi anni or sono, e deputato al trasporto di zuccheri.

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

Da quanto detto si può desumere che un'eccessiva riduzione del patrimonio genetico porta a una maggiore dipendenza dall'ospite per le risorse e quindi ad uno stile di vita strettamente parassitario. Il parassitismo è reso possibile da sofisticati meccanismi che permettono di colonizzare i tessuti dell'ospite sfuggendo al sistema immunitario; la principale di queste strategie è costituita dalla continua variazione del sistema antigenico di superficie (Kelley & Wise, 2002; Robertson & Meyer, 1992; Rosengarten & Wise, 1990; Yogeve *et al.*, 1991). Possiamo quindi affermare da quanto sopra esposto che la condizione di parassiti obbligati cui l'evoluzione naturale ha costretto i micoplasmi sia geneticamente determinata dalla drastica riduzione del patrimonio genetico, una scelta che potrebbe apparire estremamente svantaggiosa ma che in realtà ha permesso a questi microorganismi un'ampissima diffusione in tutto il globo.

La condizione di parassiti obbligati che determina una notevole limitazione delle capacità di sopravvivenza e crescita dei micoplasmi al di fuori di una cellula ospite rende artificiosa anche la loro coltivazione in vitro e di conseguenza influenza negativamente le possibilità di studio di questi microrganismi.

1.2 Coltivazione in vitro

Il maggior impedimento nella ricerca e nelle diagnosi di laboratorio delle infezioni da micoplasmi è data dalle difficoltà di coltivazione in vitro. Infatti, a causa del loro genoma piuttosto ridotto i micoplasmi non possono sintetizzare diversi metaboliti che sono necessari per la loro sopravvivenza, per cui vivono in uno stato di parassitismo obbligato.

Per ovviare a questi inconvenienti vengono utilizzati dei complessi terreni di coltura che, generalmente, contengono: estratto di cuore bovino, peptone, estratto di lievito, siero e vari supplementi (Razin, 1991). Alcuni membri della classe dei Mollicutes possono essere coltivati in laboratorio solamente in co-coltura con linee cellulari eucariotiche (Jensen *et al.*, 1996). In coltura su terreno solido (in condizioni di aerobiosi, a 37 °C e ad un pH compreso tra 7.6 e 7.8), i micoplasmi necessitano di un punto di ancoraggio nello spessore dell'agar per iniziare la replicazione; a partire da questo punto si verifica un'espansione radiale delle colonie, che assumono un aspetto tipico a “uovo fritto” (Rottem & Kahane, 1993). Queste colonie presentano un centro chiamato “centro di approfondimento”, circondato da un anello piatto e traslucido simile ad un velo (Farina & Scattozza, 1998; Timoney *et al.*, 1992) (Fig. 1.4)

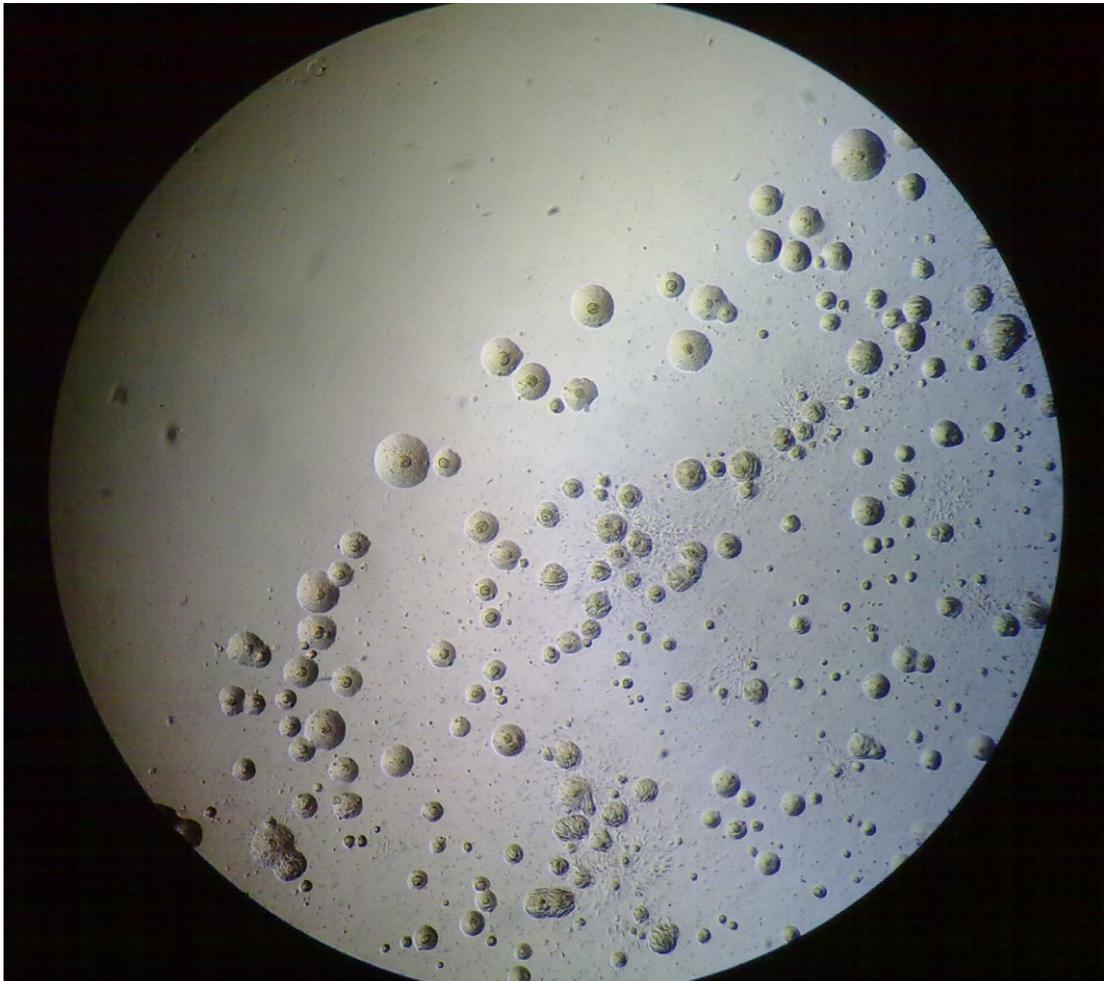


Fig. 1.4 Colonie di *Mycoplasma agalactiae* su terreno solido

1.3 Invasività e patogenicità

L'importante riduzione del genoma che ha interessato i Mollicutes nel corso della loro evoluzione può essere incompatibile con la vita degli stessi microrganismi. Per un microrganismo che vive in così stretto rapporto con l'ospite la natura deve sicuramente aver previsto meccanismi alternativi che giustifichino il successo evolutivo di queste forme microbiche. Questa condizione di parassiti stretti si spiega anche con la maggior incidenza di forme d'infezione cronica che favoriscono una più duratura convivenza tra micoplasma e organismo superiore. Oltretutto c'è da considerare che spesso le conseguenze più gravi legate all'infezione da micoplasmi sono dovute alla reazione del sistema immunitario piuttosto che all'azione diretta del microrganismo. Effettivamente nella stragrande maggioranza degli appartenenti alla classe Mollicutes la produzione di enzimi o tossine ad azione lesiva sui tessuti dell'ospite risulta essere pressoché nulla. Più che altro il loro "arsenale" è limitato alla produzione di H₂O₂ e di altri radicali ossigenati, responsabili di alterazioni nel movimento delle ciglia delle cellule eucariote e di gravi lesioni alle membrane cellulari.

Comprovata invece la presenza di annessi simili a braccia prospicienti dal corpo del microrganismo utili nell'ancoraggio. Esse sono state riscontrate in *M.pneumoniae*, *M.gallisepticum*, *M.hominis* e *M.hyopneumoniae* (Fig 1.5).

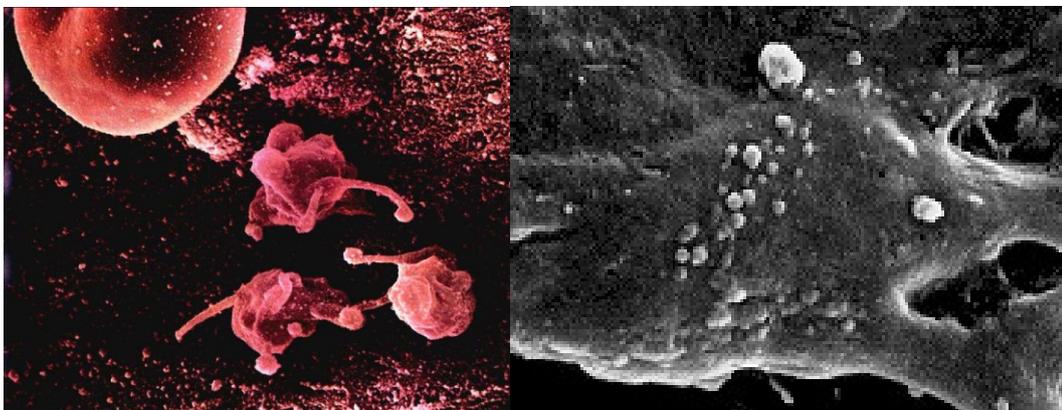


Fig. 1.5: Strutture di adesione presenti in *Mycoplasma hominis*

Alcune di queste strutture sono state identificate e sono stati sequenziati i geni che codificano per esse. Due adesine appartenenti al *M. pneumoniae* ed al *M. genitalium*, denominate P1 e MgPa, confrontate tra loro, sono risultate molto simili; esse sono costituite da delle proteine di membrana che possiedono sulla superficie cellulare dei siti di ancoraggio per specifici recettori posti sulla cellula dell'ospite. Il sequenziamento dei geni di queste due adesine ha messo in evidenza la presenza di numerose sequenze ripetute in una percentuale che va dal 4,7% all'8% dell'intero genoma a seconda del micoplasma considerato. Apparentemente questa presenza di sequenze ripetute prive di significato contrasta con l'idea di genoma ridotto al minimo essenziale dei micoplasmi; si è invece scoperto che queste sono fondamentali per il microorganismo quando è sottoposto a pressione immunitaria, in quanto grazie ad esse si può realizzare un riassortimento genetico casuale (Fraser *et al.*, 1995, Himmelreich *et al.*, 1996, Himmelreich *et al.*, 1997) che determina l'espressione di nuovi epitopi che permettono al micoplasma di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

I micoplasmi mostrano una specificità d'ospite piuttosto stretta, dovuta con ogni probabilità alle particolari richieste nutrizionali alle quali la vita parassitaria li obbliga; esistono, comunque, numerosi esempi della loro presenza in ospiti e tessuti diversi dai loro normali habitat. I tessuti elettivi dei micoplasmi parassiti dell'uomo e degli animali sono le superfici delle mucose degli apparati respiratorio e urogenitale, gli occhi, il canale alimentare, le ghiandole mammarie e le articolazioni, è inoltre possibile una loro localizzazione intracellulare per brevi periodi, fatto che garantisce al microorganismo la protezione dal sistema immunitario dell'ospite nonché dall'effetto degli antibiotici, e che spiega, almeno in parte, la grande difficoltà nell'eradicare i micoplasmi su colture cellulari infette così come in vivo. Un esempio di localizzazione intracellulare è dato dal *Mycoplasma penetrans*, dal *M. genitalum*, e dal *M. hominis*: essi sono, infatti capaci di penetrare all'interno delle cellule umane sia in vivo sia in vitro, attraverso l'interazione con molecole di clatrina. In seguito all'ingresso dei

micoplasmi nella cellula ospite si verifica un riarrangiamento del citoscheletro mediato dai vari segnali.

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

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

Si pensa che il contatto tra i micoplasmi e la membrana della cellula ospite sia così stretto da dare origine o ad una fusione delle due membrane, oppure al passaggio tramite "iniezione" del contenuto citoplasmatico del micoplasma nella cellula ospite. Una fusione tra la membrana del micoplasma e quella della cellula ospite è teoricamente possibile, ma non ci sono ancora dati sperimentali che supportino questa teoria. La fusione delle due membrane potrebbe portare ad un'alterazione nella composizione e nella permeabilità della membrana della cellula ospite e permettere il diretto ingresso di enzimi idrolitici del parassita all'interno dell'ospite (Razin 1993).

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

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

Nonostante le sopra menzionate citoadesine giochino un ruolo prioritario nella cito-adesione, il processo appare multi-fattoriale, includendo anche un certo numero di proteine di membrana accessorie; queste proteine accessorie agiscono in concerto con gli elementi del citoscheletro per facilitare il movimento laterale e

la concentrazione delle molecole di adesina nel punto di attacco. Le prime adesine scoperte sono state quelle dei *M. penetrans* e *M. genitalium*; il contatto con la cellula può alterare e interferire con i meccanismi di trasporto della cellula ospite, per esempio, si sa che la distruzione dei canali per il potassio (K⁺) delle cellule ciliate dell'epitelio bronchiale, causata dal *M. hiopneumoniae*, depolarizza la membrana cellulare, con la conseguente stasi delle ciglia.

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

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

1.4 Interazione dei micoplasmi con il sistema immunitario

Per mantenersi nella condizione per loro ideale di parassiti obbligati i micoplasmi devono necessariamente far fronte all'azione del sistema immunitario dell'ospite e per preservarsi dalla sua azione essi sfruttano meccanismi molto complessi.

Una delle tecniche di contrasto di maggior successo adoperata da questi microrganismi è sicuramente basata sulla cosiddetta "plasticità fenotipica" (Razin S., 1998). La plasticità fenotipica è stata definita come l'abilità di un singolo genotipo a produrre più di una forma alternativa per ciò che concerne la morfologia, lo stato fisiologico ed il comportamento adottato in risposta alle condizioni ambientali.

All'interno di questa strategia rientra quindi il tipico comportamento dei micoplasmi che modificano le caratteristiche del sistema antigenico di superficie (Kelley & Wise, 2002; Robertson & Meyer, 1992; Rosengarten & Wise, 1990;

Yogev *et al.*, 1991) per eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario, favorendo così la colonizzazione dell'ospite.

Le molecole maggiormente antigeniche e immunodominanti in un micoplasma, essendo esso privo di parete e di spazio periplasmatico, sono perlopiù le lipoproteine che si trovano ancorate saldamente alla membrana plasmatica tramite catene di gruppi alicilici, è quindi a carico di queste proteine che si registrano le maggiori variazioni. Alla base delle variazioni osservate sulla superficie degli antigeni sono stati evidenziati due fenomeni: i microbi percepiscono i segnali dell'ambiente esterno e vi rispondono con l'espressione di geni della virulenza che portano alla sintesi di prodotti necessari per la sopravvivenza nell'ospite, oppure, la popolazione microbica può spontaneamente e casualmente generare diverse popolazioni cellulari con differenti fenotipi antigenici, degli "eterotipi" che sopravviveranno alle specifiche risposte dell'ospite capaci normalmente di eliminare il fenotipo predominante.

Lo scarso reperimento di geni che potrebbero codificare per molecole capaci di monitorare determinate condizioni ambientali rende maggiormente probabile l'ipotesi che le variazioni antigeniche siano casuali e spontanee (Razin S., 1998). Questa capacità è resa possibile dal fatto che i numerosi geni implicati nella produzione degli antigeni di superficie possano passare dalla forma ON a quella OFF e che ognuno di questi geni abbia la capacità di produrre differenti varianti in dimensione dello stesso prodotto, con conseguente ampio repertorio di varianti antigeniche.

Le numerose lipoproteine di superficie, le Vsps, ritenute essere le maggiori responsabili dell'attività antigenica dei micoplasmi, sono quindi soggette ad un'alta frequenza non coordinata di variazioni di fase (stato ON-OFF) e di dimensioni.

Oltretutto, è stato osservato come differenti ceppi di *Mycoplasma bovis* isolati in campo possiedano differenti geni *vsps*; questo fatto garantisce una ancor maggiore amplificazione delle possibilità di variazione fenotipica.

La variabilità antigenica di superficie non è il solo meccanismo con cui i micoplasmi interagiscono con il sistema immunitario dell'ospite, essi sono infatti

in grado di intervenire direttamente determinando fenomeni di immunosoppressione e di immunostimolazione.

I micoplasmi sono in grado di favorire la soppressione o la stimolazione policlonale dei linfociti T e B, l'aumento della citotossicità dei macrofagi, delle cellule natural killer e l'attivazione del complemento. La stimolazione del sistema immunitario in tutte queste forme può essere sia di tipo diretto che di tipo indiretto attraverso l'induzione alla sintesi di citochine up-regulating.

Dati recenti hanno stabilito che, sia in vivo sia in vitro, i micoplasmi stimolano i linfociti in maniera non specifica.

Tutta questa serie di azioni gioca sicuramente un ruolo importante nell'infiammazione da micoplasmi che molto deve al rapporto di sinergia o antagonismo nei confronti delle cellule del sistema immunitario. Le citochine indotte hanno un'ampio spettro di effetti sulle cellule eucariotiche e sono riconosciute come importanti mediatori delle patologie tessutali nelle malattie infettive. Sebbene i micoplasmi eludano la fagocitosi, sembra che interagiscano con i fagociti mononucleati e polimorfonucleati, inibendoli o stimolandoli, per mezzo di effetti mediati, direttamente o indirettamente, da citochine; molti micoplasmi inducono la produzione di citochine da parte delle cellule T (come le IL-2, IL-4 o l'interferone gamma). Queste citochine esercitano diversi effetti su fagociti e linfociti e spezzano l'equilibrio tra le popolazioni Th1 e Th2 dei linfociti CD4 (+), influenzando la direzione delle fasi effettrici della risposta immunitaria ed aumentando l'attività delle cellule natural killer (NK). La capacità di sincronizzare la produzione di citochine, nonché quella di certe specie di micoplasmi di indurre citochine sottoregolanti, gioca indubbiamente un ruolo importante nell'infiammazione micoplasma indotta e contribuisce all'instaurarsi di influenze sinergiche o antagoniste sulle cellule del sistema immunitario dell'ospite. Le molecole e i mediatori rilasciati dalle cellule in risposta ai componenti micoplasmatici o ai loro derivati, aumentano l'espressione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e II e l'adesione di costimolatori cellulari ai linfociti e alle cellule endoteliali, inducendo la "corsa" leucocitaria nel sito di infezione e causando danni tessutali. La

modulazione dell'attività di monociti e macrofagi è stata dimostrata in vitro nell'attività tumorale mediata dal TNF- α in diverse linee di cellule tumorali.

Alcuni micoplasmi, che possiedono il sistema arginina-diidrolasi, producono nell'organismo ospite una deplezione di questo aminoacido, fatto che si è mostrato responsabile di un certo grado di immunodepressione. La deplezione della L-arginina, aminoacido essenziale, ha provocato infatti in cellule in vitro un effetto immunodeprimente molteplice, che si è annullato aggiungendo arginina nel mezzo di coltura. In vivo la questione deve essere ancora esaminata approfonditamente, e per ora si è osservata una difficoltà nella riproduzione e nella sopravvivenza di linfociti umani localizzati in tessuti poveri di questo aminoacido come conseguenza di una precedente infezione sostenuta da micoplasmi idrolizzanti l'arginina.

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

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

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

all'organismo. Lo stesso fattore soppressivo rilasciato da *M. hyorhinis* si è anche dimostrato inibitorio nei confronti dei linfociti B di ratto stimolati con LPS di *E. coli*.

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

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

La stimolazione mitogenica policlonale dei linfociti non è limitata solamente ai linfociti del proprio ospite naturale, così che linfociti umani possono venire stimolati da micoplasmi animali e viceversa. I micoplasmi hanno dimostrato di esplicare questa attività mitogenica nei confronti dei linfociti B, linfociti T, cellule NK, monociti ed anche cellule polimorfonucleate.

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

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

Comunque, al momento attuale non si sono ancora identificati i componenti cellulari micoplasmatici capaci di indurre il rilascio delle citochine up-regulating;

si è solamente osservato che il rilascio di queste sostanze è indotto sia da microrganismi viventi che da batteri morti o da frazioni della membrana plasmatica.

Il sistema immunitario è quindi coinvolto nello sviluppo di lesioni e nell'esacerbazione dell'infiammazione e della malattia indotta dai micoplasmi; l'abilità mostrata da questi microrganismi nello stimolare linfociti e macrofagi o comunque di turbare l'omeostasi del sistema immunitario, può portare allo sviluppo di patologie autoimmuni.

Al momento attuale tuttavia non si conoscono le componenti microbiche specificatamente impegnate nella interazione con il sistema immunitario dell'ospite. Resta comunque il fatto che spesso proprio l'attivazione delle cellule dell'infiammazione complica e peggiora il quadro clinico delle infezioni da micoplasmi, determinando sconvolgimenti tali sull'omeostasi del sistema immunitario da determinare nei casi più gravi lo sviluppo di patologie autoimmuni.

Capitolo 2

Agalassia contagiosa

2.1 *Mycoplasma agalactiae* e Agalassia Contagiosa

Mycoplasma agalactiae è l'agente eziologico responsabile dell'Agalassia Contagiosa, una patologia cosmopolita ad andamento acuto, subacuto o cronico che colpisce i piccoli ruminanti. Questa malattia è conosciuta da almeno due secoli (Zavagli, 1951), in Italia venne descritta per la prima volta nel 1816 da Metaxa e il nome "Agalassia Contagiosa" le venne attribuito da Brusasco nel 1871 (Madanat A *et al.*, 2001). Come già precedentemente affermato si tratta di una patologia cosmopolita la cui presenza è stata stimata in ben 31 Paesi nei diversi continenti, fatta eccezione per l'Oceania in cui pare non essere presente. E' endemica nelle regioni del bacino del Mediterraneo (Bergonier *et al.*, 1997; Lambert, 1987), in Africa, in Asia e negli Stati Uniti, mentre nel resto del continente americano la sua presenza è riferibile ad episodi sporadici (Bergonier *et al.*, 1997; Lambert, 1987). In Sardegna i primi casi vennero segnalati intorno ai primi anni '80 quando la patologia venne probabilmente importata dalla Sicilia attraverso l'acquisto di alcuni arieti. L'agente eziologico venne invece isolato nel 1923 da Bridre e Donatien e denominato inizialmente *Anulomices agalaxie*, nome che venne poi mutato definitivamente da Freundt nel 1957 in *Mycoplasma agalactiae*. Nelle pecore questo microrganismo è stato segnalato come classico agente di Agalassia contagiosa (Bergonier, 1977), ma simili danni sono stati attribuiti nelle capre ad altre specie di micoplasmi (Sarris, 1996; Bergonier, 1997; Nicholas, 1996) inclusi nel cluster micoides, come ad es. *M. mycoides subsp. Mycoides large colony (LC)*, *M. capricolum subsp. Capricolum*, *M. mycoides subsp. Capri* e perfino *M. putrefaciens*.

M. agalactiae è un batterio polimorfo di 120-250 nm con un genoma molto ridotto di 877438 bp (Pascal S.P. *et al.*, 2007), privo di parete cellulare e quindi insensibile all'azione della penicillina e dei suoi analoghi ma fortemente condizionato dagli stress osmotici e dall'azione dei più comuni disinfettanti, in grado di distruggerlo in 15-20 min. Cresce sia nei terreni solidi che in quelli liquidi previa aggiunta di colesterolo. Aerobio, non fermenta il glucosio ma idrolizza l'arginina e l'urea. Decisamente sensibile alle alte temperature, viene inattivato in 5 minuti a 60°C e in 1 minuto a 100°C, sopravvive invece per 4 mesi a 8°C e per 8- 9 mesi a -20°C. Sensibile all'azione degli UV. *M.agalactiae* ha un triplice tropismo: mammario, articolare, oculare, ma sono possibili anche localizzazioni respiratorie e genitali. Il contagio avviene da animale ammalato ad animale sano principalmente per contatto diretto attraverso il latte, le secrezioni lacrimali e secondariamente attraverso feci e urine oppure può avvenire per contatto dell'animale sano con portatori asintomatici che possono fungere da serbatoi del patogeno per diversi anni. Anche il sangue può costituire un mezzo di diffusione del patogeno, anche se meno frequentemente, soprattutto a seguito di interventi chirurgici, marchiatura, tosatura a forse anche attraverso artropodi ematofagi. L'infezione ambientale è decisamente meno importante vista la scarsa resistenza del microrganismo nell'ambiente esterno. Nei portatori sani il micoplasma si riscontra prevalentemente nei condotti uditivi esterni, tonsille, bocca, naso e vulva. La via d'infezione più frequente rimane quella intracanalicolare mammaria durante il processo di mungitura, sia esso manuale che meccanico. L'infezione si trasmette nei diversi allevamenti per contatto diretto anche a seguito dell'introduzione di nuovi capi infetti, in particolare di riproduttori. L'insorgenza della malattia in allevamento dipende dalla specie animale con cui si ha a che fare, essendo per esempio una patologia più grave e complessa nei caprini piuttosto che negli ovis, ma anche dall'età, con i soggetti più giovani sicuramente più sensibili degli adulti. Importante anche lo stato fisiologico, laddove le femmine gravide e in lattazione sono maggiormente a rischio e naturalmente lo stato immunitario (è presente una certa resistenza alle reinfezioni). Altri fattori che favoriscono l'infezione possono essere lo stato degli

ambienti di stabulazione degli animali e degli ambienti di mungitura, con particolare attenzione all'igiene e al corretto funzionamento della mungitrice meccanica. Da non trascurare la maggiore suscettibilità degli animali esposti a eventuali stress ambientali, gestionali (tosatura precoce), e alimentari.

Se non si attuano interventi radicali la persistenza dell'Agalassia contagiosa in allevamento è di diversi mesi, con forte tendenza al ripresentarsi della sintomatologia clinica nelle lattazioni successive sugli stessi animali o su capi diversi. Al primo contatto di *Mycoplasma agalactiae* con un gregge si manifestano rapidamente i sintomi più tipici della malattia, in concomitanza con il periodo dei parti e l'inizio della lattazione (Gil *et al.*, 2003, Real *et al.*, 1994, Szeredi *et al.*, 2003) con persistenza per diverse settimane o anche per mesi (DaMassa *et al.*, 1987, Gil *et al.*, 2003, Sanchis *et al.*, 2000). La terapia non è in grado di determinare l'eliminazione del microrganismo e ciò garantisce di fatto la persistenza del patogeno nel gregge ed il ripresentarsi della malattia nelle lattazioni successive in quello stesso allevamento (Villalba *et al.*, 1992). Per esempio in alcune aziende ovine monitorate per ben sette anni si è rilevato l'alternarsi di periodi di evidente presenza del patogeno ad altri nei quali non si riusciva nemmeno ad isolarlo (Corrales *et al.*, 2007). Il pericolo, dal punto di vista epidemiologico, giunge proprio dalla capacità del micoplasma di rendersi "invisibile" per alcuni periodi di tempo per poi manifestarsi anche dopo vari anni con vere e proprie epidemie.

I sintomi clinici più caratteristici sono quelli che vanno a costituire la cosiddetta triade caratterizzata da episodi di artrite, cheratocongiuntivite e mastite, in realtà raramente presenti simultaneamente nello stesso animale. Inizialmente i sintomi sono ben poco caratteristici: debolezza, calo dell'appetito, febbre, lievi problemi neurologici, diarrea. Se al contrario sono tanto pronunciati da condurre l'animale ad uno stato di emaciazione, la morte può sopraggiungere rapidamente senza che si possa avere il minimo sospetto di infezione da micoplasmi (Gil *et al.*, 2003, Sanchis *et al.*, 1998 e 2000, Szeredi *et al.*, 2003). Se invece questa prima fase si svolge in maniera meno turbolenta la patologia assume tratti più caratteristici. In un eventuale coinvolgimento mammario si evidenzia un brusco calo della

produzione latte che può essere da modesto a totale, assunzione da parte del secreto mammario di un colorito giallastro dovuto alla leucocitosi e abbondante presenza di grumi che possono determinare anche l'ostruzione del capezzolo. Altre volte invece il secreto si presenta apparentemente normale, altre ancora decisamente più liquido o ancora con presenza di sangue.

La mastite generalmente è bilaterale con mammelle calde e dolenti al tatto nella fase acuta associate a ipertrofia dei linfonodi mammari.

Nelle fasi avanzate il processo infiammatorio lascia spazio alla sclerosi del parenchima che determina un'evidente indurimento e presenza di noduli (Gil *et al.*, 1999 e 2003, Hasso *et al.*, 1994, Sanchis *et al.*, 2000), (fig. 2.1)



Fig 2.1. Mastite da *M. agalactiae* (da: Castro-Alonso A. et al. 2008)

Le forme articolari possono determinare rigidità articolare, claudicazione, fino alla completa impossibilità al movimento e al mantenimento della stazione quadrupedale. L'inflammazione più frequentemente si registra a carico di carpo, tarso e ginocchio con artriti e poliartriti (Fig. 2.2).



Fig 2.2. Artrite da *M. agalactiae* (da: Castro-Alonso A. et al. 2008)

A livello oculare caratteristica la cheratocongiuntivite che può assumere carattere mono o bilaterale con lesioni talmente gravi da poter esitare nella completa cecità (Fig. 2.3).



Fig 2.3 Cheratocongiuntivite da *M. agalactiae* (da: Castro-Alonso A. et al. 2008)

Sono state riscontrate poi altre forme di malattia con coinvolgimento dell'apparato respiratorio: esse variano da episodi di semplice tosse fino a vere e proprie polmoniti fatali, soprattutto nei giovani soggetti. Negli adulti infatti i sintomi respiratori sono poco evidenti, talvolta mascherati dalla gravità delle lesioni a

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

L'aborto è un evento sporadico ma segnalato che spesso lascia come evidenza lesioni a carico dell'apparato genitale (DaMassa *et al.*, 1987, Gil *et al.*, 1999, Villalba *et al.*, 1992, Szeredi *et al.*, 2003).

In moltissime realtà la malattia rimane comunque asintomatica (Corrales *et al.*, 2004, Gil *et al.*, 1999). A causa della sua elevata morbilità e delle grosse perdite economiche che essa provoca, l'Agalassia Contagiosa è stata inserita nella lista B delle malattie dall'O.I.E. Oltre alle perdite di produzione latte, si devono tenere in conto le perdite economiche dovute alle terapie e al costo d'acquisto dei capi da rimonta. Oltretutto è proprio su questa categoria di animali, soprattutto la prima volta che la malattia compare in allevamento, che si registrano i danni maggiori; spesso le artriti e le cheratocongiuntiviti colpiscono in maniera tale da costringere l'allevatore ad abbattere gli animali, irrecuperabili con la terapia. Il patogeno è comunque sensibile ad antibiotici della classe dei macrolidi e delle tetracicline, ma questa terapia, come già detto, è efficace solo ad attenuare i sintomi clinici, non risulta invece sufficiente ad eradicare il patogeno. Gli anticorpi compaiono 10-15 giorni dopo l'infezione, l'acme si ha dopo 4-6 settimane e la loro presenza a livelli elevati è evidenziabile per oltre 3 mesi.

2.2 Strategie di controllo dell'Agalassia Contagiosa

Come abbiamo evidenziato anche poco sopra, il tipico comportamento di *Mycoplasma agalactiae* rende molto difficile contrastarne la diffusione, specie nelle aree dove la patologia è endemica. Il fatto che il microrganismo si manifesti ad ondate dopo diverso tempo dagli ultimi episodi conclamati, addirittura dopo anni, rende arduo impostare una strategia di controllo. Addirittura diversi allevamenti riconosciuti come ufficialmente indenni non lo sono affatto e questo

proprio per la grande difficoltà con cui si riesce ad identificare il microrganismo, specie in presenza di soggetti asintomatici.

Per questi motivi la prevalenza della malattia risulta essere sottostimata in quasi tutto il mondo (Corrales *et al.*, 2007).

Quindi il primo problema è proprio quello di mettere a punto sistemi diagnostici efficaci nel rivelare la presenza del patogeno in una data realtà. Nel momento in cui il micoplasma fa il suo ingresso in un allevamento, condizione che espone l'azienda alle perdite maggiori, le strategie da attuare nel contrasto alla Agalassia differiscono a seconda che si tratti di aziende poste in aree ufficialmente indenni o meno: nel primo caso si dovrebbe optare per l'abbattimento dell'intero gregge e la disinfezione dei locali; al contrario nel caso di greggi localizzate all'interno di aree endemiche le possibilità sono diverse, con priorità assoluta per la terapia e poi per la vaccinazione.

In realtà il problema però sta proprio nel fatto che la cura antibiotica per quanto scrupolosa non è in grado di determinare la scomparsa del patogeno ma solo la remissione dei sintomi, creando tra l'altro tutti i presupposti per il mantenimento della malattia in forma subclinica.

Per quanto riguarda la cura antibiotica, basata fondamentalmente su macrolidi quali la tilosina, l'eritromicina e la spiramicina, i lincosamidi, la lincomicina, i chinoloni, l'enrofloxacin, e le tetracicline (Loria *et al.*, 2003), in un gregge colpito per la prima volta dal micoplasma va estesa a tutti gli animali per ridurre le possibilità di resistenza del microrganismo.

Se agli antibiotici si associano composti antiinfiammatori steroidei e non, si ottiene una importante riduzione della sintomatologia ed il recupero della produzione latte. Per gli animali che non rispondono alla terapia medica si rende necessario il ricorso all'abbattimento o all'isolamento.

L'attenzione massima va riservata poi alla disinfezione dei locali e delle attrezzature di mungitura, alle operazioni di dipping post mungitura e al controllo dei parametri di funzionamento delle mungitrici (vuoto e numero di pulsazioni) per limitare la formazione di microtraumi mammari.

Invece negli allevamenti nei quali la malattia è cronica sono indispensabili alcune pratiche di routine, quali un trattamento antibiotico profilattico nei confronti del micoplasma al momento della messa in asciutta degli animali e uno nel *post partum*. Sarebbe anche importante riuscire ad evitare le infezioni nella rimonta e per questo, al momento attuale, l'unica soluzione per evitare la malattia nei giovani è la vaccinazione.

I vaccini rappresentano sicuramente il principale strumento di lotta per il controllo delle malattie infettive e se correttamente ideati e applicati potrebbero costituire, anche in questo caso, un'importante premessa per l'eradicazione della patologia. Attualmente però vengono impiegati per la vaccinazione contro *Mycoplasma agalactiae* vaccini spenti preparati a partire da ceppi isolati da allevamenti infetti, incapaci di replicarsi nell'ospite ma con potere immunogeno conservato, e adiuvati con idrossido di alluminio. Questi vaccini inducono una risposta immunitaria di breve durata (4-5 mesi) e soltanto di tipo umorale. Peccano quindi dal punto di vista della stimolazione dell'immunità cellulo-mediata, responsabile di un'immunizzazione durevole, specifica ed efficace. Inoltre, a complicare e rendere inconciliabili le attuali campagne di vaccinazione contro l'agalassia contagiosa con i possibili futuri piani di eradicazione, concorre l'assoluta impossibilità nel distinguere un animale vaccinato da uno infetto.

Per questa ragione sarebbe opportuno percorrere nuove strade, rappresentate ad esempio dai vaccini di nuova generazione, che rendano compatibile la pratica della vaccinazione con l'eradicazione della patologia.

2.3 Diagnosi delle infezioni sostenute da micoplasm

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

Coltura in vitro

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

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

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

Identificazione biochimica:

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

- Catabolismo del glucosio
- Idrolisi dell’arginina
- Riduzione del sale di tetrazolo
- Inibizione della crescita, inibizione metabolica e inibizione della formazione di film (Hill, 1977; Thorns, 1978; Boothby *et al.*, 1981)
- Immunofluorescenza e immunoistochimica, che permettono di evitare le contaminazioni (Muenster *et al.*, 1979; Knudtson *et al.*, 1986; Gourlay *et al.*, 1989; Reilly *et al.*, 1993; Adegboye *et al.*, 1995)
- ELISA: permette il rilevamento degli antigeni tramite l’utilizzo di un siero immune di coniglio o di anticorpi monoclonali (Nielsen *et al.*, 1987; Brown *et al.*,

1990; Heller *et al.*, 1993; Ball *et al.*, 1994); è possibile effettuare anche la ricerca di anticorpi specifici nel sangue o nel latte (Byrne *et al.*, 2000)

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

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

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

PCR: sicuramente è la tecnica più sensibile e più specifica per la diagnosi. Utilizzata generalmente dopo l'isolamento su terreno liquido o solido del micoplasma, essa consente di effettuare oltre alla diagnosi, delle indagini biomolecolari mirate, volte a mettere in evidenza ad esempio determinati sottotipi di un micoplasma.

Capitolo 3

I vaccini

3.1 Generalità sui vaccini

Il vaccino è una preparazione contenente microrganismi patogeni uccisi, inattivati o anche solo antigeni altamente immunogeni purificati appartenenti ad essi che, inoculati in un soggetto sano, sono in grado di stimolare il sistema immunitario preparandolo ed “istruendolo” a reagire contro un determinato patogeno. Sconfitta questa infezione simulata le cellule responsabili della risposta immunitaria mantengono memoria dell’infezione stessa rendendosi così capaci in futuro di agire più prontamente nei confronti di una seconda eventuale infezione causata anche dal patogeno vivo e vitale.

La loro scoperta si deve al medico inglese Jenner che nel 1796 utilizzò il virus del vaiolo bovino in una persona che poi risultò immune all’infezione da virus del vaiolo umano. Un secolo più tardi fu la volta di Pasteur e del suo vaccino antirabbico.

Si dovette attendere però l’avvento del 1930 per vedere questa pratica impiegata su gran parte della popolazione attraverso il ricorso a preparazioni contenenti batteri e virus inattivati, uccisi o resi incapaci di malattia (Sabin ed il suo vaccino contro la poliomielite negli anni 50).

Dopo i rapidi progressi di quegli anni, durante i quali furono prodotti diversi vaccini attivi contro numerosi patogeni dell’uomo e degli animali, si verificò un netto arresto in questo campo, dovuto all’incapacità di far fronte ad alcuni microrganismi con le tecnologie all’epoca disponibili. Effettivamente al tempo si poteva far ricorso esclusivamente ai cosiddetti vaccini inattivati o spenti e ai vaccini vivi attenuati.

I primi sono di fatto costituiti da microorganismi coltivati in vitro e inattivati con diversi metodi fisico-chimici (formaldeide, acetone, fenolo, calore, ecc...) che determinano l'uccisione del microbo senza però causare alterazioni al suo corredo antigenico. Sebbene altamente sicure, queste preparazioni non sempre risultano capaci di indurre un'adeguata risposta immunitaria nell'ospite con la conseguente necessità di dover ricorrere a diverse somministrazioni di richiamo.

I vaccini vivi attenuati sono realizzati con patogeni coltivati in vitro e attenuati attraverso vari sistemi, come per esempio la coltivazione su ospite eterologo, che determinano la perdita della virulenza senza incidere sulle capacità di induzione immunitaria (tanto è vero che necessitano di una sola applicazione). Tuttavia con questa metodica è plausibile il rischio di una reversione e di un ripristino della virulenza originaria o ancora, in caso di virus a genoma segmentato come il virus della Bluetongue e i virus influenzali, resta la preoccupante evenienza di riassortimento con virus correlati e produzione di nuove varianti anche altamente patogene.

Fu solo intorno agli anni '80 che l'avvento dell'ingegneria genetica permise di battere nuove strade nella realizzazione dei vaccini, rendendone in teoria possibile la realizzazione in numero illimitato e contro qualsiasi patogeno (1986).

Con la tecnica del DNA ricombinante la produzione dei vaccini ha potuto contare su maggior sicurezza e efficacia con la realizzazione di prodotti altamente affidabili, ottenuti sfruttando l'attività di vettori capaci di incorporare ed esprimere geni eterologhi codificanti per antigeni appartenenti ai microorganismi patogeni. In questo modo si ottengono dei vaccini molto affidabili che uniscono ai vantaggi caratteristici dei vecchi vaccini vivi attenuati una maggiore sicurezza derivata dall'impossibilità alla reversione (non sono però utilizzabili su soggetti immunodepressi).

In alcuni casi però non è possibile ottenere il corretto folding dei peptidi al di fuori dell'ambiente originale e l'uso di un singolo determinante antigenico può non essere sufficiente ad indurre immunità protettiva.

Attraverso il ricorso ai vaccini a DNA, che sono realizzati a partire da vettori di espressione eucariotica su cui sono clonati geni codificanti per gli antigeni, si

pensa di raggiungere quindi un maggior grado di sicurezza ed efficacia rispetto alle precedenti tecniche di manipolazione diretta del microrganismo patogeno.

3.2 I vaccini a DNA

I vaccini a DNA costituiscono una delle più recenti scoperte in campo immunologico.

Essi associano ai vantaggi tipici dei vaccini attenuati un livello di sicurezza molto elevato. A differenza dei vaccini tradizionali infatti non sono costituiti da microrganismi o parti di esso ma esclusivamente da acido desossiribonucleico (DNA) che viene inoculato direttamente a livello di cellule eucariotiche. In particolare risultano costituiti da un gene di origine microbica codificante per una proteina dalle spiccate qualità antigeniche che viene inserito in un plasmide batterico che funge da vettore e che ne consente anche la replicazione.

Dopo la clonazione nel plasmide batterico il vaccino a DNA può essere iniettato nell'ospite per via intramuscolare, sottocutanea o per via diretta tramite Gene-Gun.

Giunto a livello cellulare il gene microbico viene espresso nelle cellule di mammifero sotto il controllo di un promoter eucariotico, in genere il promotore del CMV o RSV.

Nell'allestimento del vaccino a DNA risulta essenziale l'azione svolta dalle sequenze immunostimolatorie (ISS) tipiche del DNA plasmidico: si tratta di sequenze di Citosina-fosfato-Guanosina (CpG) non metilate, tipiche dei genomi batterici e raramente presenti nei genomi delle cellule eucariotiche. Queste sequenze sono capaci di determinare una reazione del sistema immunitario attraverso il riconoscimento da parte dei Toll-like receptor cellulari che mediano l'innescò della risposta immunitaria innata e adattativa (azione adiuvante endogena antigene indipendente, attivazione delle cellule presentanti l'antigene, attivazione dei linfociti B, ecc...).

L'esatto meccanismo d'azione di questi vaccini in realtà non è ancora ben chiaro. Le cellule bersaglio della transfezione sono cellule somatiche e cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare cellule dendritiche.

Le prime stimolano in maniera non soddisfacente il sistema immunitario attraverso la presentazione di epitopi antigenici esposti per mezzo del sistema maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), come nelle cellule naturalmente infette.

Per avere però una risposta immunitaria efficiente e duratura si deve ricorrere alla transfezione delle APC's che presentano l'antigene ai linfociti T vergini, responsabili dell'innesco e della modulazione della risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata, in associazione all'MHC di classe II.

Le APC's, in particolare le cellule dendritiche, possono essere direttamente transfettate oppure possono venire in contatto con proteine sintetizzate e poi esposte in superficie dalle cellule somatiche, siano esse semplicemente esposte o ancora rilasciate a seguito di apoptosi. Una volta attivate le cellule dendritiche presentano gli epitopi sia ai linfociti T-CD4⁺, attraverso l'MHC-II, sia ai linfociti T-CD8⁺, attraverso l'MHC-I, stimolando anche la produzione anticorpale da parte dei linfociti B (Fig.3.1)

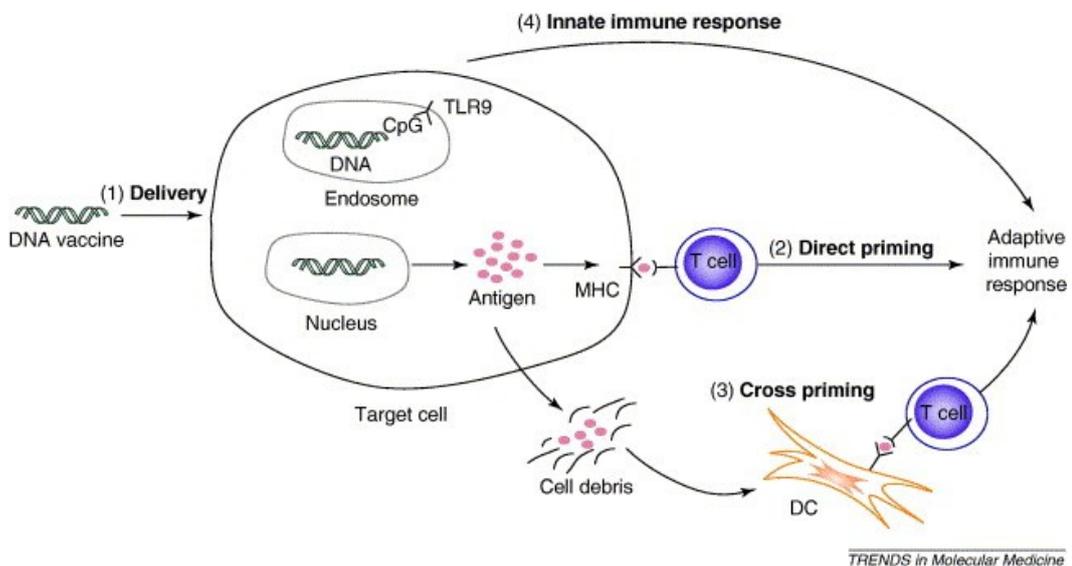


Fig. 3.1. Meccanismo d'azione dei vaccini a DNA

In poche parole i vaccini a DNA sono utilissimi nel provocare sia la risposta umorale che quella cellulo-mediata.

Si è osservato che il tipo e l'intensità dell'azione immunitaria variano non solo con il tipo di antigene scelto ma anche con il metodo e la via di somministrazione del vaccino.

Le vie più utilizzate sono sicuramente quella intramuscolare (IM) e quella sottocutanea mentre più innovativo è l'utilizzo di uno strumento chiamato Gene-Gun, che consente di "sparare" direttamente dentro le cellule il plasmide legato a delle particelle d'oro colloidale.

Nel topo con la via intramuscolare sono necessari almeno 10-100 µg di plasmide, 0,5-2,5 mg nei grossi animali, mentre con la Gene-Gun si utilizzano solamente 0,1-1 µg di plasmide, cioè dosi circa 100 volte inferiori per avere una risposta immunitaria dagli effetti sovrapponibili. Questa differenza è evidentemente legata alla notevole efficienza d'ingresso del DNA garantito dal sistema Gene-Gun: con questa metodica il plasmide, avvolto da particelle d'oro che lo proteggono quasi completamente dalla degradazione, penetra direttamente nelle cellule somatiche dell'ospite o nelle cellule presentanti l'antigene. Ciò consente di raggiungere livelli di efficienza e accuratezza sicuramente non comparabili con le normali metodiche di somministrazione (Dunham S.P., 2002).

La via di somministrazione non condiziona solo le dosi vaccinali necessarie ma ha una certa importanza anche nel determinare il tipo di risposta immunitaria che si attiverà principalmente dopo la vaccinazione.

La via intramuscolare privilegia una risposta Th1 con produzione di interferon-γ da parte dei linfociti T-helper e la secrezione di anticorpi della classe IgG2a (Robinson & Torres, 1997). Al contrario il metodo Gene-Gun favorisce la risposta immunitaria di tipo Th2, con produzione prevalente di IL4 da parte dei linfociti T-helper ed una secrezione di immunoglobuline della classe IgG.

In realtà esistono altre possibilità ideate per la somministrazione del vaccino a DNA, quali l'elettrovaporazione in vivo (Mir *et al.*, 1999), i dispositivi di rilascio del plasmide a livello mucosale (Barnes *et al.*, 2000) e ancora i sistemi di iniezione privi di ago (Van Rooij *et al.*, 1998), ma si può sicuramente affermare

che nessuna metodica si mostra superiore alle altre in senso assoluto, in quanto l'efficienza dei sistemi varia a seconda dei diversi patogeni e a seconda del tipo di immunità che si intende stimolare.

Oltretutto i vaccini di nuova generazione si prestano ad essere modificati e costruiti a seconda delle diverse necessità inserendovi eventualmente frammenti di DNA microbico capaci di proteggere l'ospite contemporaneamente contro più ceppi di uno stesso microrganismo.

Altra possibilità offerta da questa metodica è l'inserimento di sequenze geniche che codificano per molecole agenti da coadiuvanti biologici come nel caso dei geni responsabili della sintesi di alcune citochine (es. granulocyte macrophage colony-stimulating factor GM-CSF, interferon- γ e interleuchine), chemochine e fattori di co-stimolazione (es. B7.1, B7.2).. In questo modo si ottiene un tangibile miglioramento della risposta immunitaria umorale e persino cellulo-mediata, simulando ciò che nell'infezione naturale è determinato dalla stimolazione dei linfociti T-helper CD4⁺ e dalle APCs.

Oltre a questo, concorrono a stimolare la massiccia produzione di citochine le stesse sequenze di CpG non metilate ad origine batterica presenti nel plasmide.

Una strategia sfruttata per migliorare ulteriormente l'efficacia dei vaccini a DNA è il prime-boost: si basa su una prima vaccinazione con vaccini a DNA seguita dopo alcune settimane dal boost (richiamo) costituito da un antigene (e quindi una molecola proteica purificata, o anche un microrganismo inattivato).

Il protocollo vaccino a DNA-prime boost garantisce una risposta immunitaria superiore rispetto al richiamo con lo stesso vaccino a DNA (Ramshaw and Ramsay 2000, Gurunahan *et al.*, 2000).

Purtroppo però esistono ancora dei problemi legati all'utilizzo dei vaccini di nuova generazione, in particolare rappresentati dalla cessazione nella produzione antigenica già a partire dal primo mese successivo alla transfezione delle cellule e anche dalla bassa efficienza di trasformazione delle cellule in vivo.

Oltretutto appare evidente dalle sperimentazioni attuate una netta minor efficacia dei vaccini a DNA nei grossi animali rispetto a quanto risultato dagli studi sui topi, probabilmente legata a una deficienza della transfezione e ad un minor

livello di espressione suscitata dai plasmidi. Ancora da chiarire risultano inoltre la posologia e le metodiche che meglio garantiscano l'efficacia dei vaccini a DNA.

3.3 Vantaggi e limiti dei vaccini a DNA

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

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

E' possibile anche inserire all'interno del plasmide codificante l'antigene, sequenze geniche che fungono da veri e propri adiuvanti biologici, come ad esempio i geni codificanti per alcune citochine (es. granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon- γ e interleuchine), chemochine e fattori di co-stimolazione (es. B7.1, B7.2). Generalmente la produzione di queste citochine induce una migliore attivazione della risposta immunitaria generata dal vaccino a DNA, amplificando l'intensità sia della risposta umorale, che della risposta cellulo-mediata. Questo avviene perché lo sviluppo di una buona risposta immunitaria richiede l'intervento di molteplici segnali di stimolazione. Il primo segnale arriva dall'antigene, in secondo luogo poi intervengono o le citochine o dei fattori di co-stimolazione. Nel corso di una risposta immunitaria protettiva nei confronti di un patogeno, i segnali secondari vengono prodotti da cellule del sistema immunitario quali i linfociti T-helper CD4+ e dalle APCs.

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

La maggior parte degli studi in questo campo sono stati compiuti sui topi, mentre ancora risultano scarsi i dati riguardo all'uomo e agli animali da reddito. Alcune prove sono state fatte utilizzando geni che codificano per GM-CSF (Femenia *et al.*, 1994), Interferon- γ (Hosie *et al.*, 1998), interleuchina-2 (Nobiron *et al.*, 2000), interleuchina -12 (Hanlon *et al.*, 2001, Boretti *et al.*, 2000, Glansbeek *et al.*, 2002) e interleuchina 18 (Hanlon *et al.*, 2001) e da esse risulta evidente un miglioramento della risposta vaccinale.

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

Oltre a questi innumerevoli vantaggi però i vaccini a DNA presentano comunque ancora un gran numero di problemi, per esempio: ad un mese dalla somministrazione del vaccino a DNA la maggior parte delle cellule transfettate smette di produrre l'antigene. E' necessario quindi trovare un sistema che

permetta di migliorare la produzione di antigene da parte delle cellule transfettate che porterebbe ad una migliore risposta immunitaria, evitando però di favorire le aggressioni nei confronti dei tessuti sani. Un altro problema è legato alla bassa efficienza di trasformazione delle cellule in vivo, probabilmente questo aspetto verrà migliorato quando si stabiliranno quali siano le esatte dosi efficaci di vaccino da inoculare e quali le vie e i metodi di somministrazione più vantaggiosi.

Capitolo 4

Scopo del lavoro

Mycoplasma agalactiae è l'agente eziologico dell'Agalassia contagiosa, una patologia dei piccoli ruminanti che provoca danni ingenti nelle aree in cui viene praticato l'allevamento intensivo. In particolare la patologia si caratterizza per lo spiccato coinvolgimento dell'apparato mammario con mastiti che determinano ingenti cali di produzione, specie negli allevamenti in cui la malattia si presenta per la prima volta. Il quadro della sintomatologia si completa con frequenti episodi all'interno del gregge di cheratocongiuntivite, artrite e, sebbene meno frequentemente, con lesioni a carico dell'apparato polmonare e urogenitale e possibilità nelle femmine di aborto. Visti gli ingenti costi che questa patologia determina si è cercato di realizzare piani di eradicazione e di controllo che attualmente sono basati sull'utilizzo di vaccini spenti, in realtà efficaci solo nella induzione di una risposta anticorpale ed il cui utilizzo non permette, in seguito alla vaccinazione, la discriminazione tra animali vaccinati ed infetti. L'uso di norme igienico-sanitarie è importante ma non sufficiente ad impedire la diffusione della patologia, quindi è necessario affiancare a queste pratiche adeguati programmi di vaccinazione. L'uso dei vaccini inattivati ha riportato alcuni successi, ma questi presentano diversi svantaggi. Per ovviare alle limitazioni dei vaccini tradizionali

sembra quindi necessario sviluppare nuove strategie attraverso l'utilizzo di vaccini di nuova generazione, e tra questi, i vaccini a DNA potrebbero essere i candidati ideali.

In un precedente lavoro eseguito presso l'istituto di Malattie Infettive di Sassari era stato messo a punto un vaccino a DNA basato sul vettore pVAX1 (Invitrogen), codificante per l'antigene P48 di *M. agalactiae*. La P48 è una lipoproteina di membrana che fa parte di un sistema di trasporto attivo transmembrana chiamato ABC transporter, è espressa costantemente in tutte le fasi dell'infezione, ha una notevole immunogenicità ed è priva di variabilità intraclonale (Rosati *et al.*, 1999). La risposta immunitaria indotta dal vaccino era stata testata su topi BALBc. Nei topi vaccinati con il plasmide pVAX1/P48 venivano rilevati anticorpi IgG specifici per la rP48 appartenenti alla sottoclasse IgG1 ma non della sottoclasse delle IgG2. Nonostante questo, la proliferazione delle cellule CD4+, ed il profilo di espressione delle citochine in cellule della milza stimulate con l'antigene P48 purificato erano tipiche di una risposta immunitaria di tipo T_h1. Infatti nella cellule della milza dei topi vaccinati venivano rilevati elevati livelli di IFN- γ , IL-12 ed IL-2 caratteristici della risposta T_h1; negli stessi campioni era stato osservato un lieve incremento di IL-4 e, debolmente, dei due fattori di trascrizione T-BET e GATA-3, associati alla modulazione, rispettivamente, di T_h1 e T_h2. Insieme questi dati dimostravano che la vaccinazione con pVAX1/P48 induceva nei topi una risposta mista di tipo T_h1/T_h2, associata ad una debole risposta umorale e poteva rappresentare, con opportuni miglioramenti, un potenziale approccio nella messa a punto di vaccini contro *M. agalactiae* (Chessa *et al.*, 2009). Il difetto più grave del vaccino prodotto nel lavoro citato è rappresentato dalla scarsa stimolazione della risposta immunitaria umorale, con conseguente ridotta produzione di anticorpi circolanti specifici contro la P48 di *M. agalactiae* che dovrebbero essere necessari per una adeguata protezione contro la malattia.

Scopo di questo lavoro è la costruzione di un plasmide, da utilizzare per l'immunizzazione genetica contro *M. agalactiae* di ovini, che sia in grado di determinare la corretta espressione e la secrezione dell'antigene P48 da parte delle

cellule transfettate. Per fare questo il gene codificante per la proteina antigenica P48 di *Mycoplasma agalactiae* è stato clonato in fusione con una sequenza segnale in grado di indirizzare la proteina neosintetizzata nel pathway cellulare di secrezione. In questo lavoro è stata utilizzata la sequenza segnale presente nel gene che codifica per l'attivatore tissutale del plasminogeno umano (t-PA), una proteina che viene normalmente secreta dalle cellule che la producono. Il segnale di secrezione risiede in una singola e ristretta sequenza lineare di aminoacidi, detta "peptide segnale" che è esposta nella proteina ripiegata. La corretta espressione e la secrezione della proteina codificata dal vettore prodotto è stata valutata *in vitro* attraverso transfezione di cellule eucariotiche HEK293, RT-PCR e Western Blotting. Inoltre è stata valutata la reale efficacia immunizzante sull'ospite naturale dell'antigene P48 sperimentando in campo il vaccino a DNA così prodotto nonché la stessa proteina antigenica ricombinante.

Le due preparazioni sono state somministrate per mezzo di differenti sistemi, da sole o in combinazione tra loro. Allo scopo di verificare l'effettiva capacità protettiva delle preparazioni vaccinali è stato utile effettuare due diversi trial clinici. Nel primo sono state individuate le preparazioni vaccinali e le vie di somministrazione più efficaci; nel secondo trial clinico queste preparazioni sono state somministrate nel periodo in cui viene normalmente effettuata la vaccinazione contro l'Agalassia contagiosa, per testarne l'effettiva capacità protettiva. La risposta immunitaria verrà valutata attraverso la quantificazione della risposta anticorpale specifica per l'antigene P48 tramite ELISA e Western blot e attraverso valutazione della risposta cellulo mediata tramite analisi citofluorimetriche.

Capitolo 5

Materiali e metodi

5.1 Terreni e reagenti

- PBS 10X:

NaCl	80 g/L
KCl	2 g/L
Na ₂ HPO ₄	14.4 g/L
KH ₂ PO ₄	2.4 g/L

La soluzione viene portata a pH 7.4.

- TBS 1X:

Tris	2.42 g/L
NaCl	29.24 g/L

Portare a pH 7.5 con HCl.

- TPBS 1X:

Tween-20	0.5 ml
PBS	1 litro

- Blocking Solution

Gelatina	30 g/L
TBS	1 litro

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

▪ Antibody Buffer

Gelatina	10 g
TBS	1 litro

▪ HRP Substrates for Blotting

CN/DAB 10X	10 ml
Stable Peroxide Substrate Buffer	90 ml

▪ Terreno LB liquido:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
H ₂ OMQ	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

▪ Terreno LB agar:

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
Agar batteriologico europeo	14 g
H ₂ OMQ	a volume

La soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 5 M.

PPLO medium

PPLO broth	21 g/L
Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
Horse serum	20% v/v
H ₂ OMQ	to volume

Mycoplasma solid medium

Blood agar base	40 g/L
Horse serum	20% v/v
H ₂ OMQ	to volume

Running buffer

Tris	3.0275 g/L
Glycine	14.413 g/L
SDS	1 g/L

Transfer buffer

Tris	3.0275 g/L
Glycine	14.413 g/L
Methanol	20% v/v
H ₂ OMQ	to volume

Laemmli sample buffer

SDS	2% w/v
Glycerol	10% v/v
β- mercaptoethanol	5% v/v
Tris-HCl pH 6.8	0.0625 M
Bromophenol blue	0.002% w/v
H ₂ OMQ	to volume

▪ TAE buffer

Tris acetato	0.04 mM
EDTA	1 mM

▪ TE buffer:

Tris HCl	10 mM pH 8.0
EDTA	0.1 mM pH 8.0

Red Blood Cell Lysis buffer

NH ₄ Cl	0,16 M 9
Tris HCl	0,17 M pH= 7.6

Working Solution 9:1

La soluzione viene portata a pH 7.2 con HCl.

5.2 Costruzione dei plasmidi

Per questo studio sono stati utilizzati i vettori di espressione per cellule eucariotiche pVAX1 (Invitrogen), pJWtPA4303 (Ospedale Gemelli-Roma) (Fig.5.1) ed il vettore di espressione batterico pSer/rP48 (Rosati *et al.*, 2000). Il plasmide pJWtPA4303 contiene la sequenza segnale per la secrezione del gene dell'attivatore tissutale del plasminogeno umano (ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGG AGCAGTCTTCGTTTCGGCTAGC), questa può essere clonata in frame con un gene a valle utilizzando il sito di restrizione *NheI*.

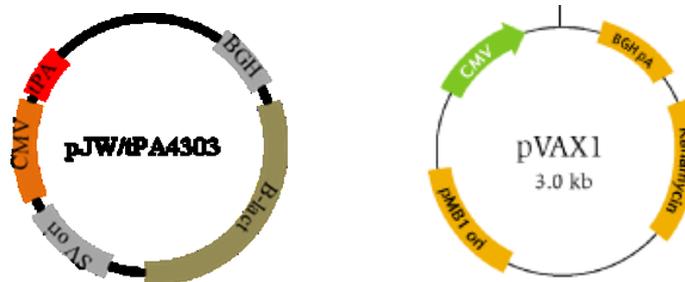


Fig. 5.1: Mappa dei vettori utilizzati per il clonaggio della p48 di *M agalactiae*

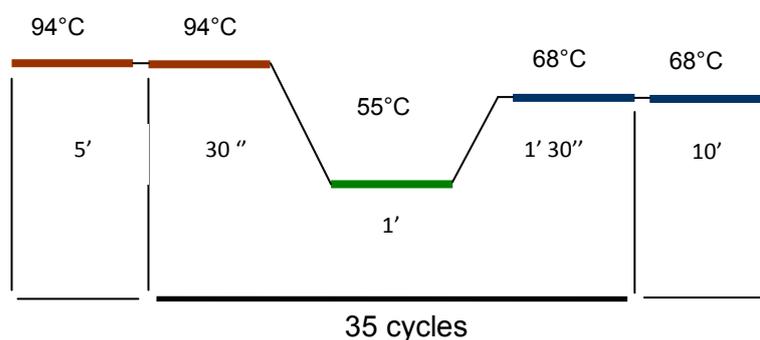
Il frammento di 1.3 Kb contenente il gene codificante per la P48 di *M. agalactiae* (senza il peptide leader) è stato isolato dal plasmide pGEX-2T/P48 mediante una reazione di PCR (Mastercycler Gradient Eppendorf) utilizzando la coppia di primers:

- **Primer F = P48/*NheI*/F**
5'-CTGGCTAGCGTAAAACTATTTCAACACTTGCA-3'
- **Primer R = P48/*BamHI*/end/R**
5'-GTGGGATCCTTATTTTCTTGTTTCAGAAGCC-3'

Per la reazione di PCR è stato utilizzata la Taq Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) allestendo una reazione con un volume finale di 50 µl:

Reagente	Quantità utilizzata	Concentrazione finale
Buffer 10 X	5 µl	1X
MgSO ₄	1 µl	200 µM
dNTP mix 10 mM	1,5 µl	0.2 µM
Primer F 10 mM	1 µl	0.2 µM
Primer R 10 mM	1 µl	1.25 U
Taq 5U/ml	0,5 µl	1X
pGEX-2T/P48 [15 mg/ml]	4 µl	15 ng

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



Il prodotto di PCR è stato controllato in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% ed in seguito è stato purificato con MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

1. Tagliare la banda dal gel e pesarla
2. Aggiungere 3 volumi di buffer QG ad 1 volume di gel (300µl per 100mg)
3. Incubare a 50°C per 10 min vortexando ogni 2-3 min
4. Aggiungere 1 volume di isopropanolo al campione e mischiare invertendo la provetta
5. Applicare il campione ad una colonna MinElute e centrifugare per 1 min a $\geq 10,000 \times g$
6. Lavare la colonna con 750 µl di buffer PE e centrifugare per 1 min
7. Centrifugare la colonna per un ulteriore minuto
8. Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 ml nuova
9. Aggiungere 10 µl di buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o acqua al centro della membrana lasciare in eluizione per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 min

L'amplificato così ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *NheI* e *BamHI*.

Il plasmide pJW/tPA4303 è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione ed in seguito è stato defosforilato con il kit Alkaline Phosphatase (Roche) per ridurre il tasso di ricircularizzazione. La defosforilazione è stata condotta aggiungendo alla soluzione contenente il vettore i seguenti reagenti:

Reagente	Quantità utilizzata
Dephosphorilation Buffer 10X	5 µl
Alkaline Phosphatase	4 µl
H ₂ O mq sterile	21 µl

Il campione è stato lasciato ad incubare un'ora a 37°C.

Il prodotto di digestione è stato separato su gel d'agarosio al 2%; la banda è stata tagliata e purificata con il kit MinElute Gel Extraction (Qiagen).

I prodotti di PCR digeriti sono stati purificati con il kit MinElute PCR purification (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

1. aggiungere 5 volumi di buffer PBI ad 1 volume del prodotto di PCR e miscelare
2. applicare il campione ad una colonnina MinElute e centrifugare per 1 minuto a $\geq 10,000 \times g$ e scartare l'eluito
3. aggiungere 750 μl di buffer PE alla colonnina e centrifugare per 1 minuto, scartare l'eluito
4. centrifugare la colonna per un ulteriore minuto alla massima velocità
5. Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 ml nuova
6. Aggiungere 10 μl di buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o acqua al centro della membrana lasciare in eluizione per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 min

I prodotti di PCR purificati sono stati quindi clonati nel vettore prescelto con il Rapid DNA Ligation Kit, secondo il seguente protocollo:

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

Il ceppo di *E. coli* DH5 α è stato trasformato con il plasmide così costruito mediante shock termico:

1. aggiungere 4 μl del plasmide ricombinante in una provetta contenente *E. coli* competenti
2. incubare in ghiaccio per 30 minuti
3. incubare a 42°C per 30 secondi -1 min
4. trasferire immediatamente la provetta con le cellule in ghiaccio

5. aggiungere 900 μ l di LB a temperatura ambiente
6. incubare in agitazione a 37°C per 1 ora
7. piastrare su LB agar addizionato con ampicillina (100 μ g/ml) ed incubare o/n

Le colonie ricombinanti antibiotico-resistenti sono state selezionate, messe in crescita in 3 ml di LB + ampicillina (100 μ g/ml) ed incubate o/n; il giorno seguente è stata effettuata una estrazione miniprep con il kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen):

1. pellettare i batteri
2. risospendere il pellet in 250 μ l di buffer R3
3. aggiungere 250 μ l di buffer L7 e miscelare invertendo le provette 5 volte
4. incubare per 5 min a temperatura ambiente
5. aggiungere 350 μ l di buffer N4 e miscelare immediatamente invertendo le provette finchè la soluzione non è omogenea
6. centrifugare il campione a $\geq 12,000 \times g$ per 10 min
7. applicare il surnatante alla colonnina e centrifugare il campione a $\geq 12,000 \times g$ per 1 min, scartare l'eluato
8. aggiungere 500 μ l di buffer W10 alla colonnina, incubare per 1 min a temperatura ambiente e centrifugare per 1 min a $\geq 12,000 \times g$, scartare l'eluato
9. aggiungere 700 μ l di buffer W9 alla colonna e centrifugare per 1 min a $\geq 12,000 \times g$ scartare l'eluato
10. centrifugare la colonna per un ulteriore minuto
11. Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 ml nuova
12. Aggiungere 75 μ l di buffer TE al centro della colonna, incubare per 1 min a temperatura ambiente e centrifugare per 2 min a $\geq 12,000 \times g$

I plasmidi purificati sono stati sottoposti a digestione di controllo con *NheI* e *BamHI*. Le colonie trasformate con il plasmide ricombinante sono state rimesse in coltura in 300 ml di terreno LB addizionato con ampicillina (100 μ g/ml) ed incubate a 37°C o/n; le colture batteriche sono state utilizzate per ottenere

preparazioni maxiprep con il kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Invitrogen) secondo il seguente protocollo:

1. *equilibrare la colonna applicando 30 ml di buffer EQ1, lasciare eluire per gravità*
2. *pellettare la coltura batterica*
3. *risospendere il pellet 10 ml di buffer R3*
4. *aggiungere 10 ml di buffer L7, mescolare invertendo le provette 5 volte e incubare a temperatura ambiente per 5 min*
5. *aggiungere 10 ml di buffer N3 e mescolare immediatamente invertendo i tubi finchè la soluzione non è omogenea*
6. *centrifugare a >12,000 x g per 10 min a temperatura ambiente*
7. *trasferire il surnatante nella colonna precedentemente equilibrata, lasciare eluire per gravità*
8. *lavare la colonna con 60 ml di buffer W8 lasciare eluire per gravità*
9. *collocare una provetta da centrifuga da 30 ml sotto la colonna e aggiungere 15ml di buffer E4 alla colonna*
10. *scartare la colonna*
11. *Aggiungere 10,5 ml di isopropanolo alla provetta e mescolare*
12. *Centrifugare a >15,000 x g per 30 min a 4°C, rimuovere il surnatante*
13. *Risospendere il pellet di DNA in 5 ml di etanolo al 70% e centrifugare a >15,000 x g per 5 min a 4°C, rimuovere il surnatante*
14. *Lasciare asciugare all'aria il pellet per 10 min*
15. *Risospendere il pellet in 200 µl di buffer TE*

Dal plasmide così ottenuto è stato amplificato il tratto tPA_RP48 di 1400 bp utilizzando i seguenti primer:

- **Primer F = tPABamHI/Kozak/ATG/F**
5'- CTGGGATCCTATGGATGCAATGAAGAGAGGG -3'

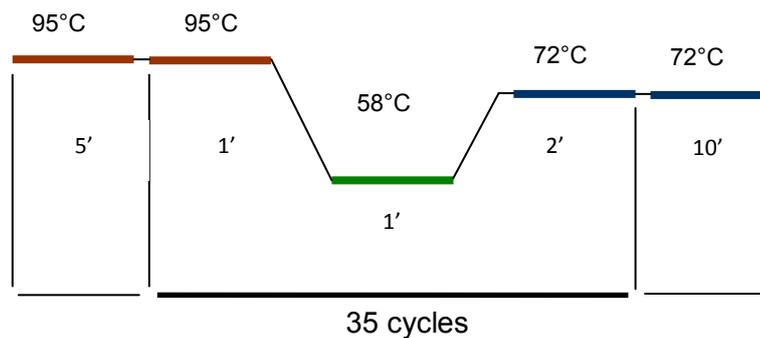
- **Primer R** = rP48/*EcoRI*/R

5'- GTGGAATCTTATTTTCTTGTTTCAGAAGCC -3'

Per la reazione di PCR è stato utilizzata la HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) allestendo una reazione con un volume finale di 50 µl:

Reagente	Quantità utilizzata	Concentrazione finale
Buffer mix 2X	25 µl	1X
Primer F 10 mM	1 µl	0.2 µM
Primer R 10 mM	1 µl	1.25 U
pJW/tPA/rP48 [28 µg/ml]	4 µl	[2,24 µg/ml]

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



Il prodotto di PCR è stato controllato in elettroforesi su gel d'agarosio al 2% ed in seguito è stato purificato con MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). L'amplificato così ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Eco*RI.

Il plasmide pVAX1 è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione ed in seguito è stato defosforilato con il kit Alkaline Phosphatase (Roche) per ridurre il tasso di ricircolarizzazione. Il prodotto di digestione è stato separato su gel

d'agarosio al 2%; la banda è stata tagliata e purificata con il kit MinElute Gel Extraction (Qiagen). I prodotti di PCR digeriti sono stati purificati con il kit MinElute PCR purification (Qiagen). I purificati sono stati quindi clonati nel vettore prescelto con il Rapid DNA Ligation Kit. Le colonie ricombinanti antibiotico-resistenti sono state selezionate, messe in crescita in 3 ml di LB + kanamicina (50 µg/ml) ed incubate o/n; il giorno seguente è stata effettuata una estrazione miniprep con il kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit. I plasmidi purificati sono stati sottoposti a digestione di controllo con *EcoRI* e *BamHI*. Le colonie trasformate con il plasmide ricombinante sono state rimesse in coltura in 300 ml di terreno LB addizionato con kanamicina (50 µg/ml) ed incubate a 37°C o/n; le colture batteriche sono state utilizzate per ottenere preparazioni maxiprep con il kit PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Invitrogen). In questo modo sono stati costruiti i plasmidi ricombinanti pJW/tPA-rP48 e pVAX1/tPA-rP48, da utilizzare come vaccini a DNA, mentre il vettore pSer/rP48 è stato utilizzato per esprimere l'antigene da utilizzare in immunoblotting ed ELISA. I costrutti sono stati sequenziati con ABI PRISM BigDye Terminator Sequencing Kit 2.0

5.3 Controllo espressione e traduzione in vitro

Sono state allestite colture di cellule HEK (Human Embryonic Kidney) 293 in terreno di coltura supplementato con 10% FBS, a 37°C in incubatore con 5% CO₂. Le colture cellulari sono state transfettate alternativamente con i vettori pVAX1/TPA-p48, e pJW/TPA-p48, utilizzando come controlli negativi gli stessi vettori privi del gene codificante per la P48. Per la transfezione è stato usato il kit CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech) secondo il seguente protocollo:

1. *Piastrare le cellule il giorno prima della transfezione. Le cellule devono essere ad uno stadio di confluenza del 50-80% il giorno della transfezione.*
2. *30 minuti-3 ore prima della transfezione sostituire il terreno di coltura con medium fresco*
3. *Per ogni esperimento di transfezione preparare la soluzione A e la soluzione B*

Soluzione A 1-3 µg DNA
 x µl H₂O sterile
 12,4 µl Ca 2M
 100 µl Volume Tot

Soluzione B 100 µl HEPES-Buffered Saline 2X

1. *Vortexare con attenzione la soluzione A e contemporaneamente aggiungere goccia a goccia la soluzione B*
2. *Incubare la soluzione di transfezione a temperatura ambiente per 20 minuti*
3. *Vortexare con attenzione la soluzione di transfezione e aggiungerla goccia a goccia alle piastre con le cellule confluenti, incubare le piastre per 2-12 ore in un incubatore a 37°C, 5% CO₂*
4. *Rimuovere la soluzione di transfezione e lavare le piastre con medium fresco o PBS 1X*
5. *Aggiungere terreno fresco ed incubare a 37°C*

Dopo 48 ore sono state raccolte le cellule ed il surnatante. Dalle cellule, sottoposte a tre lavaggi con PBS, è stato estratto l'RNA totale utilizzando il kit RNeasy® Mini (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

1. *Lisare le cellule aggiungendo 350µl di buffer RTL*
2. *Passare il lisato per 5 volte attraverso un ago da 0,9 mm di diametro utilizzando una siringa RNase-free*
3. *Aggiungere un volume di etanolo al 70% al lisato omogenato*
4. *Trasferire il campione in una colonna RNeasy posta in una provetta da 2 ml. Centrifugare a 8000 xg per 15''. Scartare l'eluito.*
5. *Aggiungere 700 µl di buffer RW1 alla colonna e centrifugare a 8000 xg per 15''. Scartare l'eluito.*
6. *Aggiungere 500 µl di buffer RPE alla colonna e centrifugare a 8000 xg per 15''. Scartare l'eluito.*
7. *Aggiungere 500 µl di buffer RPE alla colonna centrifugare 8000 xg per 2'.*
8. *Centrifugare per un ulteriore minuto alla massima velocità.*
9. *Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 ml nuova. Aggiungere 30-50 µl di H₂O RNase free alla membrana e centrifugare a 8000 xg per 1'.*

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

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

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

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

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

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

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

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

La presenza della proteina P48 è stata valutata in immunoblotting sia nelle cellule che nel surnatante secondo la seguente metodica:

Preparazione pellet cellulari

1. Lavare i pellet in PBS 3 volte
2. Risospendere in 300 µl di Laemmli sample buffer 1X
3. Denaturare a 95°C per 5 minuti e centrifugare per eliminare i detriti cellulari

Preparazione terreni di coltura

1. Diluire il terreno in piccole aliquote 1:1 con Laemmli sample buffer 2X
2. Denaturare a 95°C per 5 minuti e centrifugare

SDS PAGE e Western Blot

1. Caricare i campioni su gel al 10% e fare correre inizialmente a 80V ed in seguito a 150V
2. Trasferire i gel su membrana di nitrocellulosa a 250 mA per 1 ora
3. Bloccare la membrana per un ora con TPBS-Skim milk al 5%

4. *Mettere a contatto la membrana con l'anticorpo primario anti-rP48 M.aga 1:1000 in TPBS-skim milk 2% per 2 ore*
5. *Lavare la membrana in TPBS*
6. *Mettere a contatto la membrana con l'anticorpo secondario anti-rabbit (Sigma) 1:250000 in TPBS-skim milk 2% per 1 ora*
7. *Lavare la membrana in TPBS*
8. *Mettere a contatto la membrana col substrato chemiluminescente: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)*
9. *Fissare su lastra e sviluppare*

5.4 Messa a punto delle preparazioni vaccinali

Per questo studio sono state utilizzate 5 differenti strategie vaccinali utilizzando due preparazioni di diversa natura: un vaccino a DNA costituito da un plasmide di espressione contenente il gene per l'antigene immunodominante di *M. agalactiae* P48 (pJW/tPArP48) ed un vaccino a subunità proteica costituito dalla stessa proteina antigenica ricombinante rP48 codificata dal plasmide.

5.5 Espressione e purificazione dell'antigene P48.

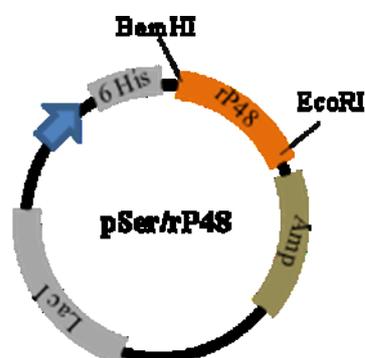


Fig. 5.2 Mappa del plasmide pSer/rP48

Il ceppo di *E. coli* DH5 α è stato trasformato mediante shock termico con il plasmide pSer/rP48 (Fig. 5.2) che contiene il gene codificante per la P48 di *M.agalactiae* secondo il protocollo descritto sotto:

1. aggiungere 4 μ l del plasmide in una provetta contenente *E. coli* competenti
2. incubare in ghiaccio per 30 minuti
3. incubare a 42°C per 30 secondi -1 min
4. trasferire immediatamente la provetta con le cellule in ghiaccio
5. aggiungere 900 μ l di LB a temperatura ambiente
6. incubare in agitazione a 37°C per 1 ora
7. piastrare su LB agar addizionato con ampicillina (100 μ g/ml) ed incubare o/n

Le colonie trasformate sono state selezionate per la resistenza all'antibiotico codificata dal plasmide; queste colonie sono state messe in coltura su piccola scala. Da queste colture sono stati estratti i plasmidi con il kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). I plasmidi estratti sono stati digeriti con gli enzimi *Bam*HI e *Eco*RI per verificare la presenza dell'inserto ed i prodotti di digestione sono stati visualizzati in elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Le colonie trasformate sono quindi state messe in coltura su scala maggiore in LB con ampicillina (50 μ g/ml). Quando le colture hanno raggiunto la fase logaritmica precoce è stata indotta l'espressione della rP48 mediante aggiunta di IPTG alla concentrazione finale di 0,5 mM. Dopo due ore dall'induzione i batteri sono stati centrifugati e lisati con i convenzionali metodi chimico-fisici e la proteina di fusione è stata recuperata dalla frazione solubile e purificata su colonna. La resa e la purezza della rP48 sono state valutate in SDS-PAGE e con il metodo di Bradford.

La proteina così ottenuta è stata preparata in dosi da 200 μ g di rP48 in 250 μ l di PBS + 250 μ l di Freund completo (Freund incompleto nelle inoculazioni successive alla prima) ed inocolata per via intramuscolare.

5.6 Produzione del vaccino a DNA.

Il plasmide scelto per la vaccinazione è il pJWtPA/rP48 il quale contiene, oltre al gene per la proteina antigenica immunodominante di *M. agalactiae* P48, il segnale di secrezione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) che determina la liberazione della proteina nell'ambiente extracellulare in seguito alla traduzione.

Il DNA plasmidico è stato preparato usando il kit Endo-Free Plasmid Giga Kit (Qiagen) secondo il seguente protocollo:

1. *Prendere una singola colonia trasformata col plasmide di interesse da una piastra fresca e inoculare uno starter di 5-10 ml di LB contenente l'antibiotico appropriato. Incubare per circa 8 ore a 37°C a 300 rpm.*
2. *Diluire la coltura starter 1/1000 in 2,5 l di LB con antibiotico. Lasciare crescere a 37°C per 12-16 ore a 300 rpm.*
3. *Pellettare la coltura a 6000 x g per 15 minuti a 4°C.*
4. *Risospendere il pellet batterico in 125 ml di buffer P1*
5. *Aggiungere 125 ml di buffer P2 e mescolare invertendo 4-5 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.*
6. *Aggiungere 125 ml di buffer P3 precedentemente raffreddato a 4°C e mescolare invertendo.*
7. *Trasferire il lisato nel filtro a vuoto e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente*
8. *Accendere la pompa a vuoto e far passare tutta la soluzione, quindi spegnere la pompa.*
9. *Aggiungere 50 ml di buffer FWB2 al filtro e mescolare delicatamente con una spatola sterile. Accendere la pompa a vuoto e far passare tutta la soluzione*
10. *Aggiungere 30 ml di buffer ER, mischiare invertendo circa 10 volte ed incubare in ghiaccio per 30 minuti.*
11. *Equilibrare una colonnina con 75 ml di buffer QBT e farla svuotare per gravità.*
12. *Mettere il lisato dalla bottiglia alla colonna e lasciarlo scendere per gravità.*

13. *Lavare la colonna con 600 ml di buffer QC.*
14. *Eluire il DNA con 100 ml di buffer QN.*
15. *Precipitare il DNA aggiungendo 70 ml di isopropanolo a temperatura ambiente. Centrifugare a $\geq 15000 \times g$ per 30 minuti a 4°C. Rimuovere con attenzione il surnatante.*
16. *Lavare il pellet con 10 ml di EtOH 70% e centrifugare a $\geq 15000 \times g$ per 10 minuti a 4°C. Rimuovere con attenzione il surnatante.*
17. *Lasciare asciugare all'aria il pellet per 10-20 minuti e reso spendere in circa 2 ml di buffer TE.*

Il plasmide così ottenuto è stato somministrato tramite iniezione intramuscolo in dosi da 1mg/ml sia in PBS che adjuvato da liposomi (sterile pyrogen free pre-Liposome formulation 4, Sigma) ed in dosi da 10 µg di plasmide per proiettile utilizzando come strumento per l'inoculazione la Helios Gene Gun (Bio-Rad)

I liposomi sono stati preparati aggiungendo 1 ml di pJWtPA/rP48 (1mg/ml) ad un vial di pre-Liposome in polvere, quindi la soluzione è stata vortexata per 15' ottenendo una sospensione omogenea.

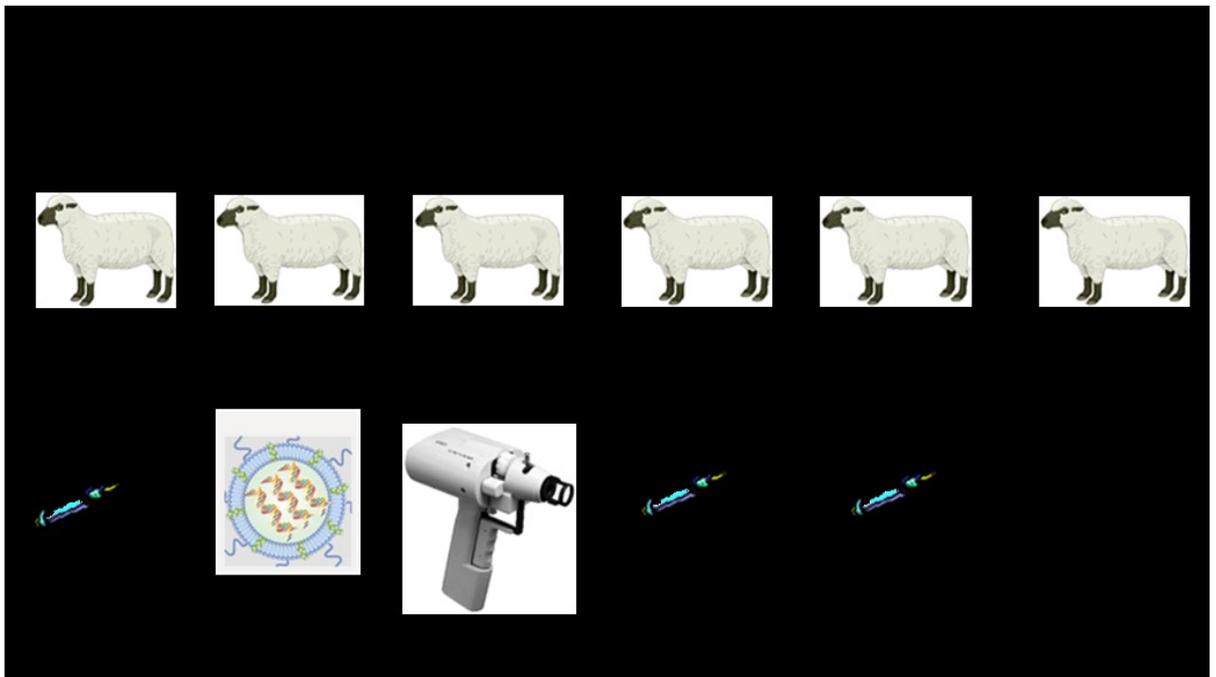
I proiettili per la gene gun sono stati preparati secondo il seguente protocollo:

1. *Pesare 25 mg di oro in una provetta da 1,5 ml*
2. *Aggiungere 50 µl di spermi dina 0,1 M*
3. *Vortexare la miscela per pochi secondi e sonicare per 3-5 secondi*
4. *Aggiungere 50 µl di DNA 1 µg/µl*
5. *Mescolare DNA spermi dina e oro vortexando per 5 secondi*
6. *Aggiungere durante l'agitazione 100 µl di CaCl₂ goccia a goccia*
7. *Lasciare precipitare per 10 minuti a temperatura ambiente*
8. *Spinnare la soluzione per 15 secondi in modo da pellettare l'oro. Rimuovere e scartare il surnatante*
9. *Risospendere il pellet nel rimanente surnatante vortexando brevemente*
10. *Lavare il pellet tre volte con 1 ml di EtOH al 100%; spinnare ~ 5 secondi tra ogni lavaggio. Scartare il surnatante*

11. *Risospendere il pellet in 200µl di PVP 0,05 mg/ml in EtOH*
12. *Trasferire la sospensione in una provetta da 15 ml e portare a volume di 3 ml con PVP 0,05 mg/ml in EtOH*
13. *Vortexare la sospensione e invertire la provetta per risospendere l'oro*
Aspirare la soluzione nel tubo lentamente, fare in modo che la soluzione si distribuisca uniformemente sulla superficie del tubo e tagliarlo in modo da ottenere 40 cartucce.

5.7 Protocollo di vaccinazione degli ovini

Durante il primo trial clinico effettuato sono state testate diverse strategie di vaccinazione. Gli animali sono stati suddivisi in gruppi diversi a seconda delle strategie vaccinali utilizzate:



- **Gruppo A:** gruppo di controllo negativo
- **Gruppo B:** tre inoculazioni di rP48

- **Gruppo D:** tre inoculazioni di pJW/tPArP48
- **Gruppo E:** priming con il plasmide pJW/tPArP48 seguito da due inoculazioni con la rP48
- **Gruppo G:** tre inoculazioni di pJW/tPArP48 adiuvata da liposomi
- **Gruppo F:** tre somministrazioni di pJW/tPArP48 tramite gene gun

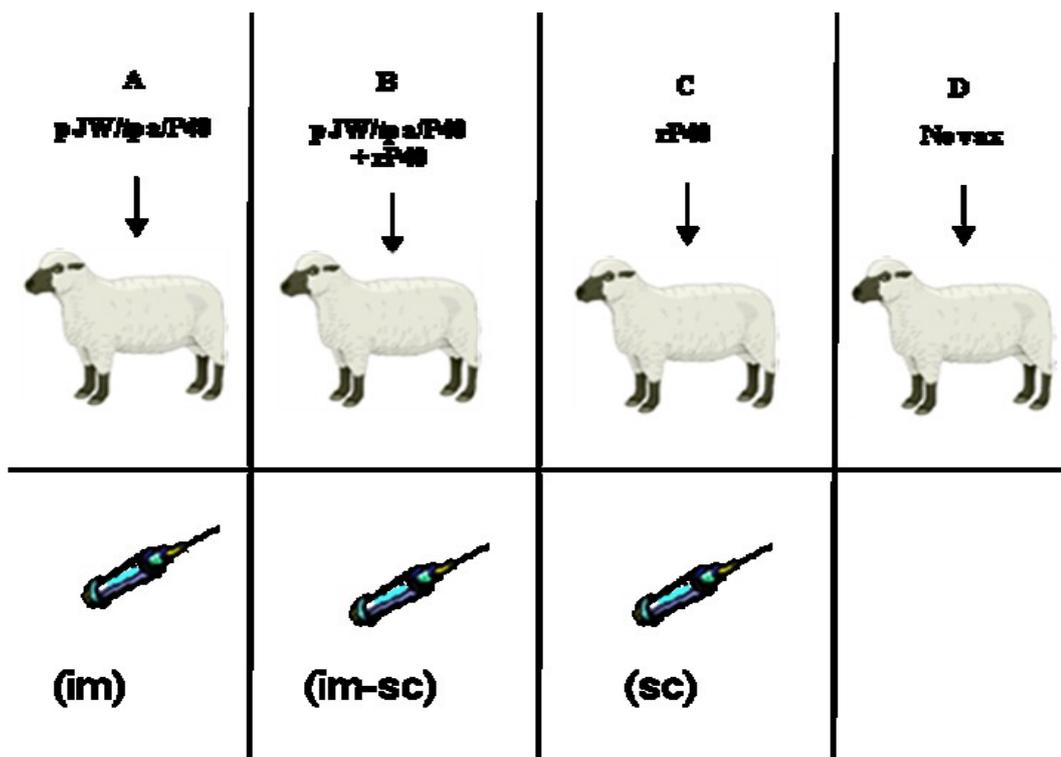
Ad ogni animale è stata somministrata una dose di richiamo dopo 15 e 30 giorni dalla prima somministrazione. Sono stati prelevati campioni di siero prima dell'immunizzazione (T_0) e ogni 15 giorni per 8 settimane .

In seguito gli animali sono stati trasferiti in un allevamento infetto per effettuare il challenge in vivo. Nell'allevamento gli animali sono stati monitorati tramite prelievi di sangue e latte effettuati a cadenza bisettimanale ed in seguito mensile (Tab. 9).

T0	T1	T2	T3	T4	T5-T12
Immunizzazione				Trasferimento allevamento infetto	Challenge

Tab. 9 Timeline Trial 1

Sulla base dei risultati ottenuti dal primo esperimento in campo è stato possibile effettuare un secondo trial con altri animali, utilizzando le strategie vaccinali che si sono dimostrate efficaci. In questo secondo test gli animali sono stati suddivisi secondo il seguente schema:



Anche in questo secondo trial gli animali sono stati trasferiti in un allevamento infetto per effettuare il challenge in vivo dove sono stati monitorati tramite prelievi di sangue e latte effettuati a cadenza bisettimanale ed in seguito mensile (Tab 10).

T0	T1	T2	T3	T4-T7
Immunizzazione			Trasferimento allevamento infetto	Challenge

Tab 10. Timeline Trial2

5.8 Valutazione della risposta immunitaria umorale.

La risposta immunitaria e' stata valutata attraverso Western Blottig ed ELISA: i campioni di siero sono stati utilizzati in Western blotting per verificare qualitativamente la produzione di anticorpi specifici, mentre la valutazione quantitativa è stata effettuata tramite P48-ELISA.

Western blot

- **Prima fase: elettroforesi su gel**

Su un gel di poliacrilammide al 10% caricare il lisato totale di *M. agalactiae* o n μ g di proteina P48 dopo averli fatti bollire in laemli a 95°C per 5 minuti. Fare correre a 80 V fino al superamento dello stacking, in seguito a 150 V fino alla fine del gel.

- **Seconda fase: trasferimento su membrana.**

Mettere a contatto il gel con la membrana di nitrocellulosa e trasferire a 250 mA per 1 ora a 4°C.

- **Terza fase: saturazione o “blocking”.**

Saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana per un ora con TPBS-Skim milk al 5% per prevenire le interazioni non specifiche tra l’anticorpo e la membrana.

- **Quarta fase: legame dell’anticorpo primario.**

Mettere a contatto la membrana con l’anticorpo primario costituito dai sieri diluiti 1:100 in TPBS-skim milk 2,5% per 1 ora. Lavare la membrana in agitazione 5 volte per 5 minuti in TPBS.

- **Quinta fase: legame dell’anticorpo secondario.**

Mettere a contatto la membrana con l’anticorpo secondario anti-sheep HRP (Sigma) 1:50000 in TPBS-skim milk 2,5% per 45 minuti.

- **Sesta fase: rivelazione o “detection”**

Mettere a contatto la membrana col substrato chemiluminescente: SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Lavare la membrana in TPBS. Fissare su lastra e sviluppare.

ELISA antigene specifico

I test ELISA sono stati condotti su piastre microplate (Nunc maxysorp) sensibilizzate mettendo ad incubare i pozzetti tutta la notte a 37°C con 100 µg/well di rP48. Dopo quattro lavaggi con PBS le piastre sono state bloccate con 150 µl/well di PBS contenente 2,5% di cseina (Sigma) e messe nuovamente in incubazione per un'ora a 37°C; trascorso il tempo di incubazione sono state sottoposte a quattro lavaggi con PBS. Il test sui sieri è stato condotto secondo il seguente protocollo:

- 1. Preparare una diluizione 1:100 dei sieri in BSA2% in TPBS (tot 120 ul) nelle piastre per la preparazione*
- 2. Trasferire 100 ul del campione nella piastra*
- 3. Lasciare in incubazione 1h a 37°C in camera umida*
- 4. Aspirare il campione e lavare 3V con TPBS (volumi di lavaggio 300 ul)*
- 5. Aggiungere il secondario (anti sheep HRP) ad una concentrazione di 1:10000 in BSA2% in TPBS (100 ul per pozzetto)*
- 6. Lasciare in incubazione 45' a 37°C in camera umida*
- 7. Aspirare e lavare 3V con TPBS*
- 8. Aggiungere il substrato per ELISA (100 ul per pozzetto). Incubare al buio e leggere l'emissione a 620 nm dopo 15' e dopo 30'*

5.9 Valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata

Valutazione del fenotipo linfocitario

Sono stati raccolti campioni di sangue intero in EDTA. Questi campioni sono stati utilizzati per la valutazione del fenotipo linfocitario cellulo-mediato utilizzando la marcatura mediante anticorpi monoclonali (Serotech) dei marker di superficie dei linfociti T:

- CD 25 FITC
- CD4 ALEXA 647
- CD8 RPE
- WC1 FITC

50 µl di sangue sono stati trasferiti in provette per citofluorimetria 12x75 ed al campione sono stati aggiunti 5 µl per ogni anticorpo marcato. Sono stati lasciati in incubazione al buio per 20' a temperatura ambiente. In seguito il campione è stato lavato in PBS W/O Ca Mg (Sigma-Aldrich) ad una velocità di 300 x g per 10'. Infine il campione è stato risospeso in 500 µl di FACSflow buffer all' 1% di paraformaldeide.

Test di linfoproliferazione

6 ml di sangue intero in EDTA sono stati utilizzati per l'estrazione del PBMC tramite centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) secondo il seguente protocollo:

- 1) In una falcon da 15ml aggiungere 6 ml di ficoll filtrato e portare a T amb.
- 2) Versare con cautela 6 ml di sangue intero (in EDTA o altro anticoagulante) sul ficoll. Si formano due fasi sovrapposte. Centrifugare a 450 x g per 30' a T ambiente.
- 3) Aspirare ed eliminare lo strato superiore fino a 0,5 cm dalla interfaccia opaca che contiene le cellule mononucleari e trasferire l'interfaccia opaca in una falcon da 15 pulita.

- 4) Aggiungere 10 ml di PBS e mescolare delicatamente
- 5) Centrifugare a 300 x g per 10'
- 6) Eliminare il surnatante. Aggiungere 2 ml di red blood cells lysis buffer, risospendere delicatamente e lasciare incubare per 5-10 minuti.
- 7) Centrifugare per 10' a 300 x g
- 8) Eliminare il surnatante. Risospendere in 5 ml di PBS e centrifugare per 10' a 300 x g
- 9) Eliminare il surnatante. Risospendere in 1 ml di PBS. Centrifugare per 10' a 300 x g

Conta cellule vitali:

- 1) Preparare una sospensione dei linfociti in PBS
- 2) Raccogliere 10 μ l della sospensione e aggiungere 10 μ l di trypan blue 0,4%
- 3) Lasciare colorare per un minimo di 5 fino ad un massimo di 15 min
- 4) Contare le cellule vitali secondo la formula: **Cellule per ml= conteggio medio per quadrato x fattore di diluizione x 10.000**
- 5) Diluire le cellule in terreno ad una concentrazione di 1-2.000.000 cell/ml

Linfoproliferazione:

- 1) Della diluizione così ottenuta caricare 100 μ l (200.000 cellule) in un pozzetto di una piastra da 96
- 2) Stimolare la proliferazione con circa 1,5 μ g di P48 per pozzetto [15 μ g/ml]
- 3) Aggiungere al controllo positivo 0,5 μ g di concanavalina (ConA)[5 μ g/ml]
- 4) Lasciare un controllo negativo per campione.

Le piastre sono lasciate in incubazione per 72 ore a 37°C 5% CO₂.

In seguito le cellule sono state lavate due volte in in PBS W/O Ca Mg (Sigma-Aldrich) ad una velocità di 300 x g per 10', sono state marcate con 5 μ l di anticorpo e sono state lasciate in incubazione al buio per 20' a temperatura ambiente. Infine il campione è stato risospeso in 500 μ l di FACSflow buffer all' 1% di paraformaldeide.

L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata mediante FACSCANTOII (Becton Dickinson) l'analisi dei dati citofluorimetrica è stata effettuata con il software DIVA. Per ogni campione sono stati valutati dal software DIVA 5000 eventi del gate assegnato ai linfociti. L'analisi statistica mediante il software GrafPad-Prism.

5.10 Isolamento di *M. agalactiae* dal latte

I campioni di latte prelevati dagli animali vaccinati e da quelli non vaccinati sono stati messi in coltura su piastre selettive per *M.agalactiae* contenenti:

- Blood Agar Base 40 g
- H2OMQ fino a 800ml
- La soluzione viene portata a pH 7.4 con NaOH 5 M. Aggiungere prima di piastrare 200ml di Siero Equino e 2 ml di ampicillina 250µg/ml.

Capitolo 6

Risultati

6.1 Costruzione dei plasmidi

L'induzione dell'immunità umorale e cellulare determinata dall'immunizzazione genetica è stata riportata in modelli di diverse malattie infettive (Lowe *et al.*, 2006).

Per verificare se un plasmide contenente il gene per la P48 di *M. agalactiae* fosse in grado di indurre una risposta immunitaria sono stati costruiti i vettori pVAX1 (Invitrogen), pJWtPA4303 (Ospedale Gemelli-Roma) e pSer/rP48 (Rosati *et al.*, 2000).

Il gene codificante per la proteina antigenica P48 di *M. agalactiae* è stato amplificato, tramite PCR, dal plasmide pSer/rP48 (Rosati *et al.*, 2000) ottenendo un prodotto della lunghezza di 1300bp che è stato visualizzato in elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Il prodotto di PCR è stato in seguito digerito purificato e clonato nel vettore pJWtPA4303 precedentemente digerito con gli stessi enzimi, defosforilato e purificato (Fig.6.1).

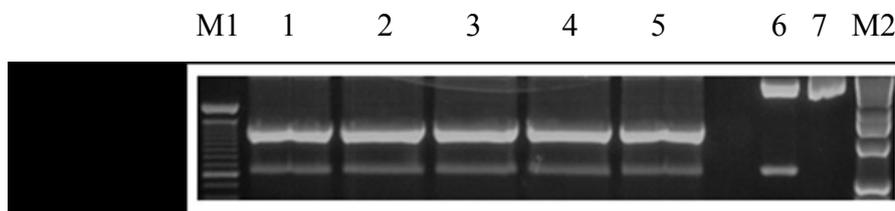


Fig. 6.1 1-2-3-4-5. amplificato del gene P48 di *M. agalactiae*, 6. pJWtPA4303 digerito con *NheI* e *BamHI*, 7. pJWtPA4303 non digerito

Il vettore è stato inserito in *E. coli* mediante trasformazione e le colonie ricombinanti sono state selezionate per la resistenza all'antibiotico conferita dal plasmide. Le colonie sono state poi coltivate in terreno liquido e da queste colture è stato estratto il plasmide. In tal modo è stato ottenuto il plasmide ricombinante pJWtPA/rP48 (Fig. 6.2).

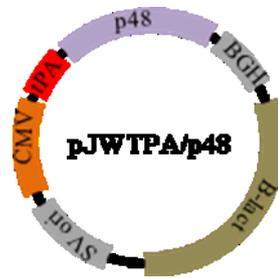


Fig. 6.2 Mappa del plasmide ricombinante pJWtPA/rP48

Il plasmide estratto è stato sottoposto ad una digestione enzimatica di controllo per confermare la presenza dell'inserto rP48 e del tratto tPA/rP48.(Fig.6.3)

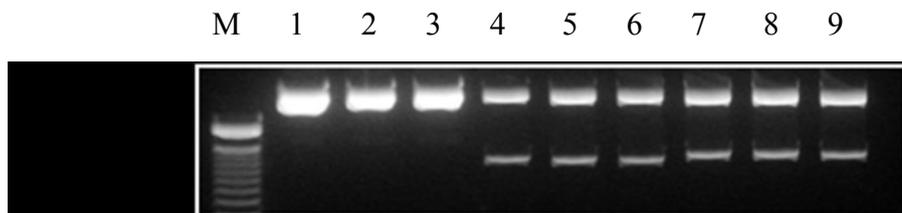


Fig. 6.3 1-2-3. pJWtPA/rP48 non digerito, 4-5-6. pJWtPA/rP48 digerito con *NheI* e *BamHI*, 7-8-9. pJWtPA/rP48 digerito con *Hind III* e *BamHI*

Da questo vettore abbiamo quindi amplificato il tratto tPA/rP48 con primer contenenti i siti per *BamHI* ed *EcoRI* per inserirlo nel vettore di espressione pVax. La scelta del pVax è stata dettata dal fatto che questo plasmide presenta un alto contenuto di G/C non metilate, è di dimensioni molto ridotte (circa 3Kb) ed inoltre è approvato dalla FDA per uso umano. Abbiamo in questo modo ottenuto

un amplificato della lunghezza di 1400 bp che è stato successivamente inserito nel vettore pVax precedentemente digerito con gli stessi enzimi (Fig.6.4 A e B).

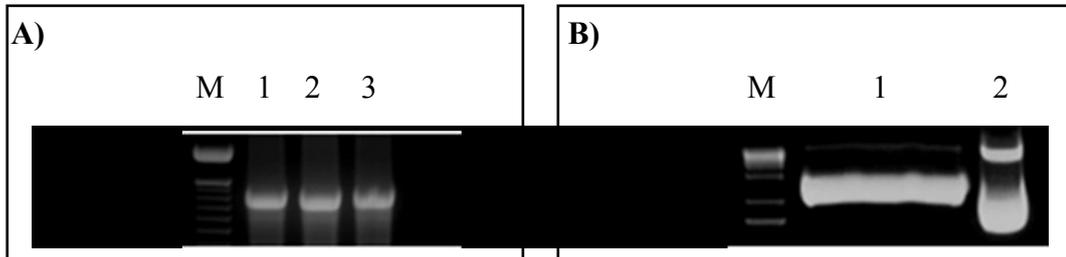


Fig. 6.4 A) 1-2-3. amplificato del tratto tPA/rP48 dal plasmide pJWtPA/rP48, B) 1. pVax digerito con *EcoRI* e *BamHI*, 2. pVax non digerito

Il vettore così ottenuto (Fig.6.5) è stato clonato in *E. coli* ed estratto dopo essere stato coltivato in terreno liquido. Il plasmide estratto è stato sottoposto ad una digestione enzimatica di controllo per confermare la presenza dell'inserto tPA/rP48.(Fig.6.6)

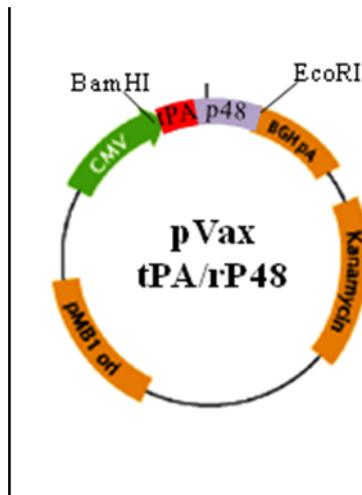


Fig. 6.5: Mappa del plasmide ricombinante pVax/tPA/rP48

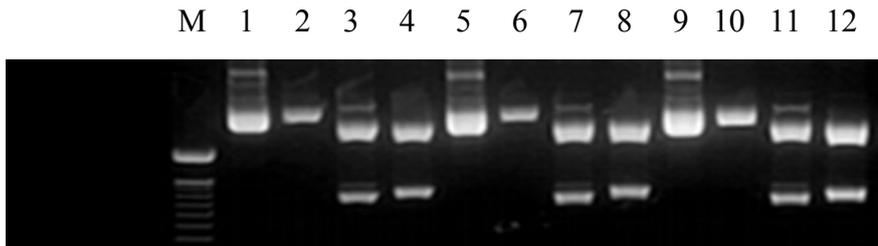


Fig. 6.6. 1-5-9. pVax/tPA/rP48 non digerito, 2-6-10. pVax/tPA/rP48 digerito con *BamHI* e *NheI*, 3-7-11. pVax/tPA/rP48 digerito con *NheI* e *EcoRI* 4-8-12. pVax/tPA/rP48 digerito con *BamHI* e *EcoRI*

Entrambi i vettori ricombinanti sono stati inoltre sequenziati per confermare il corretto clonaggio dei geni nel vettore.

6.2 Controllo espressione e traduzione in vitro

È stata testata la capacità di espressione dei vettori ricombinanti pJWtPA/rP48 e pVax/tPA/rP48. in sistemi eucariotici in vitro. I plasmidi sono stati utilizzati nella transfezione di colture cellulari HEK 293. L'efficacia della transfezione è stata testata sia mediante reperimento dell'mRNA specifico, tramite RT-PCR, che attraverso l'individuazione del prodotto genico (la proteina P48) tramite Western blotting. Sia il plasmide pJWtPA/rP48 che il pVax/tPA/rP48 sono risultati positivi dopo Rt-PCR (Fig. 6.7).

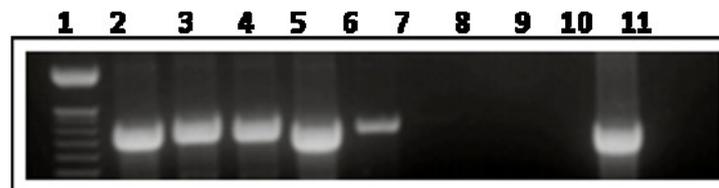
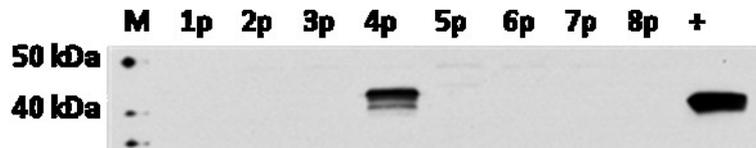


Fig. 6.7. RT-PCR per valutare l'espressione del gene P48 in cellule HEK transfettate con pVax/tPA/rP48 (2-3-4); pJWtPA/rP48 (5); pVax/P48 (6); pGexP48 (7); pVax (8); mock (9); pVaxP48C+ (10); H₂O (11)

In seguito alla transfezione terreno e pellet cellulare sono stati raccolti per testare la presenza della proteina P48 tramite Western blotting. Solo il plasmide pJWtPA/rP48 ha dimostrato di produrre la proteina di interesse in maniera efficiente (Fig. 6.8A e B).

A)



B)



Fig. 6.8. Rilevazione in immunoblotting della traduzione del gene P48 in cellule HEK transfettate. A) pellet cellulare: 1-2-3. pVax/tPA/rP48; 4. pJWtPA/rP48; 5. pGexP48; 6. pVaxP48; 7.pVax; 8. Mock; 9. C+. B) terreno: 1-2-3. pVax/tPA/rP48; 4. pJWtPA/rP48; 5. pGexP48; 6. pVaxP48; 7.pVax; 8. Mock; 9. C+

6.3 Espressione e purificazione dell'antigene P48.

La proteina ottenuta è stata preparata in dosi da 200µg di rP48 in 250µl di PBS + 250µl di Freund completo (Freund incompleto nelle inoculazioni successive alla prima) ed inoculata per via intramuscolare. La proteina rP48 purificata è stata utilizzata anche per verificare la presenza di anticorpi specifici nelle pecore vaccinate ed in quelle di controllo.

6.4 Produzione del vaccino a DNA.

Il plasmide pJWtPA/rP48 è stato prodotto su ampia scala. Per verificare il corretto clonaggio del plasmide quest'ultimo è stato sottoposto a digestione enzimatica che ha confermato la presenza del gene per la proteina rP48, inserito tra il sito *BamHI* ed il sito *NheI*, preceduto dal segnale del tPA inserito tra il sito *PstI* ed il sito *BamHI* (fig.6.9). Il corretto senso di lettura è stato confermato dal sequenziamento.

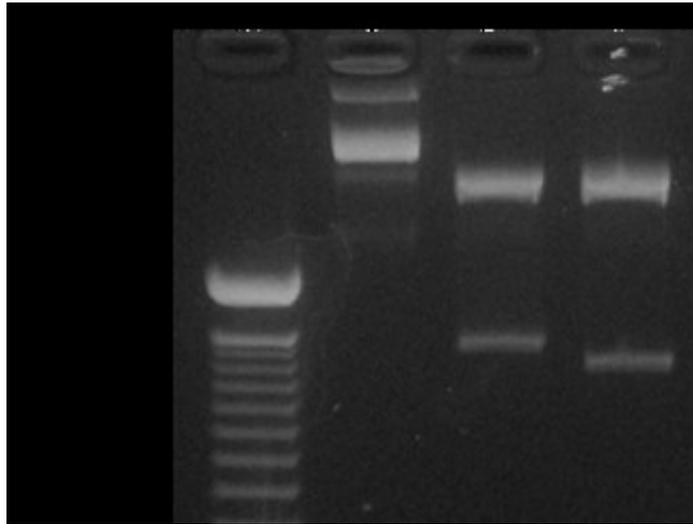


Fig. 6.9: 1. pJWtPA/rP48 non digerito, 2. pJWtPA/rP48 digerito con *PstI* e *BamHI* (tratto tPAP48), 3. pJWtPA/rP48 digerito con *BamHI* e *NheI* (P48)

6.5 Trial 1: Valutazione della risposta immunitaria

La risposta immunitaria indotta dal plasmide pJWtPA/rP48 negli animali vaccinati è stata valutata in immunoblotting ed in rP48 ELISA.

- *Western Blotting*

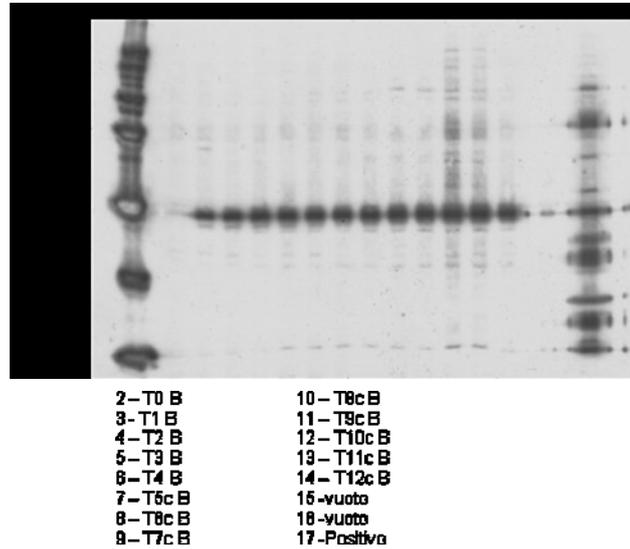


Fig. 6.10: 1. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo B

Nel gruppo B (fig. 6.10) di animali vaccinati con la sola proteina ricombinante, sono stati rilevati anticorpi specifici per la P48 già dopo 15 giorni dalla prima vaccinazione (T1). Questo conferma la già nota attività immunodominante della proteina P48. In seguito ad introduzione nell'allevamento infetto gli animali del gruppo B hanno contratto un'infezione da *M.agalactiae* che si evidenzia sierologicamente dopo circa un mese dall'ingresso nell'allevamento (T7c).

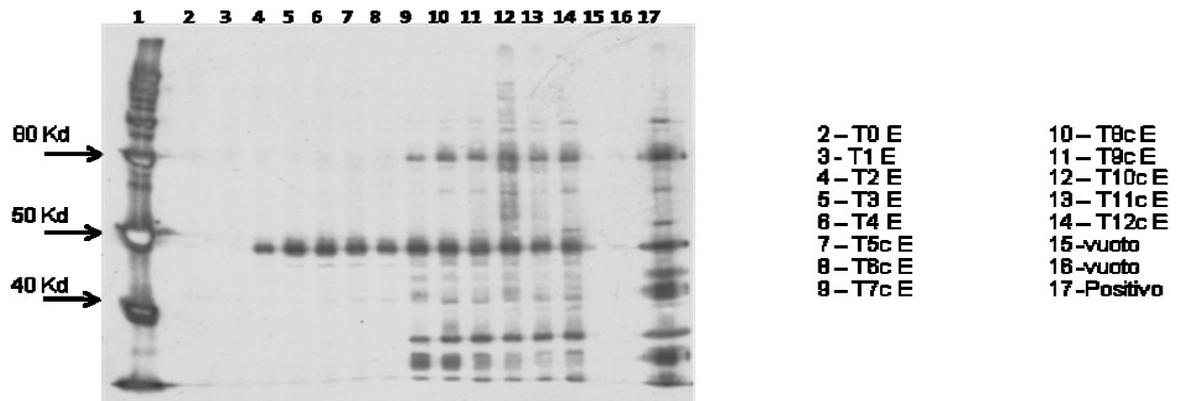


Fig. 6.11: 1. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo E

L'immunoblotting eseguito sui sieri degli animali vaccinati con la metodica del prime boost (gruppo E, fig 6.11), ha evidenziato il manifestarsi di una risposta anticorpale specifica dopo 30 giorni dal primo richiamo. In seguito al challenge anche gli animali del gruppo E hanno contratto l'infezione da parte di *M. agalactiae* manifestatasi dopo 30 giorni dallo spostamento nell'allevamento infetto ma con una risposta più forte rispetto agli animali del gruppo B.

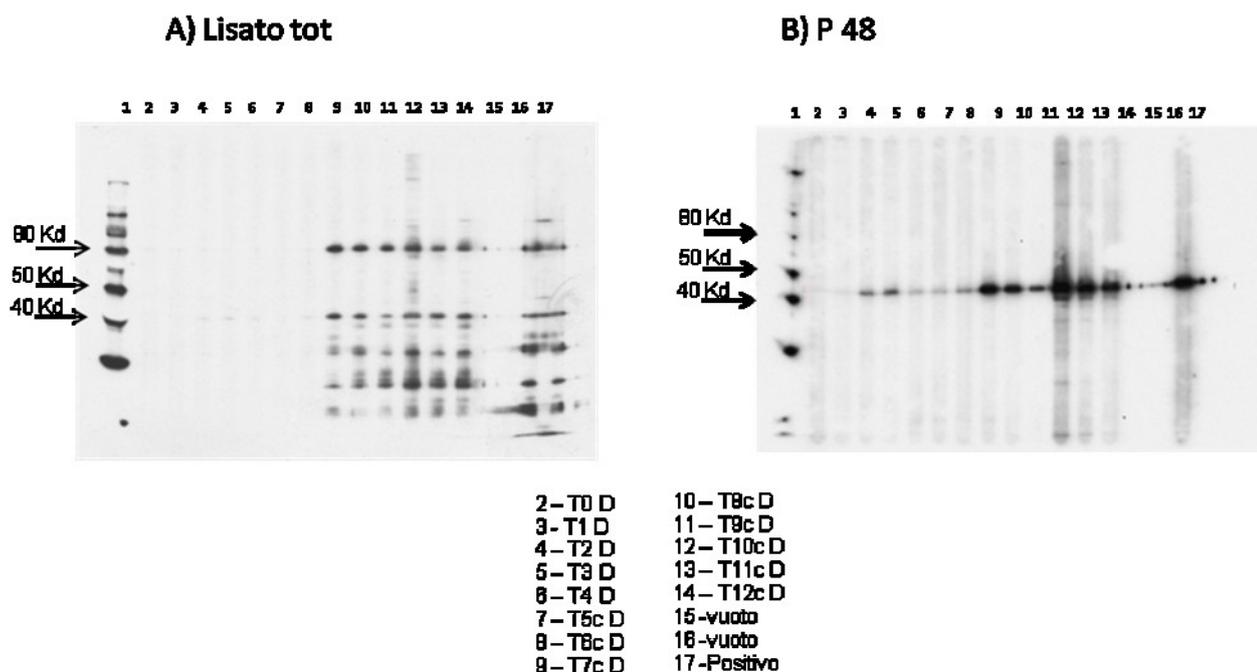


Fig. 6.12: A. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo D. B. Western blot su P48 dei sieri degli animali del gruppo D

Gli animali appartenenti al gruppo D sono stati vaccinati con 3 richiami del plasmide vaccinale. In questo caso si è mostrato utile effettuare due test di immunoblotting, uno sul lisato totale (Fig. 6.12 A) ed uno sulla P48 (Fig. 6.12 B). Da queste prove si evidenzia la presenza di una risposta immunitaria al vaccino dopo un mese dal primo inoculo di vaccino (15 gg dal secondo richiamo, T2). Inoltre è evidente che anche gli animali del gruppo D hanno contratto infezione da *M. agalactiae* in seguito al trasferimento nell'allevamento infetto. Questo è evidenziabile sierologicamente un mese dopo lo spostamento (T7c).

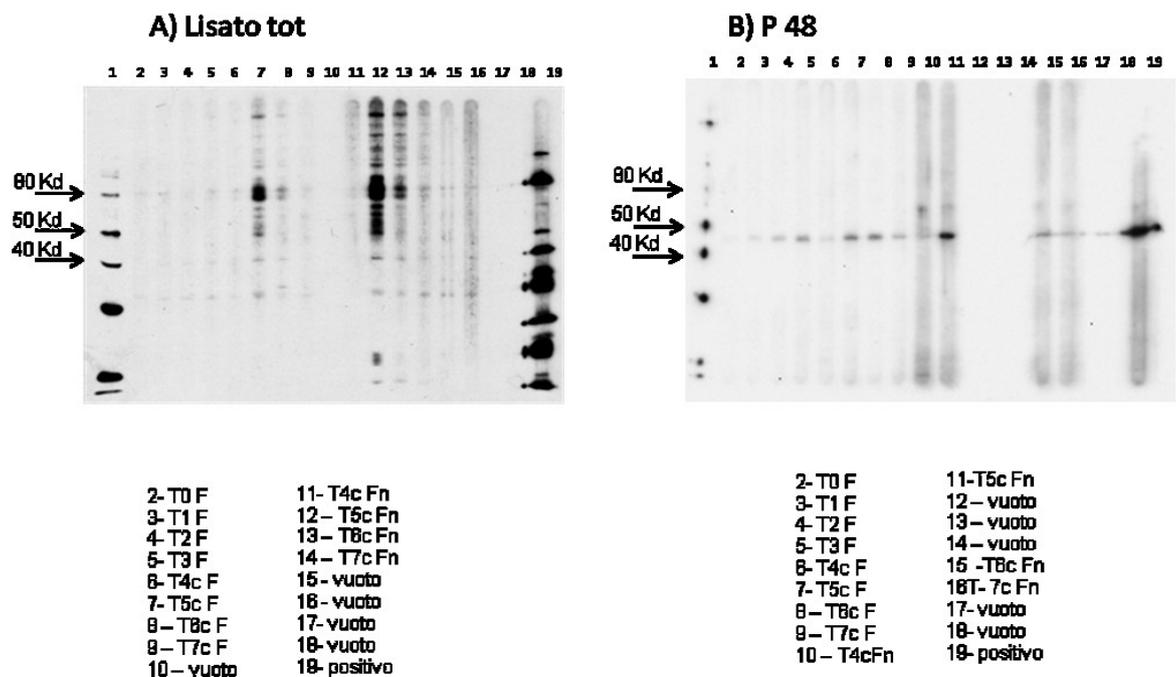


Fig. 6.13: 6A. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo F. 6B. Western blot su P48 dei sieri degli animali del gruppo F.

Gli animali appartenenti al gruppo F sono stati vaccinati con tre richiami del plasmide pJWtPArP48 inoculato tramite Gene-Gun. Anche in questo caso si è mostrato utile effettuare due test di immunoblotting, uno sul lisato totale (Fig.6.13 A) ed uno sulla P48 (Fig. 6.13 B). La risposta immunitaria al vaccino si presenta un mese dopo il primo inoculo. Anche gli animali del gruppo F dopo circa un mese dall'ingresso nell'allevamento infetto hanno mostrato sierologicamente di aver preso contatto con il patogeno *M. agalactiae*.

- **ELISA antigene specifico**

È stato effettuato un test ELISA per quantificare il titolo anticorpale, come mostrato in figura 6.14 appare chiaramente che la risposta anticorpale è stata indotta maggiormente dalla somministrazione della rP48 e dalla combinazione

vaccino a DNA-rP48. Buoni risultano anche i livelli di anticorpi prodotti in seguito a stimolazione con il solo vaccino a DNA somministrato intramuscolo. Scarsa risulta invece la stimolazione con il metodo Gene-Gun, questo fatto può essere dovuto ad alcuni problemi tecnici di settaggio dello strumento oppure alla scelta non ottimale delle quantità di DNA da adsorbire alle particelle di oro colloidale o alla scelta delle dimensioni delle particelle d'oro. Non è stata rilevata nessuna stimolazione negli animali vaccinati per via intradermica con i liposomi.

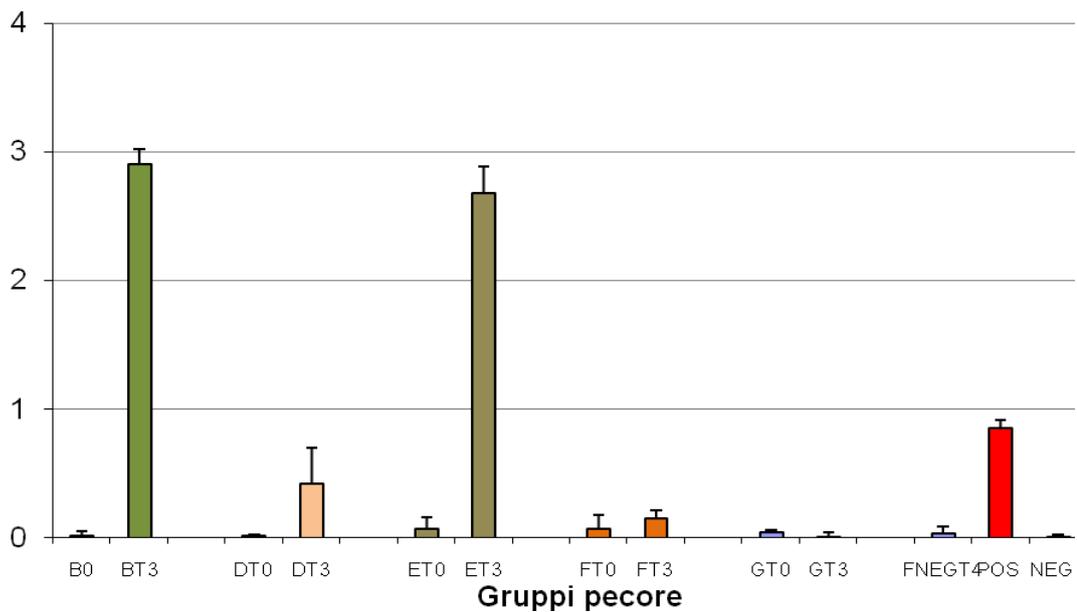


Fig 6.14: Elisa antigene specifico effettuato sui sieri degli animali vaccinati e sugli animali di controllo, sino a T3. Gruppo B: rP48 (im), Gruppo D: pJW/tPArP48 (im), Gruppo E: priming con pJW/tPArP48 e boost con rP48 (im), Gruppo F: pJW/tPArP48 Gene-Gun, Gruppo G: pJW/tPArP48 adiuvata con liposomi (id)

6.6 Trial 1: Isolamento dal latte di *M. agalactiae*

L'isolamento di *M. agalactiae* in terreno PPLO e Blood Agar Base addizionati con ampicillina, ripetuto più volte durante il periodo di challenge ha dato sempre esito negativo sia negli animali vaccinati che in quelli di controllo.

6.7 Trial 2: Valutazione della risposta immunitaria umorale

Sulla base dei risultati ottenuti dal precedente trial clinico abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sulle preparazioni vaccinali che si sono dimostrate efficaci e cioè capaci di indurre una risposta immunitaria significativa. Pertanto è stato allestito un secondo test in campo, selezionando un nuovo gregge sperimentale che è stato suddiviso in quattro gruppi denominati A, B, C e D.

Il gruppo A è stato vaccinato con il vaccino a DNA somministrato intramuscolo, il gruppo B è stato vaccinato con la strategia del prime boost, al gruppo C è stata somministrata la proteina ricombinante, infine il gruppo D costituisce il gruppo di controllo dei non vaccinati. In questa sperimentazione abbiamo vaccinato gli animali durante la gravidanza così come avviene col vaccino attualmente in uso in modo da trasferirli nell'allevamento infetto poco prima del parto. Gli animali hanno quindi partorito in allevamento. In questo periodo gli animali sono più sensibili all'infezione inoltre è possibile evidenziare il sintomo clinico principale cioè la mastite.

Western Blotting

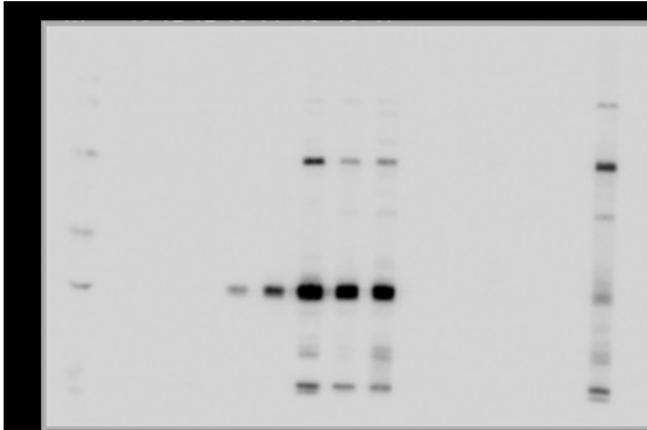


Fig. 6.15: 1. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo C (proteina ricombinante)

I risultati del western blot effettuato sugli animali del gruppo C (vaccinazione con rP48) del secondo trial ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti nella prima sperimentazione, con lo sviluppo di anticorpi specifici anti-P48 dopo circa 15 giorni dalla prima vaccinazione (T1), ed evidenziazione dell'infezione da *M. agalactiae* dopo circa un mese dall'ingresso nell'allevamento (T5).

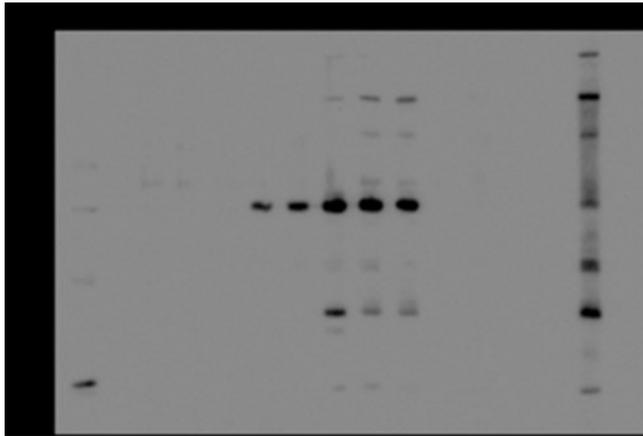


Fig. 6.16: 1. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo B (Prime boost)

L'immunoblotting eseguito sui sieri degli animali vaccinati con la metodica del prime boost (gruppo B, fig 6.16), ha di nuovo dato esiti paragonabili a quelli ottenuti nel primo trial con il manifestarsi di una risposta anticorpale specifica dopo 30 giorni dal primo richiamo e conferma, in seguito al challenge, della avvenuta infezione da parte di *M. agalactiae* manifestatasi dopo 30 giorni dallo spostamento nell'allevamento infetto.

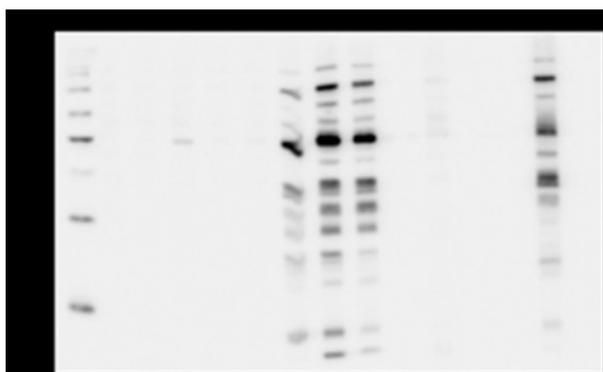


Fig. 6.17. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo A (vaccino a DNA)

Anche per quel che riguarda il gruppo A vaccinato con la preparazione plasmidica si evidenzia una debole risposta specifica al T2, così come era avvenuto durante il primo esperimento, e la successiva infezione da parte di *M. agalactiae*.

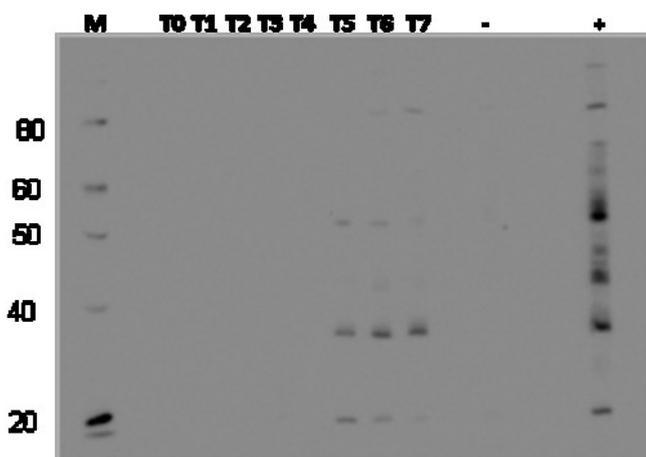


Fig. 6.18. Western blot su lisato totale di *M. agalactiae* dei sieri degli animali del gruppo D (non vaccinati)

Il western effettuato sugli animali del gruppo di controllo (gruppo D, non vaccinati) (fig. 6.18) mette in evidenza l'assenza di una risposta specifica durante le vaccinazioni e l'avvenuta infezione in seguito all'ingresso nell'allevamento infetto.

- **ELISA antigene specifico**

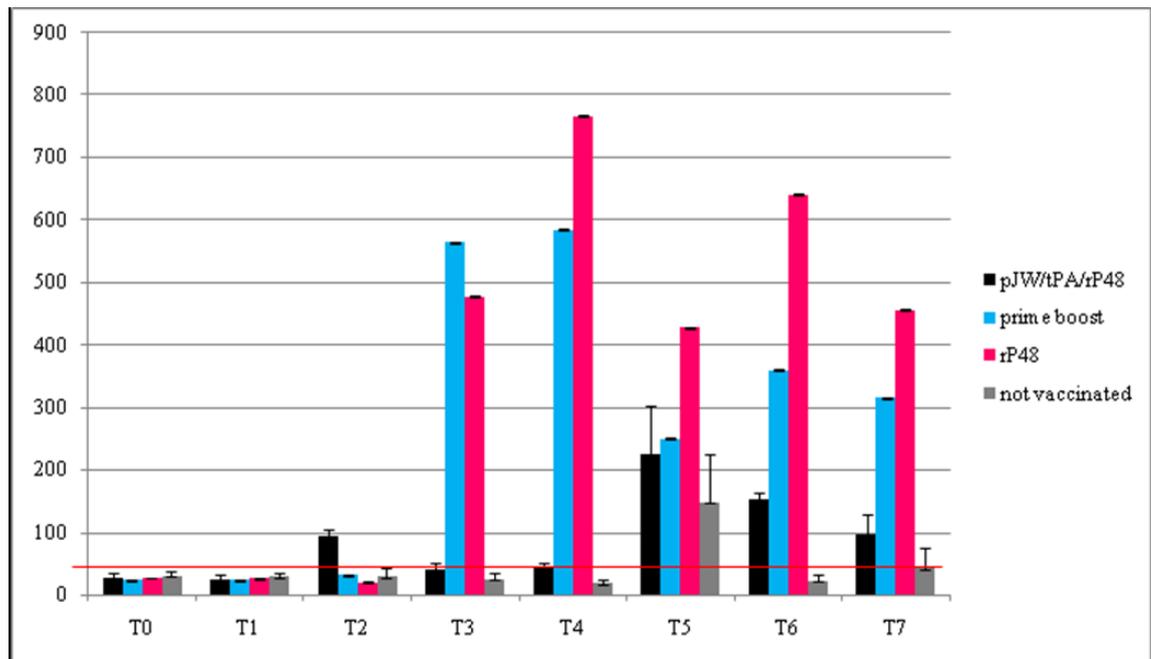


Fig 6.14: ELISA antigene specifico effettuato sui sieri degli animali vaccinati e sugli animali di controllo

I risultati del test ELISA effettuato sul secondo gruppo sperimentale evidenziano come la risposta anticorpale sia fortemente stimolata dall'inoculo della proteina rP48, dato riscontrabile sia nel gruppo B che nel gruppo C. risulta comunque significativa la risposta indotta dal vaccino a DNA.

Anche durante questo secondo esperimento è stato possibile vedere che gli animali si sono infettati dopo circa un mese dall'ingresso nell'allevamento infetto. Al contrario di quanto avvenuto nel trial 1 però, in questo periodo, 5 animali, appartenenti a tutti i gruppi in studio, hanno mostrato sintomi clinici. Quindi possiamo concludere che nonostante il vaccino si sia mostrato efficace non è tuttavia risultato protettivo.

6.8 Tria 2: Valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata

		A	B	C	D	
Parametri	Gruppi	media±SD	media±SD	media±SD	media±SD	Intervallo di riferimento
CD4(%)	T3	27,05 ± 3,39	27,15 ± 6,32	25,51± 1,40	27,07± 0,26	9,5 – 35
	T4	30,25 ± 5,4	34,93 ± 6,8	35,47 ±0,49	34,60 ± 5,11	
	T6	18,73 ±4,95	25,85 ± 1,72	30,85 ±1,05	29,56 ± 4,06	
CD8(%)	T3	14,93 ± 5,74	14,48 ± 3,11	12,49 ±3,56	9,50 ± 1,37	11 – 33,6
	T4	31,08 ± 2,4	23,425 ± 2,5	22,1 ±1,42	17,57 ± 6,08	
	T6	16,23±10,02	27,28 ± 4,54	23,4 ± 0,5	21,55 ± 8,2	
CD4/CD8(%)	T3	1,81±0,85	1,88±0,86	2,04± 0,75	2,85± 0,47	0,4 – 2,5
	T4	1,19±0,59	1,51±0,33	1,58± 0,082	2,21± 1,35	
	T6	1,15±0,87	0,95±0,16	1,32± 0,02	1,37± 0,50	
CD25+(%)	T3	12,65±3,04	13,23±2,68	11,53± 3,41	13,90± 1,68	-
	T4	6,70±1,76	8,15±1,65	9,33± 3,81	9,13± 2,03	
	T6	6,70±1,73	10,28±2,97	7,00± 0,60	9,38± 1,61	
CD25+CD4+	T3	9,68 ± 2,60	9,90 ± 2,86	7,85 ± 1,48	10,13 ± 1,72	-
	T4	5,83 ± 1,50	6,98 ± 1,39	8,17 ±3,85	7,83 ±1,47	
	T6	5,63± 1,60	7,35± 1,63	5,80 ± 0,2	7,60 ± 2,3	

Fig. 6.15 Nella tabella sono riportate le medie + SD (Standard Deviation) dei valori ottenuti dall'analisi del fenotipo linfocitario.

Per quanto riguarda la risposta cellulo mediada, dall'analisi del fenotipo linfocitario si può evidenziare come la vaccinazione abbia stimolato una risposta CD8 (Fig. 6.15).

Infatti si può notare come il valore dei CD8% sia più elevato nei gruppi trattati rispetto ai gruppi di controllo. I picchi maggiori sono riscontrabili nei gruppi A (vaccino a DNA) e B (strategia prime boost) mentre inferiori risultano quelli ottenuti con la vaccinazione con la sola proteina (gruppo C); i valori dei CD8% sono, nei gruppi trattati sempre superiori rispetto a quelli nel gruppo di controllo anche durante il challenge e quindi dopo l'avvenuta infezione naturale.

6.9 Trial 2: Isolamento dal latte di *M. agalactiae*

Sono stati effettuati prelievi di latte dagli animali vaccinati e dai controlli non vaccinati per l'isolamento di *M. agalactiae* allo scopo di esaminare l'influenza della vaccinazione sulla eliminazione del patogeno (Fig. 6.15). I dati raccolti dagli esami colturali sembrano indicare la possibilità che la risposta immunitaria contro la proteina P48 limiti l'eliminazione del microrganismo nel latte negli animali vaccinati con la strategia del prime boost. Infatti nel gruppo B è evidenziabile una interruzione dell'isolamento del patogeno nonostante l'avvenuta infezione ed un primo isolamento. Questo andamento non si verifica nell'animale B4 che è l'unico del gruppo ad avere mostrato sintomi clinici e che ha un comportamento all'isolamento più simile a ciò che è riscontrabile negli animali del gruppo C immunizzati con la sola proteina. In questo animale ipotizzo che il priming non sia andato a buon fine. Questo dato necessita di essere meglio investigato aumentando il numero degli animali nella sperimentazione.

Esame Colturale							
	Cod.	Gen.	Feb.	Mar.	Mag.	Giu.	Lug.
Plasmide	A1	+	○	○	○	○	○
	A2	-	+	+	+	+	+
	A4	-	-	-	+	+	-
Prime boost	B1	+	-	-	-	-	-
	B2	+	-	-	-	-	-
	B3	+	-	-	-	-	-
	B4	-	+	+	+	+	+
rP48	C2	-	-	+	+	+	+
	C3	-	-	-	-	-	-
	C4	+	+	+	+	+	○
negativi	C1	-	+	+	+	+	+
	D2	-	-	-	-	+	+
	D3	+	+	+	+	+	+

Fig 6.15: Tabella riassuntiva dei risultati dell'isolamento da latte: ○ in asciutta

Capitolo 7

Discussione e conclusioni

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

Un'alternativa è costituita dai vaccini a DNA, il cui utilizzo è in via di sperimentazione nella terapia di alcuni tipi di tumori e soprattutto delle malattie infettive (Lowe *et al.*, 2006). Diverse ricerche recenti hanno dimostrato che i vaccini a DNA sono in grado di indurre un'immunità sia di tipo umorale che cellulo-mediata, e che essi rappresentano un utile strumento per la vaccinazione contro i micoplasmi (Barry *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 1997; March *et al.*, 2006).

In un nostro precedente studio il gene *p48* di *Mycoplasma agalactiae*, codificante un antigene immunodominante con funzione putativa di substrate binding protein di un ABC transporter, era stato clonato nel plasmide di espressione eucariotico pVAX1 (Chessa *et al.*, 2009). Il vettore così ottenuto chiamato pVAX1/P48 era stato utilizzato per l'immunizzazione genetica di topi BALBc ed era in grado di indurre negli animali vaccinati una risposta immunitaria specifica contro l'antigene P48 sia di tipo T_h1 che T_h2 con maggiore tendenza verso la risposta T_h1 associata ad una debole risposta T_h2. Nei topi vaccinati con pVAX1/P48 si

rilevava un incremento significativo dei livelli di specifiche IgG nel siero, della proliferazione degli splenociti e dei tassi di citochine prodotte dai linfociti T.

Tuttavia l'esperimento metteva in evidenza i limiti del costrutto pVAX1/P48 nella capacità di stimolare adeguatamente la risposta umorale negli animali vaccinati.

Per ovviare a questo limite, in questo lavoro, abbiamo costruito due plasmidi pJW/t-PA/P48 e pVAX/t-PA/P48 inserendo a monte della sequenza che codifica per la proteina rP48, una sequenza di circa 100bp del gene codificante per l'attivatore tissutale del plasminogeno t-PA (Tissue Plasminogen Activator). Questa sequenza codifica per un peptide leader che ha la funzione di indirizzare la proteina prodotta verso l'esterno della cellula, aumentando quindi, nelle cellule transfettate, la secrezione dell'antigene prodotto con conseguente maggiore possibilità di stimolazione dei linfociti B.

Diversi lavori indicano che l'intensità della risposta immune è influenzata dalla capacità delle cellule transfettate con il plasmide di secernere l'antigene all'esterno della cellula (Boyle JS, *et al.*; Inchauspe G, *et al.*). Questo perché gli antigeni secreti, a differenza di quelli prodotti e ritenuti all'interno della cellula, possono essere captati dalle cellule professionali presentanti l'antigene (APCs) che, dopo pro cessazione, presentano i diversi epitopi antigenici attraverso il Complesso Maggiore di Istompatibilità di classe II (MHC II) alle cellule T helper *naive*, innescando così quel processo chiamato "priming" che risulta essere fondamentale per l'attivazione efficiente sia della risposta umorale che di quella cellulo-mediata. La secrezione dell'antigene da parte delle cellule che lo producono è fondamentale poi per la efficiente stimolazione delle cellule B, anche queste fanno parte delle APCs e dopo captazione e processazione dell'antigene sono in grado di presentarlo alle cellule T che a loro volta producendo diverse citochine sono in grado di stimolare i linfociti B a trasformarsi in cellule deputate alla produzione di anticorpi dette plasmacellule.

In questo contesto la presenza, nei vettori per l'immunizzazione genetica, di sequenze secretorie, omologhe o eterologhe, può indurre la secrezione di antigeni espressi da parte delle cellule transfettate.

Le proteine cellulari che normalmente vengono secrete contengono una sequenza segnale in grado di indirizzare la proteina neosintetizzata verso il pathway di secrezione. Il segnale di secrezione risiede in una singola e ristretta sequenza lineare di aminoacidi, detta “peptide segnale” che é esposta nella proteina ripiegata. Il peptide viene in seguito clivato da peptidasi intracellulari e la proteina può così passare dal reticolo endoplasmatico nell’apparato del Golgi per essere secreta all’esterno (Pfeffer & Rothman, 1987 Ann. Rev. Biochem.).

In questo lavoro abbiamo costruito due vettori per l’immunizzazione genetica degli ovini, chiamati pJWtPA/P48 e pVAX/tPA/P48, contenenti la sequenza segnale dell’attivatore tissutale del plasminogeno umano che viene espresso in fusione con il gene p48 di *M. agalactiae*. L’attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) sintetizzato normalmente nelle cellule è una proteina costituita da 562 aminoacidi che presenta all’estremità N-terminale una sequenza segnale di 35 aminoacidi a sua volta distinta in un peptide segnale di 23 aminoacidi e un propeptide di 12 aminoacidi. La sequenza espressa in fusione con la P48 di *M. agalactiae* nei due vettori pJWtPA/P48 e pVAXtPA/P48 è rappresentata dal peptide segnale.

Per valutare la corretta espressione e la secrezione nel medium extracellulare della proteina ricombinante P48 di *M. agalactiae*, sono state transfettate cellule eucariotiche HEK293.

Nelle cellule HEK 293 transfettate, è stato possibile isolare l’mRNA specifico per la proteina P48. In queste stesse cellule, attraverso Western blotting, è stata ricercata la proteina P48. Solo le cellule transfettate con il plasmide pJWtPA/P48 hanno prodotto e secreto la proteina nel medium extracellulare mentre quelle transfettate con il pVAXtPA/P48, nonostante fosse evidenziabile l’mRNA specifico, non hanno prodotto quantità rilevabile di P48. Questo fatto è probabilmente dovuto alla scarsa produzione di proteina da parte di questo plasmide che non è in grado, a differenza di pJWtPA/P48, di replicare all’interno della cellula.

I risultati di questo lavoro mostrano chiaramente che PJWt-PA/rP48 promuove correttamente l’espressione della proteina P48 in cellule eucariotiche e promuove

la secrezione della proteina ricombinante nel medium extracellulare, premessa fondamentale per una significativa stimolazione dell'immunità umorale.

L' Agalassia Contagiosa è largamente diffusa in Europa, Asia, Africa, e particolarmente nell'area del bacino del Mediterraneo dove è molto praticato l'allevamento di ovini con prevalente attitudine per la produzione lattea. E' caratterizzata clinicamente da mastite, artrite, cheratocongiuntivite e occasionalmente aborto. Si trasmette per contatto diretto tra animale ammalato ad animale sano, attraverso il latte di animali con sintomatologia clinica manifesta, e attraverso il contatto con portatori asintomatici che fungono da serbatoio del patogeno anche per diversi anni. La malattia, per l'alto impatto economico che riveste, è inclusa dall'O.I.E. (organizzazione internazionale delle epizoozie) nella lista B; è infatti stimato che nei paesi colpiti essa arrechi annualmente danni per svariati milioni di dollari a causa del calo della produzione lattea e dell'aumento della mortalità neonatale nei soggetti infetti. La terapia antibiotica, efficace per ridurre la sintomatologia clinica, non è in grado di eliminare completamente i portatori, per cui il micoplasma può continuare a circolare per diverso tempo anche nelle aree apparentemente risanate. A causa delle caratteristiche epidemiologiche della Agalassia Contagiosa, al momento, i vaccini sembrano rappresentare il principale strumento di lotta per il controllo della malattia. La profilassi vaccinale rappresenta infatti un fondamentale mezzo per la prevenzione delle malattie infettive e, se correttamente applicata, un'importante premessa per la loro eradicazione.

In questo lavoro sono stati testati due tipi di vaccino di nuova generazione prodotti nel nostro laboratorio: un vaccino a DNA basato sul gene codificante per l'antigene P48 ed un vaccino basato sulla proteina ricombinante P48. La lipoproteina P48 è un antigene superficiale invariabile che appartiene ad una famiglia di proteine basiche di membrana. Il gene *p48* (Rosati *et al.*, 1999) ed i suoi omologhi in *M. bovis* (Robino *et al.*, 2005), *M. capricolum* (Alberti *et al.*, 2007) e *M. mycoides* sono localizzati a monte dell'ATP-binding protein di un ABC transporter. L'uso di Blast-p ha permesso di individuare una forte e significativa omologia tra la P48 e differenti substrate binding proteins di ABC-

transporters identificate in micoplasmi ed in altre specie batteriche. In particolare, la proteina P48 ha un elevato grado di omologia con la Xylose binding protein dell'ABC transporter di *Mycoplasma pulmonis* (E value $8e-30$), *Mycoplasma hyopneumoniae* (E value $1e-27$), e *Mycoplasma sinoviae* (E value $3e-22$) e con le substrate binding proteins di un sistema di trasporto ABC-type (non caratterizzato) di *Oenococcus oeni* (E value $5e-08$), *Clostridium sticklandii* (E value $5e-07$), e *Spiroplasma citri* ($9e-08$). Questi dati indicano quindi che anche la proteina P48 di *M.agalactiae* ha probabilmente un'attività di substrate binding protein.

È stato dimostrato che gli ABC transporters sono altamente immunogenici e rappresentano dei target ideali per lo sviluppo di vaccini contro gli agenti infettivi (Garmory & Titball, 2004); per esempio, l'immunizzazione con le proteine PiaA e PiuA (iron uptake proteins appartenenti a un ABC transporter) previene infezioni respiratorie e sistemiche da *Streptococcus pneumoniae* (Brown *et al.*, 2001). La proteina P48 è stata identificata come antigene immunodominante, viene espressa in misura maggiore rispetto alle altre proteine e viene precocemente riconosciuta in sieri di animali naturalmente infetti o infettati sperimentalmente (Rosati *et al.*, 1999).

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

Il vaccino a DNA prodotto nel nostro laboratorio, chiamato pJWtPA/P48, contiene le tipiche sequenze necessarie per il corretto funzionamento di un vaccino genetico quali un promotore eucariotico in grado di permettere l'espressione dei geni inseriti a valle, un sito di poliadenilazione, ecc. Il vaccino a DNA è stato somministrato, in un primo trial clinico, attraverso differenti vie e sistemi quali iniezione intramuscolo, iniezione intradermica adiuvato con liposomi o attraverso Gene-Gun, da solo o in combinazione con la proteina ricombinante P48. Ad un gruppo di animali è stato somministrato intramuscolo il vaccino costituito dalla sola P48 ricombinante.

Gli ovini vaccinati sono stati sottoposti a challenge previo trasferimento in un allevamento naturalmente infetto. La risposta immunitaria, subito dopo la vaccinazione e durante il challenge, è stata valutata in Western blotting e in rP48-ELISA.

I risultati dei Western blotting e dell'ELISA dimostrano che sia la somministrazione del vaccino a DNA che della P48 ricombinante sono in grado di stimolare una forte risposta immunitaria umorale.

Nel siero di animali vaccinati con la sola proteina ricombinante, sono stati rilevati anticorpi specifici per la P48 già dopo 15 giorni dalla prima vaccinazione. Questo conferma la già nota attività immunodominante della proteina P48. Gli animali vaccinati con la metodica del prime boost hanno evidenziato il manifestarsi di una risposta anticorpale specifica dopo 30 giorni dal primo richiamo, così come quelli vaccinati intramuscolo con pJWt-PA/P48 e, anche se in misura minore, quelli vaccinati utilizzando la Gene-Gun. Nessuna risposta è invece evidenziabile negli animali vaccinati per via intradermica e adiuvati con i liposomi.

In seguito al challenge tutti gli animali, vaccinati e non vaccinati, risultano positivi all'infezione da *M. agalactiae* dopo circa un mese.

Questo è dimostrato dal fatto che nelle prove di Western blotting con antigene totale eseguiti sui sieri prelevati agli animali prima del challenge non si evidenzia nessun'altra banda antigenica a parte la P48, mentre in quelli prelevati dopo il challenge compaiono le altre bande corrispondenti agli altri antigeni di *M. agalactiae*.

Nonostante questo nessun animale ha manifestato sintomatologia clinica, compreso il gruppo di controllo. Inoltre dal latte degli animali vaccinati e di controllo è stato tentato l'isolamento di *M. agalactiae* che ha dato però esito negativo. L'assenza di sintomatologia clinica ed il mancato isolamento di *M. agalactiae* dal latte degli animali infetti può fare supporre la presenza in allevamento di una carica infettante molto bassa dovuta probabilmente al particolare andamento epidemiologico tipico delle infezioni sostenute da *M. agalactiae*. Infatti: se l'infezione avviene durante la lattazione la carica infettante risulta essere molto alta e il contagio tende a propagarsi all'interno del

gregge attraverso questa via in brevissimo tempo; al contrario in asciutta, e quindi con infezione per mezzo di altre vie, il contagio si diffonde più lentamente per poi ripresentarsi ad alti ritmi di trasmissione col ritorno in lattazione degli animali. Per questo motivo è stato opportuno effettuare un secondo test in campo vaccinando gli animali nello stesso periodo nel quale vengono normalmente vaccinati con il vaccino spento attualmente in uso, e cioè durante la gravidanza. Gli animali sono stati vaccinati utilizzando le preparazioni vaccinali e le vie di somministrazione che si sono dimostrate efficaci nel primo test, sono pertanto stati suddivisi in 4 gruppi (vaccinazione con Vaccino a DNA, metodica prime boost, proteina ricombinante e non vaccinati) e sono stati vaccinati tre volte. Quindici giorni dopo l'ultimo richiamo sono stati trasferiti in un allevamento infetto nel quale hanno partorito mettendosi così nelle condizioni di essere più suscettibili alla infezione. I western blot hanno di nuovo confermato l'avvenuta infezione ma questa volta animali appartenenti a tutti i gruppi in esame hanno mostrato sintomi clinici comprendenti mastite e artriti. Il secondo trial, effettuato durante il periodo di maggiore suscettibilità alla malattia, ha permesso di concludere che la vaccinazione contro l'antigene P48 non è protettiva nonostante induca efficacemente la risposta immunitaria. Un'altra differenza che è stato possibile riscontrare tra i due trial è l'isolamento del microrganismo dal latte. Mentre durante il primo test in campo non è stato possibile isolare il patogeno, durante il secondo il micoplasma è stato isolato in diversi esemplari. È stato inoltre possibile evidenziare un differente comportamento nella liberazione del patogeno nei diversi gruppi, con il gruppo prime boost che dopo una iniziale fase in cui è stato possibile l'isolamento, appena successiva all'avvenuta infezione, non ha più eliminato il patogeno nel latte. Questo andamento non si verifica nell'animale B4 che è l'unico del gruppo ad avere mostrato sintomi clinici e che ha un comportamento all'isolamento più simile a ciò che si vede negli animali del gruppo C immunizzati con la sola proteina. In questo animale ipotizzo che il priming non sia andato a buon fine. Questo dato necessita di essere meglio investigato aumentando il numero degli animali nella sperimentazione. Se confermato, potrebbe portare allo sviluppo di piani di limitazione dell'espansione

della malattia negli allevamenti infetti. Il lavoro sul vaccino contro l'Agalassia contagiosa continuerà aggiungendo altri epitopi alle preparazioni vaccinali. A questo scopo abbiamo già iniziato la produzione della proteina P80, una proteina altamente immunogena, in realtà il secondo antigene ad essere riconosciuto dal sistema immunitario in seguito ad infezione da *Mycoplasma agalactiae*. Questa proteina verrà inserita nel plasmide pJW/tPA/rP48 in modo da essere espressa in fusione con la P48. Le due proteine saranno separate tra loro da un ponte di glicine in modo da impedire modificazioni della loro struttura tridimensionale.

In conclusione, in questo lavoro, siamo riusciti a stimolare la risposta immunitaria specifica contro l'antigene P48 di *M.agalactiae* utilizzando un vaccino genetico, dato non trascurabile vista la difficoltà nei grossi animali, a differenza del modello murino, di indurre un'immunità specifica con solo DNA. Nonostante lo sviluppo di una risposta immunitaria questa non si è rivelata protettiva nei confronti dell'insorgenza della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. **Adegboye, D.S., U. Rasberry, P.G. Halbur, J.J. Andrews, and R.F. Rosenbusch.** 1995. Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 261-265.
2. **Adler HE, DaMassa AJ, Brooks DL:** 1980, Caprine Mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. *Am J Vet Res* 41:1677-1679.
3. **Ball, H.J., D. Finlay, and G.A.C. Reilly.** 1994a. Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. *Vet. Rec.* **135**: 531-532. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
4. **Ball, H.J., D.P. Mackie, D. Finlay, J. Gunn, E.A. MacFarland, G.A.C. Reilly, and D. Pollock.** 1994b. An antigen-capture ELISA for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Ir. Vet. J.* 47: 45-52. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. 2003. *Ann. Méd. Vét.* **147**: 23-39.
5. **Barnes, A. G., Barnfield, C., Brew, R. & Klavinskis, L. S.** (2000) Recent developments in mucosal delivery of pDNA vaccines. *Current Opinions in Molecular Therapeutics* 2, 87–93
6. **Barouch, D.H.** 2006. Rational design of gene-based vaccines. *J. Pathol.* **208**, 283–289.
7. **Barouch, D.H., N.L. Letvin, and R.A. Seder.** (2004). The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol. Rev.* **202**, 266–274.
8. **Barry, M.A., W. C. Lai, and S. A. Johnston.** 1995. Protection against mycoplasma infection with expression-library immunization. *Nature* 377:632–635
9. **Baseman, J.B., S.P. Reddy, and S.F. Dallo.** 1996. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestation of mycoplasma-mediated human infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: S137-S144.
10. **Behrens, A., M. Heller, H. Kirchoff, D. Yogev, and R. Rosengarten.** 1994. A family of phase-and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* **62**: 5075-5084.

11. **Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F.,** 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16 (3), 848–873.
12. **Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. Wayne Davis, H. A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1462.
13. **Bogdan, C., Schroppe, K., Lohoff, M., Rollinghoff, M. & Solbach, W.** (1990) Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology* 20, 2533–2540
14. **Boothby, J.T., D.E. Jasper, M.H. Rollins, and C.B. Thomas.** 1981. Detection of *Mycoplasma bovis* specific IgG in bovine serum by enzyme-linked immunoadsorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1242-1247. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
15. **Boretti, F. S., Leutenegger, C. M., Mislin, C., Hofmannlehmman, R., König, S., Schroff, M., Junghans, C., Fehr, D., Huettner, S. W., Habel, A., Flynn, J. N., Aubert, A., Pedersen, N. C., Wittig, B. & Lutz, H.** (2000) Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression. *AIDS* 14, 1749–1757
16. **Boyle JS, Koniaras C, Lew AM.** Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 1997;9:1897–906.
17. **Brandsma, J.L.** 2006. DNA vaccine design. *Methods Mol Med.* 127:3-10.
18. **Brank, M., D. Le Grand, F. Poumarat, P. Brezille, R. Rosengarten, and C. Citti.** 1999. Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab.*
19. **Brown, J. S., A. D. Ogunniyi, M.C. Woodrow, D. W. Holden, and J. C. Paton.** 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 69:6702-6.
20. **Brown, M.B., J.K. Shearer, and F. Elvinger.** 1990. Mycoplasmal mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196: 1097-1101.

21. **Byrne, W.J., H.J. Ball, N. Brice, R. McCormack, S.E. Baker, R.D. Ayling, and R.A.J. Nicholas.** 2000. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.* 146: 368-369.
22. **Calarota, S.A., and D.B. Weiner.** 2004. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**, 84–99.
23. **Carle, P., F. Laigret, J.G. Tully, and J.M. Bove.** 1995. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 178-181.
24. **Carter, G.R., and M.M.Chengappa.** 1991. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology.* Lea & Febiger. Philadelphia, London.
25. **Chavez Gonzales, Y.R., C.R. Bascunana, G. Bolske, J.G. Mattsson, C. Fernandez Molina, and K-E Johansson.** 1995. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.* 47: 183-190.
26. **Chen, Y. L., S. N. Wang, W. J. Yang, Y. J. Chen, H. H. Lin, and D. Shiuan.** 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun.* 71:1155-60.
27. **Citovsky, V., S. Rottem, O. Nussbaum, Y. Laster, R. Rott, and A. Loyter.** 1988. Animal viruses are able to fuse with prokaryotic cells. Fusion between Sendai or influenza virions and *Mycoplasma*. *J. Biol. Chem.* **263**: 461-467.
28. **Coban, C., K.J. Ishii, M. Gursel, D.M. Klinman, and N. Kumar.** 2005. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 647–655
29. **Cohen, J.** (1993) Naked DNA points way to vaccines. *Science* 259, 1691–1692
30. **Cole, B.C., Y. Naot, E.J. Stanbridge, and K. S. Wise.** 1985. Interaction of mycoplasmas and their products with lymphoid cells in vitro, p. 204-205. *In* S. Razin, and M.F. Barile (ed.), *The mycoplasmas*, vol. IV. *Mycoplasma pathogenicity.* Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
31. **Corrales J.C. , Esnal C. De la Fea, A. Sanchez P. Assuncao J.B. Poveda A. Contreras** 2007 Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68 (2007) 154–166
32. **Corrales, J.C., Sanchez, A., Luengo, C., Poveda, J.B., Contreras, A.,** 2004. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano–Granadina goat herds. *J. Dairy Sci.* 87 (10), 3165–3171.

33. **Cottew, G. S.** 1979. Caprine-ovine mycoplasmas, p 103–132. *In* The mycoplasmas, vol II. Academic Press, New York, N.Y.
34. **Da Massa, A. J.** 1983. Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goat milk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **183**:548–554.
35. **Damassa, A.J., Brooks, D.L., Holmberg, C.A., Moe, A.I.,** 1987. Caprine mycoplasmosis: an outbreak of mastitis requiring the destruction of 700 goats. *Vet. Rec.* **120** (17), 409–413.
36. **DeBey, M.C., and R.F. Ross.** 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* **62**: 5312-5318.
37. **Dohms, J.E., L.L. Hnatow, P. Whetzel, R. Morgan, and C.L. Keeler.** 1993. Identification of the putative cytheadhesion gene of *Mycoplasma gallisepticum* and its use as a DNA probe. *Avian. Dis.* **37**: 380-38839.
38. **Dunham Stephen P.,** 2002. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science* 2002, **73**, 9–16
39. **Dybvig, K., and L.L. Voelker.** 1996. Molecular biology of mycoplasma. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 25-57.
40. **East NE, DaMassa AJ, Logan LL, Brooks DL, McGowan B.,** 1983, Milkbourne outbreak of Mycoplasma Mycoides subspecies mycoides infection in a commercial goat dairy. *J Am Vet Med Assoc* **182**:1338-1341
41. **Farina, R., and F. Scattozza,** a cura di. 1998. Trattato di malattie infettive degli animali, seconda edizione. UTET
42. **Femenia, F., Crespeau, F., Fontaine, J. J., Boucheix, C. & Parodi, A. L.** (1994) Early haematological and pathological abnormalities of pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Veterinary Research* **25**, 544–554
43. **Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M.D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M.Kelley, J. L. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M.Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M.Saudek, C. A. Phillips, J. M.Merrick, J-F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P.-C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Petterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison III, and J. C. Venter.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397–403.
44. **Gabridge, M.G., Y.D. Barde-Stahe, R.B. Polisky, and J.A. Engelhardt.** 1997. *Infect Immun.* **16**: 766-772.

45. **Gaillard-Perrin G, Picavet DP, Perrin G:** 1985, Isolement de *Mycoplasma putrefaciens* dans deux troupeaux de chèvres présentant des symptômes d'agalactie. *Revue Med vet* 137:67-70
46. **Garmory, H.S., and R.W. Titball.** 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect Immun.* 69:6702.
47. **Geary, S.J., M.E. Tourtellotte, and J.A. Cameron.** 1981. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. *Science.* **212**: 1032-1033. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
48. **Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M., Alonso, J.M., Rey, J., Poveda, J.B., Hermoso de Mendoza, J.,** 1999a. Mastitis caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (large colony type) in goat flocks in Spain. *Zentralbl.Veterinaermed. B* 46 (10), 741–743.
49. **Gil, M.C., Pena, F.J., Hermoso, d.M., Gomez, L.,** 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50 (10), 484–487.
50. **Glansbeek, H. L., Haagmans, B. L., Lintelo, E. G., Egberink, H. F., Duquesne, V., Aubert, A., Horzinek, M.C. & Rottier, P. J.** (2002) Adverse effects of feline IL-12 during DNA vaccination against feline infectious peritonitis virus. *Journal of General Virology* 83, 1–10
51. **Goltz JP, Rosendal S, McCraw BM, Ruhnke HL:** 1986 experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goats. *Can J Vet Res* 50:59-57
52. **Gourlay, R.N., L.H. Thomas, and S.G. Wyld.** 1989. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet. Rec.* **124**: 420-422.
53. **Greco, G., M. Corrente, D. Buonavoglia, A. Aliberti, and A. Fasanella.** 2002. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.* **25**:17-20.
54. **Gurunahan, S., KlinmanLINMAN, D. M.& Seder, R. A.** (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Reviews of Immunology* 18, 927–97

55. **Gurunahan, S., Prussin, C., Sacks, D. L. & Seder, R. A.** (1998) Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine* 4, 1409–1415
56. **Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder.** 2000. DNA vaccines: immunology, Application , and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-974.
57. **Hanlon, L., Argyle, D., Bain, D., Nicolson, L., Dunham, Golder, M.C., Mcdonald, M., Mcgillivray, C., Jarrett, O., Neil, J. C. & Onions, D. E.** (2001) Feline leukaemia virus vaccine efficacy is enhanced by co-administration with IL-12 and IL-18 expression vectors. *Journal of Virology* 75, 8424–8433
58. **Hasso, S.A., Aldarraji, A.M., Alaubaidi, J.M.,** 1994. Pathology of experimentally-induced contagious agalactia in goats. *Small Rumin. Res.* 13, 79–84.
59. **Hasso, S.A., Al-Omran, A.H.,** 1994. Antibody response patterns in goats experimentally infected with *Mycoplasma agalactiae*. *Small Rumin. Res.* 14, 79–81.
60. **Heller, M., E. Berthold, H. Pfutzner, R. Leirer, and K. Sachse.** 1993. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet. Microbio.* 37: 127-133. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
61. **Heller, M., E. Berthold, H. Pfutzner, R. Leirer, and K. Sachse.** 1993. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Vet. Microbio.* 37: 127-133.
62. **Higgins, F. Christofer.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205-210.
63. **Hill, A.C.** 1977. The metabolic inhibition test for mycoplasmas based on phosphate production. *J. Hygiene.* 79: 391-393. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
64. **Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkel, B.C. Li, and R. Hermann.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24: 4420-4449.
65. **Himmelreich, R., H. Plagens, H. Hilbert, B. Reiner, and R. Herrmann.** 1997. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.* 25:701–712.
66. **Hosie, M.J., Flynn, J. N., Rigby, M.A., Cannon, C., Dunsford, T., Mackay, N. A., Argyle, D., Willet, B. J., Miyazawa, T., Onions, D. E., Jarrett, O. & Neil, J. C.** (1998) DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency

virus infection without inducing detectable antiviral antibodies. *Journal of Virology* 72, 7310–7319.

67. **Howard, C.J., J. Collins, and R.N. Gourlay.** 1977. A single radial haemolysis technique for the measurement of antibody to *Mycoplasma bovis* in bovine sera. *Res. Vet. Sci.* 23:128-130.
68. **Huang, Y., J.A. Robertson, and G.W. Stemke.** 1995. An unusual rRNA gene organization in *Mycoplasma fermentans* (incognitos strain). *Can. J. Microbiol.* 41: 424-427.
69. **Hyman, H.C., D. Yogev, and S.Razin.** 1987. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 726-728.
70. **Inchauspe G, Vitvitski L, Major ME, Jung G, Spengler U, Maisonnas M, Trepo C.** Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 1997;16:185–95.
71. **Ise, W., M.Totsuka, Y. Sogawa, A. Ametani, S. Hachimura, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa.** 2002. Naive CD4+ T Cells Exhibit Distinct Expression Patterns of Cytokines and Cell Surface Molecules on Their Primary Responses to Varying Doses of Antigen. *J. Immunol.* 168:3242-3250.
72. **Ito, Y.** (1960) A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (shope) of cottontail rabbits. *Virology* 12, 596–601
73. **Jensen, J. S., H. T. Hansen, and K. Lind.** 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* 34:286–291.
74. **Kaplan, P.J., and S.J. Garvey.** 1986. *Mycoplasma neurolyticum* membranes: a T-independent antigen in the rat. *Immunol. Invest.* 41: 424-427.
75. **Kirchhoff, H.** 1992. Motility, p. 289-306. *In* J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
76. **Knudtson, W.U., D.E. Reed, and G. Daniels.** 1986. Identification of Mycoplasmatales in pneumonic calf lungs. *Vet. Microbiol.* 11: 79-91. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles*. 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
77. **Knudtson, W.U., D.E. Reed, and G. Daniels.** 1986. Identification of Mycoplasmatales in pneumonic calf lungs. *Vet. Microbiol.* 11: 79-91.

78. **Krause, D.C.** 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol. Microbiol.* **20**: 247-253.
79. **Laddy, D. J., and D. B. Weiner.** 2006. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. *Int Rev Immunol.* **25**:99-123.
80. **Ladefoged, S.A., and G. Christiansen.** 1992. Physical and genetic mapping of the genome of five *Mycoplasma hominis* strains by pulse-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **174**: 2199-2207.
81. **Lai, W. C., S. P. Pakes, K. Ren, Y.S. Lu, and M.Bennett.** 1997. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol.* **158**:2513-6.
82. **Lambert, M.,** 1987. Contagious agalactia of sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **6** (3), 681–697.
83. **Laylor, R., N. Porakishvili, J. B. De Souza, J.H. Playfair, P. J. Delves, and T. Lund.** 1999. DNA vaccination favours memory rather than effector B cell responses. *Clin Exp Immunol.* **117**:106-12.
84. **Liu, L., X. Zhou, H. Liu, L. Xiang, and Z. Yuan.** 2005. CpG motif acts as a 'danger signal' and provides a T helper type 1-biased microenvironment for DNA vaccination. *Immunology* **115**:223-30.
85. **Liu, M., B. Wahren, and G.B. Karlsson Hedestam.** 2006. DNA Vaccines: Recent Developments and Future Possibilities. *Human Gene Therapy* **17**: 1051-1061.
86. **Liu, N., N. Ohnishi, L. Nil, S. Akira, and K.n B. Bacon.** 2003. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nature Immunology* **4**:687-693.
87. **Lo, S.C.** 1992. *Mycoplasmas in AIDS*, p. 525-545. *In* Maniloff, J., R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.). 1992. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
88. **Lo, S.C., M.M. Hayes, H. Kotani, P.F. Pierce, D.J. Wear, P.B. Newton III, J.G. Tully, and J.W. Shih.** 1993. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.* **6**: 276-280.
89. **Loher, B. I., Rankin, R., Pontarollo, R., King, T., Willson, P., Babiuk, L. A. & Drunen Littel-Van Den Hurk, S.** (2001) Suppository-mediated DNA immunization induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Virology* **289**, 327–333

90. **Lowe, D. B., M.H. Shearer, and R. C. Kennedy.** 2006. DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease. *J. Cell. Biochem.* 98:235-242.
91. **Maniloff, J.** 1996a. Mycoplasma phylogeny: correlation with molecular biological and paleontological changes, p. 8. *In* abstract of the 8th IUMS International Congress of Bacteriology.
92. **Maniloff, J.** 1996b. The minimal cell genome: “on being the right size”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10004-10006.
93. **Maniloff, J., K. Dybvig, and T.L. Sladek.** 1992. Mycoplasma DNA restriction and modification, p.325-330. *In* J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
94. **Maniloff, J., R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.).** 1992. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
95. **March, J. B., C. D. Jepson, J. R. Clark, M.Totsika, and M.J. Calcutt.** 2006. Phage library screening for the rapid identification and in vivo testing of candidate genes for a DNA vaccine against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype. *Infect Immun.* 74:167-74.
96. **Marshall, A.J., R.J. Miles, and L. Richards.** 1995. The phagocytosis of mycoplasmas. *J. Med. Microbiol.* 43: 239-250.
97. **McMartin DA, McOwan KJ, Swift LL.,** 1980 A century of classical contagious caprine pleuropneumoniae: from original description to aetiology. *Br Vet J* 136:507-515
98. **Megid, R., R.A.J. Nicholas, and R.J. Miles.** 2001. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet. Res. Commun.* 25: 1-12. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
99. **Megid, R., R.A.J. Nicholas, and R.J. Miles.** 2001. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet. Res. Commun.* 25: 1-12.
100. **Meng, K. E., and R. M.Pfister.** 1980. Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J. Bacteriol.* 144:390–399.
101. **Meng, K.E., and R.M. Pfister.** 1980. Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J. Bacteriology.* 144: 390-399.

102. **Mir, L. M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. & Scherman, D.** (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4262–4267
103. **Muenster, O.A. E.E. Ose, and T. Matsuoka.** 1979. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. *Can. J. Comp. Med.* 43: 392-398. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
104. **Muenster, O.A. E.E. Ose, and T. Matsuoka.** 1979. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. *Can. J. Comp. Med.* 43: 392-398.
105. **Muhradt, P.F., H. Quentmeier, and E. Schmitt.** 1991. Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect. Immun.* 59: 3962-3968.
106. **Muto, A., and S. Osawa.** 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 166-169.
107. **Nakayama, T., S. Sonoda, T. Urano, M. Osano, N. Maehara, K. Sasaki, E. Hayatsu, and S. Makino.** 1992. Interferon production during the course of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr. Infect. Dis. Journal.* 11: 72-77.
108. **Naot, Y.** 1993. Mycoplasmas as immunomodulators, p. 57-67. *In* I. Kahane, and A. Adoni (ed.), *Rapid diagnosis of mycoplasmas.* Plenum Press, New York, N.Y.
109. **Nicholas, R.A.J.** 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin. Res.* 45:145–149.
110. **Nicholas, R.A.J.** 2005. Contagious agalactia and other mycoplasmal mastitides of small ruminants, p 1114-1116. *In:* C. M. Kahn, S. Line (ed.), *The Merck Veterinary Manual*, 9th ed. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N. J.
111. **Nicolet, J.** 1994. Mycoplasma infections in cattle, sheep and goats: methods for diagnosis and prophylaxis. *Off. Int. Epiz.* 62nd SG: 1±13.
112. **Nielsen, K.H., R.B. Stewart, M.M.Garcia, and M.D. Eaglesome.** 1987. Enzyme immunoassay for detection of *Mycoplasma bovis* antigens in bull semen and preputial washing. *Vet. Rec.* 120: 596-598
113. **Nobiron, I., Thompsom, I., Browlie, J. & Collins, M.E.** (2000) Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA

encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* 76, 129–42

114. **Olson, L.D., C.A. Renshaw, S. Rottem, and J.B. Boal.** 1993. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism: a ¹³C-NMR study. *FEMS Microbiol. Letters*. 108: 47-52.
115. **Opitz, O., and E. Jacobs.** 1992. Adherence epitopes of *Mycoplasma genitalium* adhesion. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1785-1790.
116. **Pascal Sirand-Pugnet^{1,2}, Carole Lartigue^{1,2}, Marc Marena³, Daniel Jacob⁴, Aurélien Barré⁴, Valérie Barbe⁵, Chantal Schenowitz⁵, Sophie Mangenot⁵, Arnaud Couloux⁵, Beatrice Segurens⁵, Antoine de Daruvar⁴, Alain Blanchard^{1,2}, Christine Citti^{3*}** (2007) Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* 2007 May 18;3(5):e75
117. **Pascucci Silvio** Ezio patogenesi delle micoplasmosi (Lezione al Corso di formazione organizzato dall'Area Sanità Pubblica Veterinaria e dall'Ordine dei Medici Veterinari di Forlì – Cesena : ISZLER Forlì – 15 marzo 2007)
118. **Perreau P Breard A:** 1979 La mycoplasmosse caprine à M.Capricolum. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2:87-97
119. **Pisetsky, D. S.** (1996) Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity.* 5, 303–310
120. **Pollack, J.D., M.V. Williams, and R.N. McElhaney.** 1997. The comparative metabolism of the Mollicutes (mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**: 269-354.
121. **Poumarat, F., B. Perrin, and D. Longchambon.** 1991. Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.* 29: 329-338.
122. **Poumarat, F., D. Le Grand, and D. Bergonier.** 1996. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point Vet.* 28: 761-767. *In* Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis*: synthèse des connaissances actuelles. 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
123. **Poumarat, F., D. Longchambon, and J.L. Martel.** 1992. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within “*M. mycoides* cluster” and within “glucose and arginine-negative cluster” of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 32: 375-390.

124. **Poumarat, F., M.Perrin, P. Belli, and J.L. Martel.** 1987. Recherche des anticorps anti-*Mycoplasma bovis* dans le sérum de bovins à l'aide de la réaction d'hémagglutination passive: valeur et limites de la réaction. *Rev. Med. Vet.* 138, 12: 981-989.
125. **Ramos-Payan, R., M.Aguilar-Medina, S. Estrada-Parra, Y.M.J. Gonzalez, L. Favila-Castillo, A. Monroy-Ostria, and I.C. Estrada Garcia.** 2003. Quantification of cytokine gene expression using an economical realtime polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. *Scand. J. Immunol.* 57:439– 445.
126. **Ramshaw, I. A. & Ramsay, A. J.** (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today* 21, 163–165
127. **Razin, S.** 1978. The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42: 414-470.
128. **Razin, S.** 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). *Microbiol. Rev.* 49: 419-455.
129. **Razin, S.** 1985. Mycoplasma adherence, p.161-202. *In* S. Razin and M.F. Barile (ed.), *The mycoplasmas*, vol. IV. Mycoplasma pathogenicity. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
130. **Razin, S.** 1991. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*a, and *Asteroplasm*a p.1937-1959. *In* A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W.Harder, and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. II, 2^a ed. Springer-verlag, New York, N.Y.
131. **Razin, S.** 1991. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*a, and *Asteroplasm*a p.1937-1959. *In* A. Balows, H.G. Truper, M.Dworkin, W.Harder, and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. II, 2a ed. Springer-verlag, New York, N.Y.
132. **Razin, S.** 1992. Mycoplasma taxonomy and ecology, p. 3-22. *In* J. Maniloff, R.N. McElhaney, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed.), *Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
133. **Razin, S.** 1993. Mycoplasma membranes as models in membrane research. *Subcell. Biochem.* 20: 1-28. Plenum Press, New York, N.Y.
134. **Razin, S., and E. Jacobs.** 1992. Mycoplasma adhesion. *J. Gen. Microbiol.* 138: 407-422.
135. **Razin, S., and E.A. Freundt.** 1984. The Mollicutes, Mycoplasmatales, and Mycoplasmataceae, p. 740-742. *In* N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. I The Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

136. **Razin, S., and M.F. Barile (ed.).** 1985. The mycoplasmas, vol. IV Mycoplasma pathogenicity. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
137. **Razin, S., D. Yogeve, and Y Naot.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156.
138. **Razin, S., I. Kahane, and J. Kovartovsky.** 1972. Pathog. Mycoplasmas, Ciba found. Symp., pp. 93-122.
139. **Reilly, G.A.C., H.J. Ball, J.P. Cassidy, and T.D.G. Bryson.** 1993. First reported isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 133: 550-551. In Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* 147: 23-39.
140. **Reyes-Sandoval, A., and H.C. Ertl.** 2001. DNA vaccines. *Curr. Mol. Med.* 1, 217-243.
141. **Rink, L., A. Kruse, W. Nicklas, J. Hoyer, and H.Kirchner.** 1992. Induction of cytokines in human peripheral blood and spleen cells by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen. *Lymphokine Cytokine Res.* 11: 105-108.
142. **Risi, G.F., D.H. Martin, J.A. Silberman, and J.C. Cohen.** 1988. A DNA probe for detecting *Mycoplasma genitalium* in clinical specimens. *Mol. Cell. Probes.* 2:327-335.
143. **Robertson, B.D., and T.F. Meyer.** 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trend Genet.* 8: 422-427.
144. **Robino, P, A. Alberti, M. Pittau, B. Chessa, M. Miciletta, P. Nebbia, D. Le Grand, and S. Rosati.** 2005. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol.* 109:201-9.
145. **Robinson, H. L. & Torres, C. A.** (1997) DNA vaccines. *Seminars in Immunology* 9, 271-283
146. **Rosati, S., P. Robino, M. Fadda, S. Pozzi, A. Mannelli, and M. Pittau.** 2000. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Vet Microbiol.* 71:201-10.
147. **Rosati, S., S. Pozzi, P. Robino, B. Montinaro, A. Conti, M. Fadda, and M. Pittau.** 1999. P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a *malp* product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. *Infect Immun.* 67:6213-6.
148. **Rosendal, S.** 1994, *Ovine and Caprine Mycoplasmas, Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis:* 84-92.

149. **Rosengarten, R., and K.S. Wise.** 1990. Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoprotein. *Science*. **427**: 315-318.
150. **Rothman, J.E., and J. Lenard.** 1997. *Science*. **195**: 743-753.
151. **Rottem, S., and I. Kahane (ed.).** 1993. Mycoplasma cell membranes. *Subcell. Biochemistry*. **20**: 1-314.
152. **Ruut, E., and F. Praz.** 1989. Interaction between mycoplasmas and the immune system. *Immunol. Rev.* **112**: 133-160.
153. **Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Cabasse, E., Dufour, P., Guibert, J.M., Pepin, M.,** 2000. Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains. *Vet. Res.* 31 (3), 329–337.
154. **Sanchis, R., Abadie, G., Lambert, M., Cabasse, E., Guibert, J.M., Calamel, M., Dufour, P., Vitu, C., Vignoni, M., Pepin, M.**1998. Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs. *Small Rumin. Res.* 27, 31–39.
155. **Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. & Raz, E.** (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273, 352–354
156. **Scheerlinck, J.Y.** 2001. Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* **19**: 2647–2656.
157. **Shedlock, D. J. & Weiner, D. B.** (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68, 793–806
158. **Simecka, J.W., S.E. Ross, G.H. Cassell, and J.K. Davis.** 1993. Interaction of mycoplasmas with B cells: antibody production and nonspecific effects. *Clin. Infect. Dis.* **17** (Suppl. 1): S176-S182.
159. **Sin, J., J.J. Kim, C. Pachuck, C. Satishchandran, and D.B. Weiner.** 2000a. DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4_ T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 *in vivo*. *J. Virol.* **74**, 11173–11180.
160. **Singer, C.E., and B. Ames.** 1970. *Science*. **170**: 822-826.
161. **Singer, S.J., and G.L. Nicolson.** 1972. *Science*.**175**: 720-731.
162. **Smiley, B.K., and C.F. Minion.** 1993. Enhanced readthrough of opal (UGA) stop codons and production of *Mycoplasma pneumoniae* P1 epitopes in *Escherichia coli*. *Gene*. **134**: 33-40.
163. **Stanbridge, E.J.** 1976. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**: 169-187.

164. **Stemke, G.W.** 1989. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic porcine pneumonia. *Mol. Cell. Probes.* **3**: 225-232. In Thomas A., Mainil J., Linden A. *Mycoplasma bovis: synthèse des connaissances actuelles.* 2003. *Ann. Méd. Vét.* **147**: 23-39.
165. **Stemke, G.W.** 1989. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic porcine pneumonia. *Mol. Cell. Probes.* **3**: 225-232.
166. **Stevenson, F.K.** 2004. DNA vaccines and adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**, 5–8.
167. **Stewart, S.D., H.L. Watson, and G.H. Cassel.** 1994. Investigation of the clastogenic potential of *Ureoplasma urealyticum* on human leucocytes. *IOM lett.* **3**: 662-663.
168. **Stuart, P.M., R.M. Egan, and J.C. Woodward.** 1993. Characterization of MHC induction by *Mycoplasma fermentans* (incognitos strain). *Cell. Immunol.* **152**: 261-270.
169. **Subak-Sharp, J.H., R.A. Elton, and G.J. Russell.** 1974. Symp. Soc. Gen. Microbiol. **24**: 131-150.
170. **Sullivan ND, St.George TD, Horsfall N:** 1973 A proliferative interstitial pneumonia of sheep associated with mycoplasma infection:1 Natural history of the disease in a flock. *Aus Vet J* **49**:57-62
171. **Sumida, S.M., P.F. MCKay, D.M. Truitt, M.G. Kishko, J.C. Artur, M.S. Seaman, S.S. Jackson, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, N.L. Letvin, and D.H. Barouch.** 2004. Recruitment and expansion of dendritic cells *in vivo* potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *J. Clin. Invest.* **114**, 1334–1342.
172. **Szeredi, L., Tenk, M., Dan, A.,** 2003. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **50** (4), 172–177
173. **Tarshis, M., M. Salman, and S. Rottem.** 1993. Cholesterol is required for the fusion of single unilamellar vesicles with *Mycoplasma capricolum*. *Biophys. J.* **64**: 709-715.
174. **Ter Laak, E.A., and J.H. Noordergraaf.** 1987. An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*. *Vet. Microbiol.* **14**: 25-31.
175. **Theiss, P., and K.S. Wise.** 1997. Localized frameshift mutation generates selective, high frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. *J. Bacteriology.* **179**: 4013-4022.
176. **Thorns, C.J.** 1978. Characterization of the antibodies detected by the film inhibition test for *Mycoplasma bovis*. *Res. Vet. Sci.* **25**: 386-388.

177. **Thuringer, D., and I. Caverio.** 1997. Potassium channels inhibition by cellular ATP: a physiological happening with a molecular suspense. *Medicine Sciences*. **13**: 1049-1052.
178. **Timoney, J.F., J.H. Gillespie, F.W. Scott, and J.E. Barlogh.** 1992. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th edition, Cornell University Press. Terza edizione italiana coordinate da G. Redaelli: Hagan and Bruner's Microbiologia e Malattie Infettive degli Animali Domestici. Editoriale Grasso.
179. **Tola, S., D. Manunta, S. Rocca, A.M. Rocchiagiani, G. Idini, P.P. Angioi, and G. Leori.** 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine* **10**:2764-2768.
180. **Torres, C. A., Iwasaki, A., Barber, B. H. & Robinson, H. L.** (1997) Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *Journal of Immunology* **158**, 4529– 4532
181. **Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146
182. **Trotter SL, Franklin RM, Baas EJ, Barile MF:** 1977, Epidemic caprine keratoconjunctivitis: Experimentally induced disease with a pure culture of *Mycoplasma conjunctivae*. *Infect and Immun* **18**:816-822
183. **Tsai, S., D.J. Wear, J.W. K. Shih, and S.C. Lo.** 1995. Mycoplasma and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 10197-10201.
184. **Tully, J.G., and S. Razin (ed.).** 1996. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, vol. II Diagnostic procedures. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
185. **Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromcowski, S. H., Randall Deck, R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L. & Liu, M.A.** (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**, 1745–1749
186. **Van Oirschot, J.T.** 2001. Present and future of veterinary viral vaccinology: a review. *Vet Q.* **23**:100-8.
187. **Van Rooij, E. M.A., Haagmans, B. L., De Visser, Y. E., De Bruin, M.G. M., Boersma, W. & Bianchi, A. T. J.** (1998) Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Veterinary Immunology And Immunopathology* **66**, 113–126

188. **Villalba, E.J., Poveda, J.B., Fernandez, A., Rodriguez, J.L., Gutierrez, C., Gomez-Villamandos, J.,** 1992. An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Islands. *Vet. Rec.* 130 (15), 330–331.
189. **Whitcomb, R.F., and J.G. Tully (ed.).** 1989. The mycoplasmas, vol. V. Spiroplasmas, acholeplasmas, and mycoplasmas of plants and arthropods. Academic Press, Inc., San Diego, Cal.
190. **Wolff, J.A., J.J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams, and A. Jani.** 1992. Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in muscle. *HuM.Mol. Genet.* 1:363–369.
191. **Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P.L. Felgner.** (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247, 1465–1468.
192. **Xiao, S., H. Chen, L. Fang, C. Liu, H. Zhang, Y. Jiang, and W. Hong.** 2004. Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine* 22: 345–351.
193. **Yamano, T., Y. Kaneda, S. Huang, S.H. Hiramatsu, and D.S. Hoon.** 2006. Enhancement of immunity by a DNA melanoma vaccine against TRP2 with CCL21 as an adjuvant. *Mol. Ther.* 13: 194–202
194. **Yogev, D., R. Rosengarten, R. Watson-McKown, and K.S. Wise.** 1991. Molecular basis of mycoplasma surface variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding regions and 5' regulatory sequences. *EMBO Journal.* 10: 4069-4079.
195. **Yogev, D., R. Watson-McKown, and K.S. Wise.** 1991. Sequence and *TnphoA* analysis of a *Mycoplasma hyorhin* protein with a membrane transport function. *J. Bacteriol.* 173: 2035-2044.
196. **Yoshimura, A., H. Nishinakamura, Y. Masumura, and T. Hanada.** 2005. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res. Ther.* 7: 100-110.