

SINTESI - PRC IZS LER 16/2016

“Dinamica di replicazione del virus dell’Afta epizootica durante co-infezione in vitro con diversi ceppi/sierotipi e recupero di virus aftoso infettivo da RNA”

Responsabile scientifico **Dr.ssa Giulia Pezzoni**

mail:giulia.pezzoni@izsler.it

L’ Afta epizootica (Foot-and-mouth disease – FMD) è una delle malattie virali maggiormente infettive, con un possibile devastante impatto sociale, economico e ambientale. L’agente eziologico di FMD appartiene al genere *Aphthovirus*, famiglia delle Picornaviridae, ed include sette sierotipi (O, A, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3 e C) con multiple varianti antigeniche e genetiche quest’ultime denominate topotipi (Brooksby, 1958; Grubman & Baxt, 2004).

Tra i metodi diagnostici per FMDV, l’isolamento virale su colture cellulari è molto importante, infatti l’amplificazione del virus presente nel campione biologico originale ne facilita la sua caratterizzazione da un punto di vista antigenico e genetico. L’isolamento del virus permette di condurre sia il “vaccine-matching” per valutare il miglior vaccino da utilizzare nel controllo di un focolaio di infezione, sia il sequenziamento genico che fornisce informazioni epidemiologiche circa l’evoluzione del virus e la sua provenienza (Xu & Yang, 2021). Tuttavia, in molti casi, l’isolamento non è possibile, spesso infatti i campioni ricevuti presso i Centri di Referenza da regioni endemiche per FMD includono un mix di differenti sierotipi e/o ceppi difficili da isolare oppure contengono del virus non vivo e quindi incapace di replicarsi su coltura cellulari. La prima parte del progetto ha previsto la valutazione della dinamica di replicazione del virus dell’Afta epizootica durante co-infezione in vitro con diversi ceppi/sierotipi. Due esperimenti indipendenti di co-infezione sono stati effettuati con due sierotipi di FMD in concentrazione a diluizione seriale reciproca, infettando le tre linee cellulari suscettibili al virus FMD: BHK-21, IBRS-2 e LFBK $\alpha\beta$ 6. Nel primo esperimento i virus (topotipi) utilizzati per l’infezione erano O/ME-SA/Ind-2001d e A/ASIA/Iran-05, mentre nel secondo esperimento sono stati utilizzati i topotipi O/EA-3 e A/AFRICA/G-IV. Per entrambi gli esperimenti sono state testate 5 concentrazioni virali differenti di entrambi i sierotipi, mischiate in 5 combinazioni da 10^1 TCID₅₀/ml a 10^5 TCID₅₀/ml. L’analisi degli esperimenti è stata condotta attraverso un saggio ELISA sandwich, che utilizza anticorpi monoclonali sierotipo dipendenti ed una Real-time RT-PCR quantitativa topotipo specifica.

In entrambi gli esperimenti condotti i due virus in co-infezione sono stati capaci di crescere sulle linee cellulari IBRS-2 e LFBK $\alpha\beta$ 6 quando la dose virale iniziale di entrambi i ceppi in co-infezione era la stessa (10^3 TCID₅₀/ml); tale crescita è stata tuttavia inferiore a quella riscontrata in infezione singola alla medesima dose infettante. In entrambe le linee cellulari diventava evidente l’inibizione della crescita virale quando durante la co-infezione la concentrazione di uno dei due ceppi era 100 volte maggiore rispetto a quella dell’altro (inibito). Sulla linea BHK-21 il sierotipo A ha mostrato una migliore fitness di crescita rispetto al ceppo O; infatti il sierotipo A cresceva molto di più del sierotipo O anche quando la dose di co-infezione dei due ceppi era sbilanciata di cento volte a favore del tipo O. I dati ottenuti confermano parzialmente quanto notato con campioni di campo in cui erano presenti co-infezioni con sierotipi O e A.

La seconda parte del progetto ha riguardato la messa a punto di un protocollo per recupero del virus aftoso infettivo partendo dall’RNA virale attraverso transfezioni dello stesso, questo permetterebbe di ovviare al problema della stabilità del virus, con impossibilità di isolamento, se non è mantenuto in condizioni ideali durante il trasporto dai paesi endemici ai centri di referenza, inoltre incoraggerebbe la spedizione di campioni sospetti per il virus dell’afta epizootica da paesi che non dispongono di strutture, il denaro e la logistica per soddisfare i regolamenti UN2900. Inoltre, recentemente, le commissioni tecniche di esperti nell’ambito di virus aftosi stanno proponendo la spedizione di campioni sospetti in tampone di lisi, contenenti agenti denaturanti che distruggono

infettività del virus, preservando però l'RNA. Il protocollo è stato valutato in varie condizioni sperimentali tra cui la quantità di RNA, miscela e quantità di liposomi, tempi di incubazione e linea cellulare. La minima quantità di virus dal quale l'RNA transfettato ha fatto recuperare del virus vivo nelle linee cellulari BHK21 e LFBK $\alpha\beta$ 6 è stata di 10^3 TCID₅₀/ml.

Alla stesura della presente relazione sono in corso ulteriori esperimenti per entrambi gli obiettivi del progetto, per il primo l'RNA ottenuto dagli esperimenti di co-infezione verrà sequenziato con piattaforme di nuova generazione per valutare la dinamica a livello genomico e per il secondo obiettivo verranno utilizzati nuovi metodi di estrazione per arricchire la presenza di RNA messaggero e migliorare la sensibilità della transfezione.