Determinanti patogenetici del virus della Bluetongue

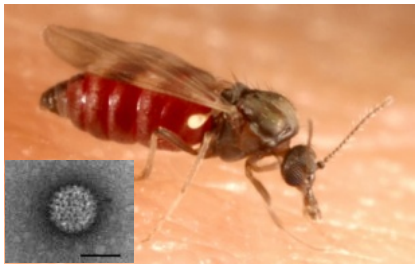
Marco Caporale

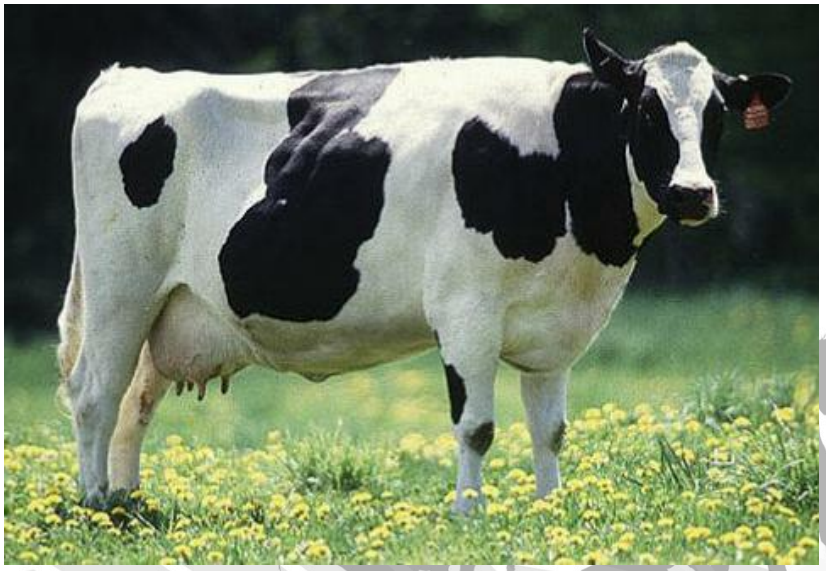
Convegno sulla ricerca Maggio -2013

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

La Bluetongue (BT)

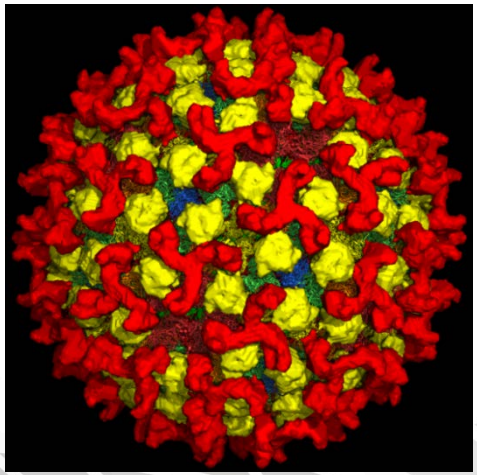
- E’ una delle piu’ importanti malattie infettive dei ruminanti
- E’ trasmessa da insetti ematofagi
- E’ causata dal Virus della Bluetongue (BTV)





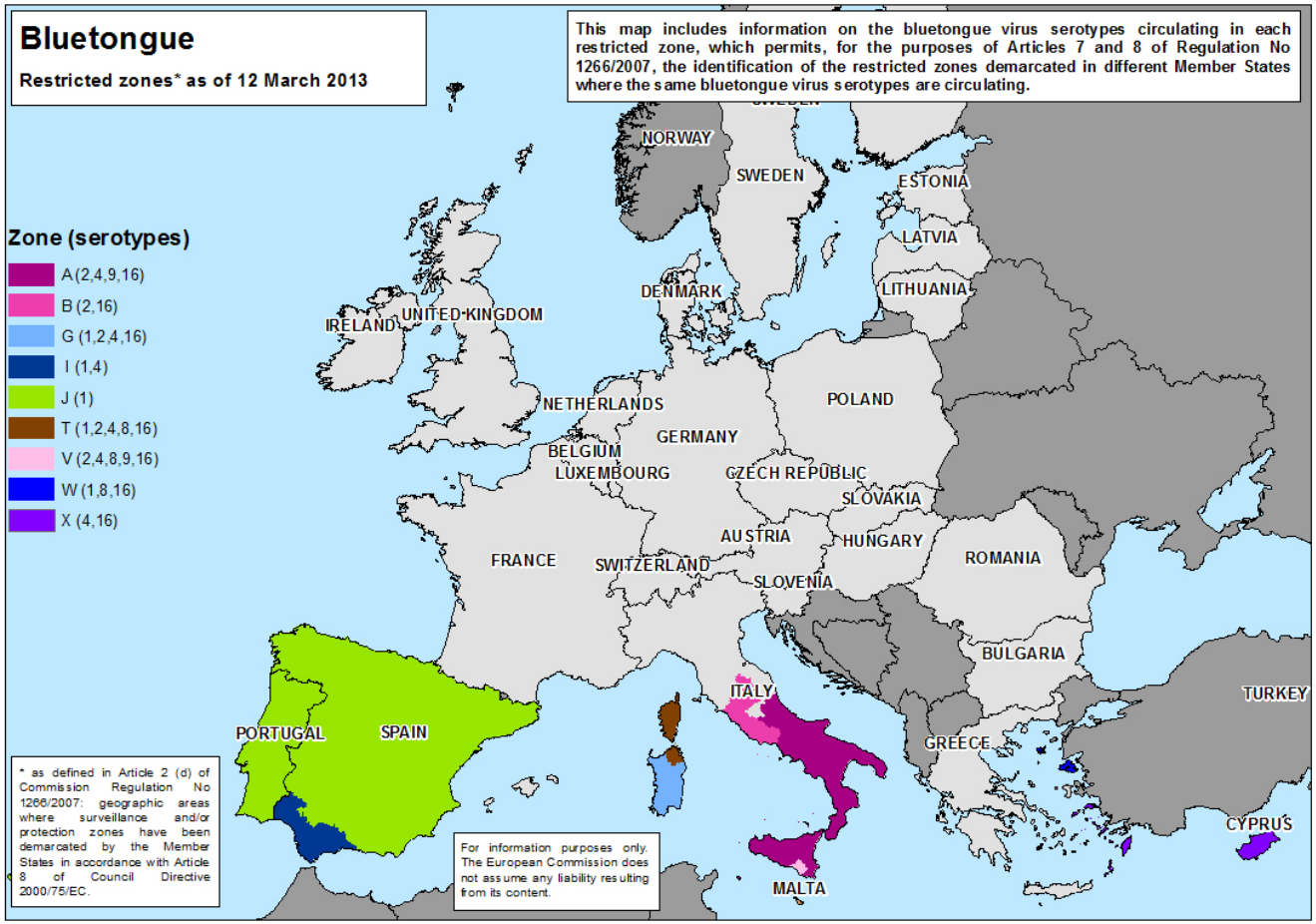
Bluetongue virus (BTV)

- BTV e' un virus a dsRNA con 10 segmenti genomici che codificano per 7 proteine strutturali e 4 proteine non strutturali
- Il capside esterno (formato dalla VP2 and VP5) definisce 26 sierotipi (no envelope)
- L'immunita' crociata tra i deversi sierotipi e' limitata o assente

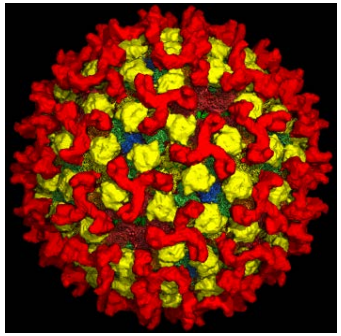


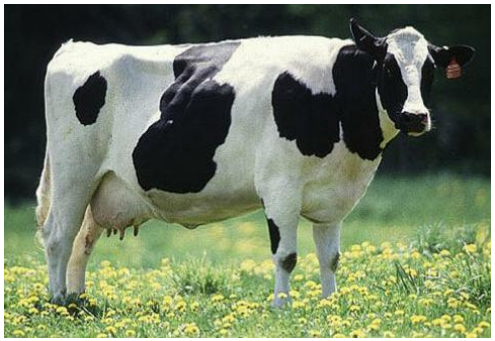
Situazione Epidemiologica della BT

Dal 1998 nove sierotipi di BTV hanno invaso l'Europa con nuove introduzioni che si susseguono annualmente (1,2,4,8,9 e 16 in IT)



La sintomatologia clinica della BT



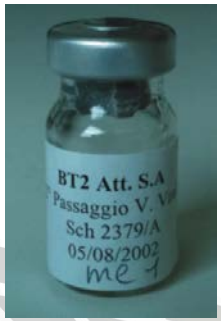


…varia a seconda della specie, razza e stato immunitario dell’ospite infettato

ed in funzione del sierotipo / ceppo virale di BTV coinvolto

Vaccino vivo attenuato per BT

- Dal 1950 i vaccini attenuati attraverso passaggi seriali in uova embrionate e *in vitro* (cellule BHK21) sono stati utilizzati per la profilassi di BT
- Dal 1960s ad oggi nel continente Africano si utilizzano vaccini attenuati polivalenti (con 5 sierotipi in una singola dose)
- Usati anche in Italia, e per la prima volta vaccinati anche i bovini (serbatoio)
- Preoccupazione per effetti secondari e trasmissione attraverso vettori: vaccini inattivati



Obiettivo dello studio

Il nostro obiettivo a lungo termine e' di capire quali sono i fattori patogenetici che determinano la variabilita' della sintomatologia clinica durante l'infezione di BTV

- Analisi dei fattori che condizionano la suscettibilita' all'infezione da parte dell'ospite
- Analisi dei determinanti di patogenicita' del virus

Domanda

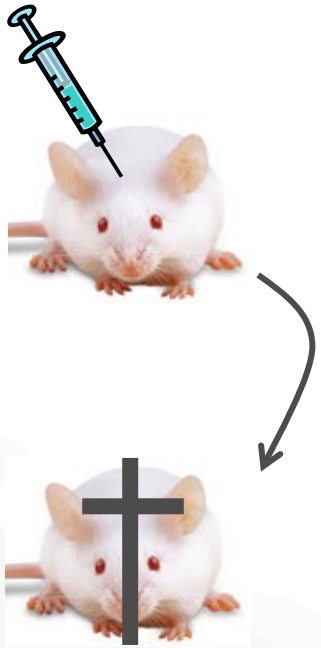
Quali sono i determinanti molecolari

della patogenesi della Bluetongue?

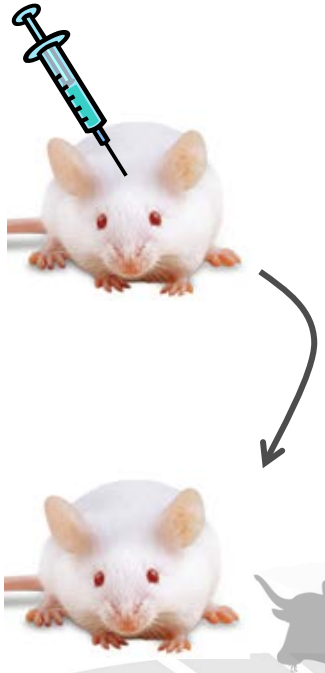
Strumenti sperimentali

I ceppi di BTV passati ripetutamente in BHK perdono la capacita' di causare malattia nella pecora e nel topo.

BTV-2, -4, -9 "selvaggio"
(low passage in BHK)

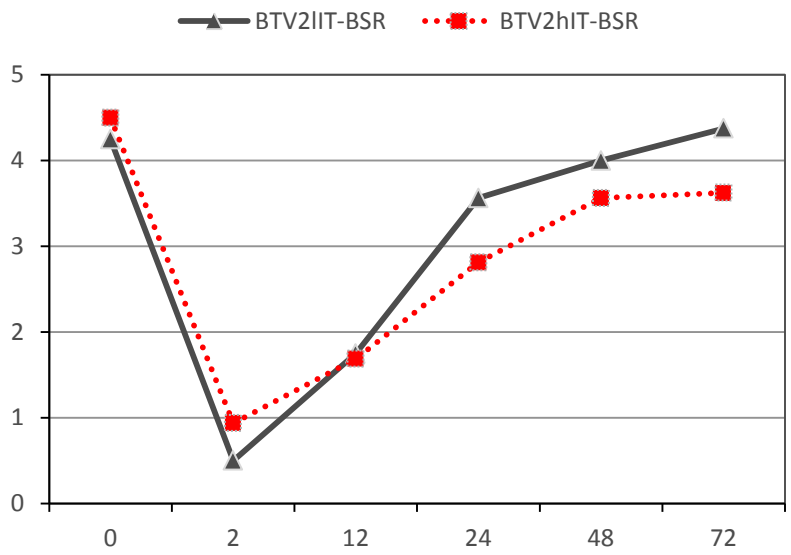


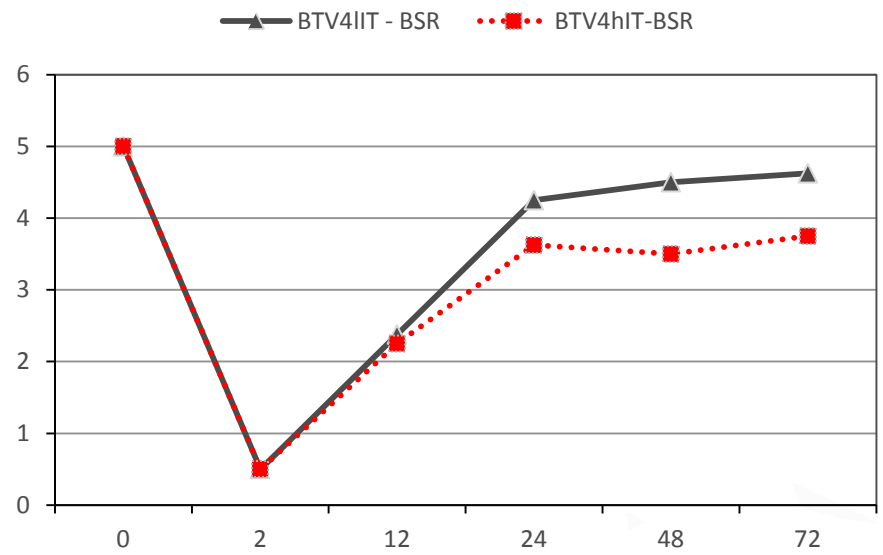
BTV-2, -4, -9 "attenuato"
(high passage in BHK)

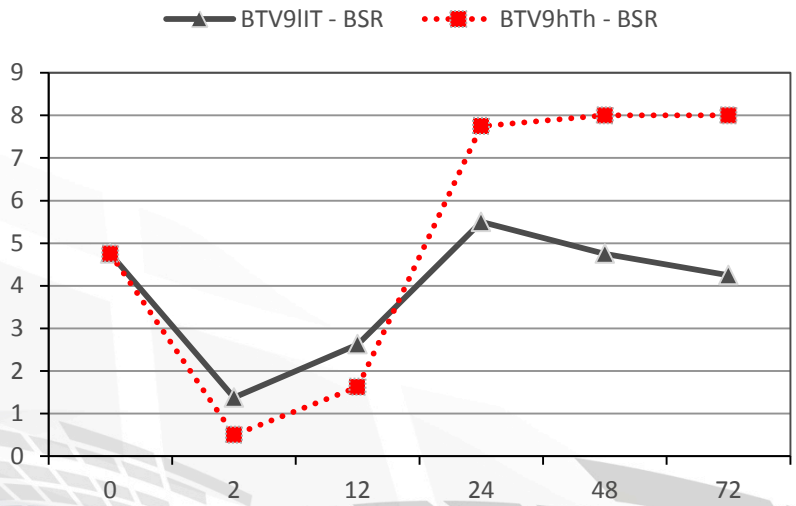


Franchi *et all.* J Virol Methods. 2008 153(2):263-5.

Curve di crescita dei ceppi wild type (low) e attenuato (high) sono simili

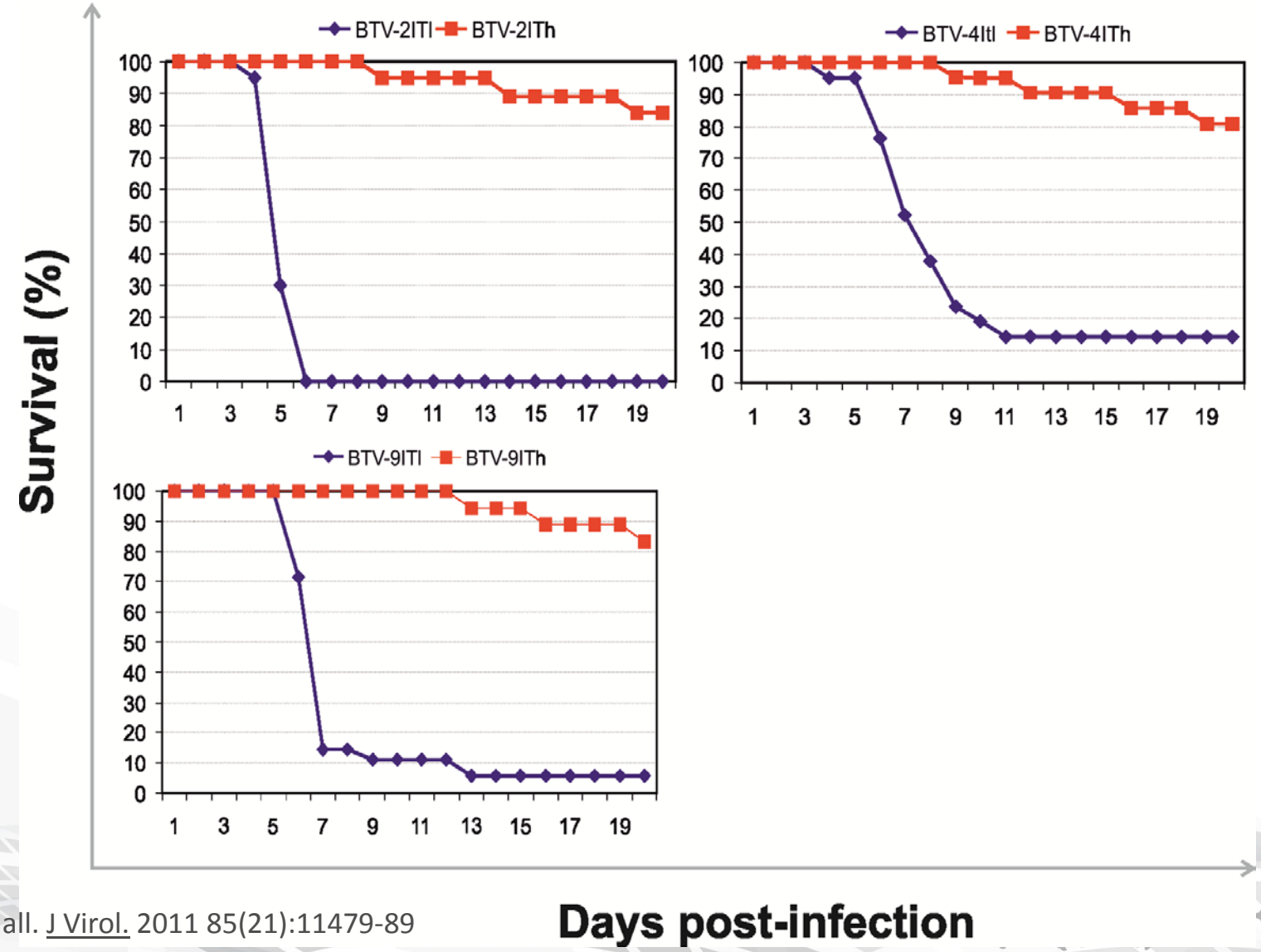






Caporale *et all*. J Virol. 2011 85(21):11479-89

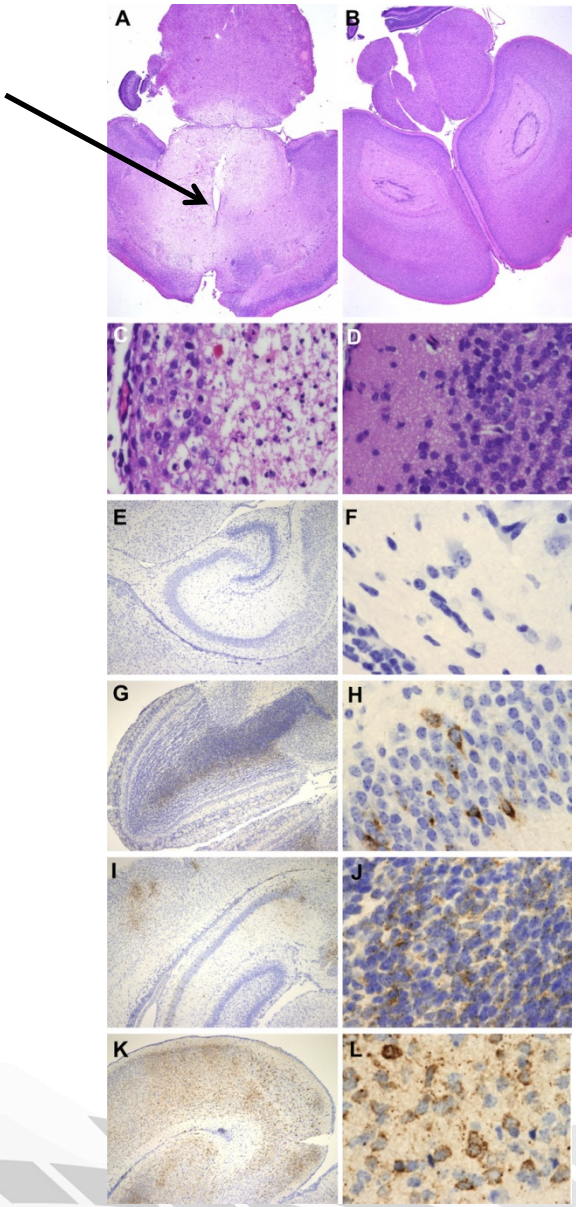
Mortalita' di topi neonati inoculati i.c. con i ceppi BTV "low" e "high"



Caporale et all. J Virol. 2011 85(21):11479-89

BTV-2IT “low” causa encefalite necrotizzante

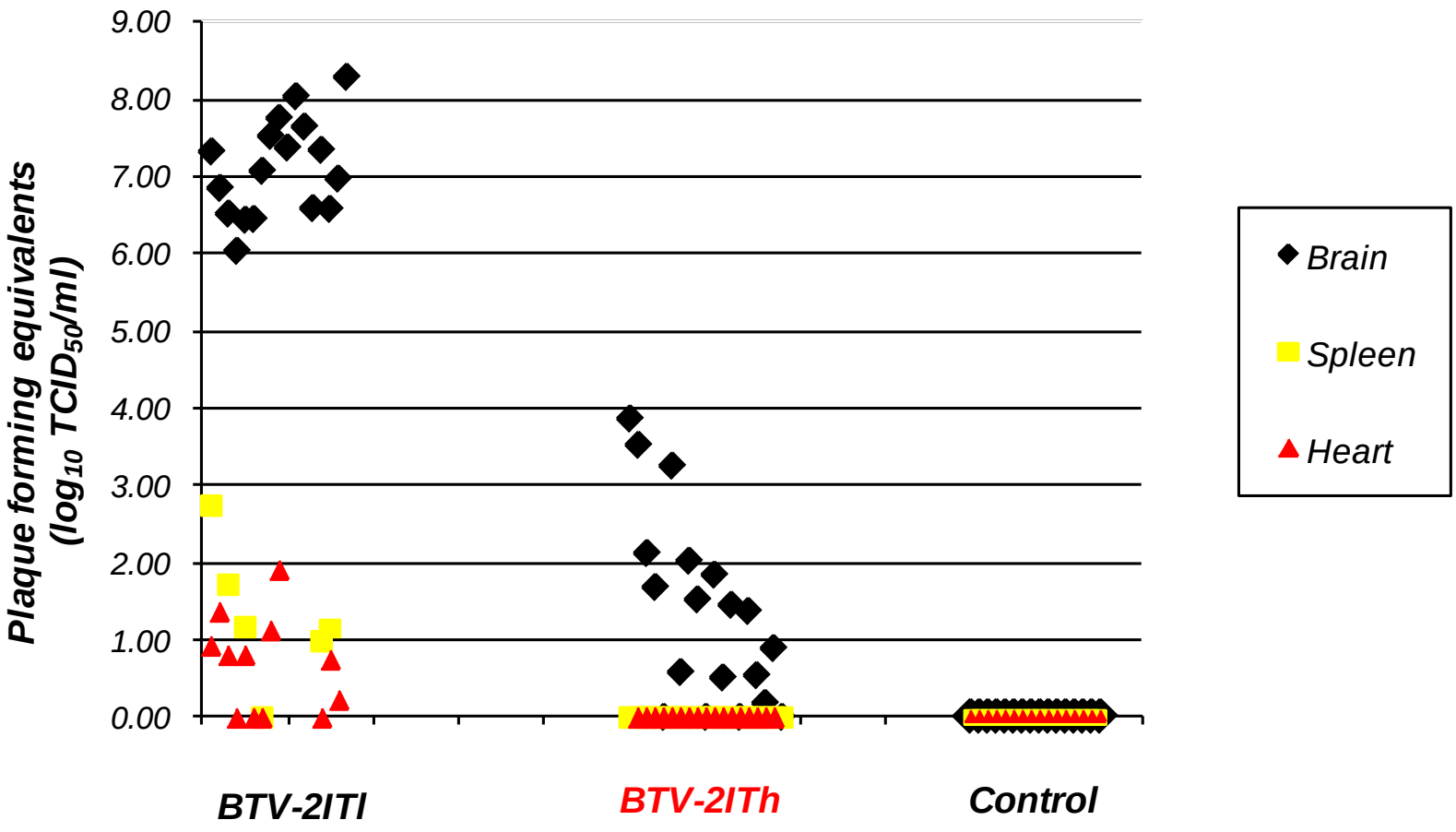
BTV-2IT low



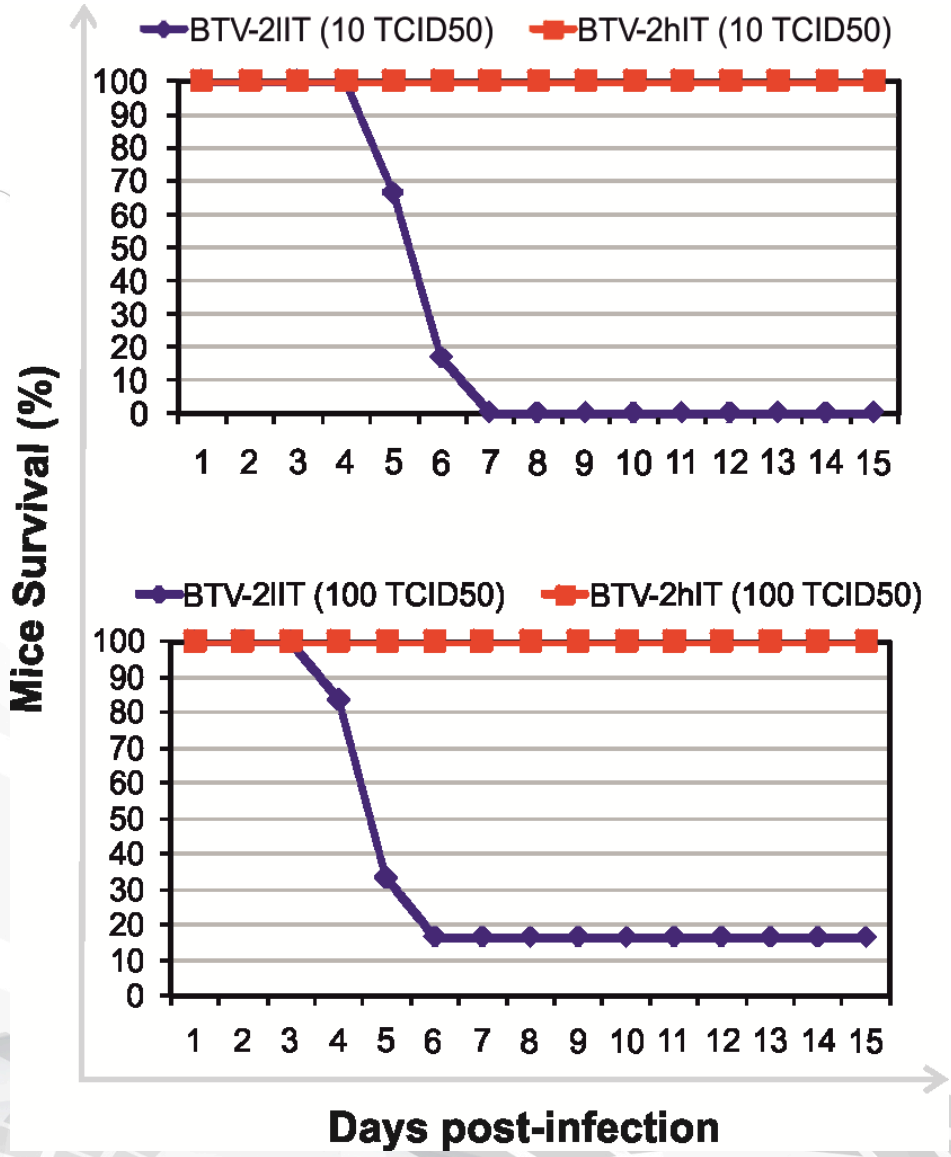
BTV-2IT High

Caporale et all. J Virol. 2011 85(21):11479-89

Distribuzione dei virus "*low*" e "high" nei vari organi dei topi infettati



BTV "high" e' attenuato nei topi IFNR$^{(-/-)}$ KO per l'interferone



...la mancanza di interferone non sembra essere un elemento discriminante tra il ceppo high e il ceppo low

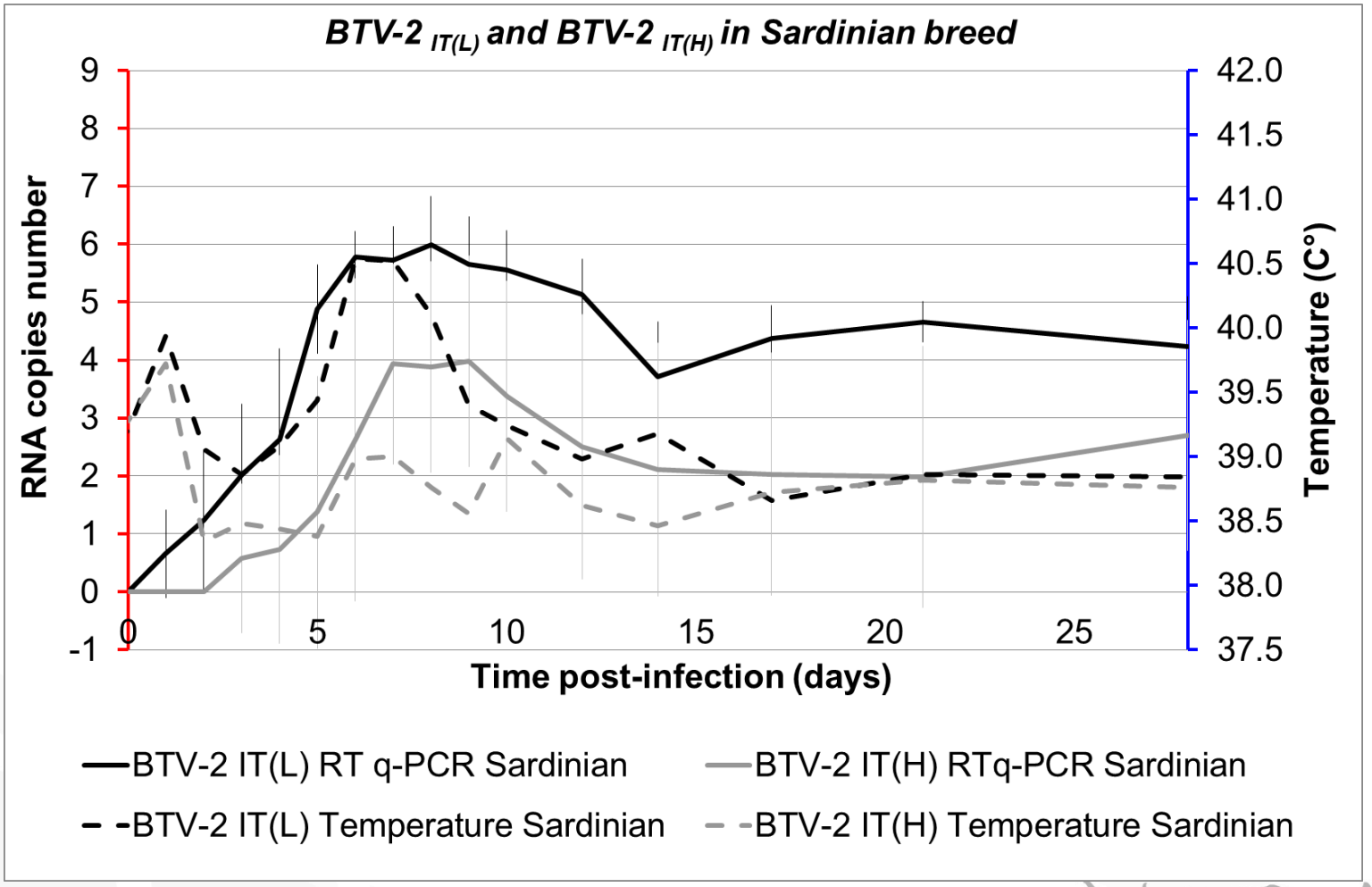
Caporale et all. J Virol. 2011 85(21):11479-89

BTV high induce la produzione di anticorpi neutralizzanti nei topi IFNR(-/-) KO

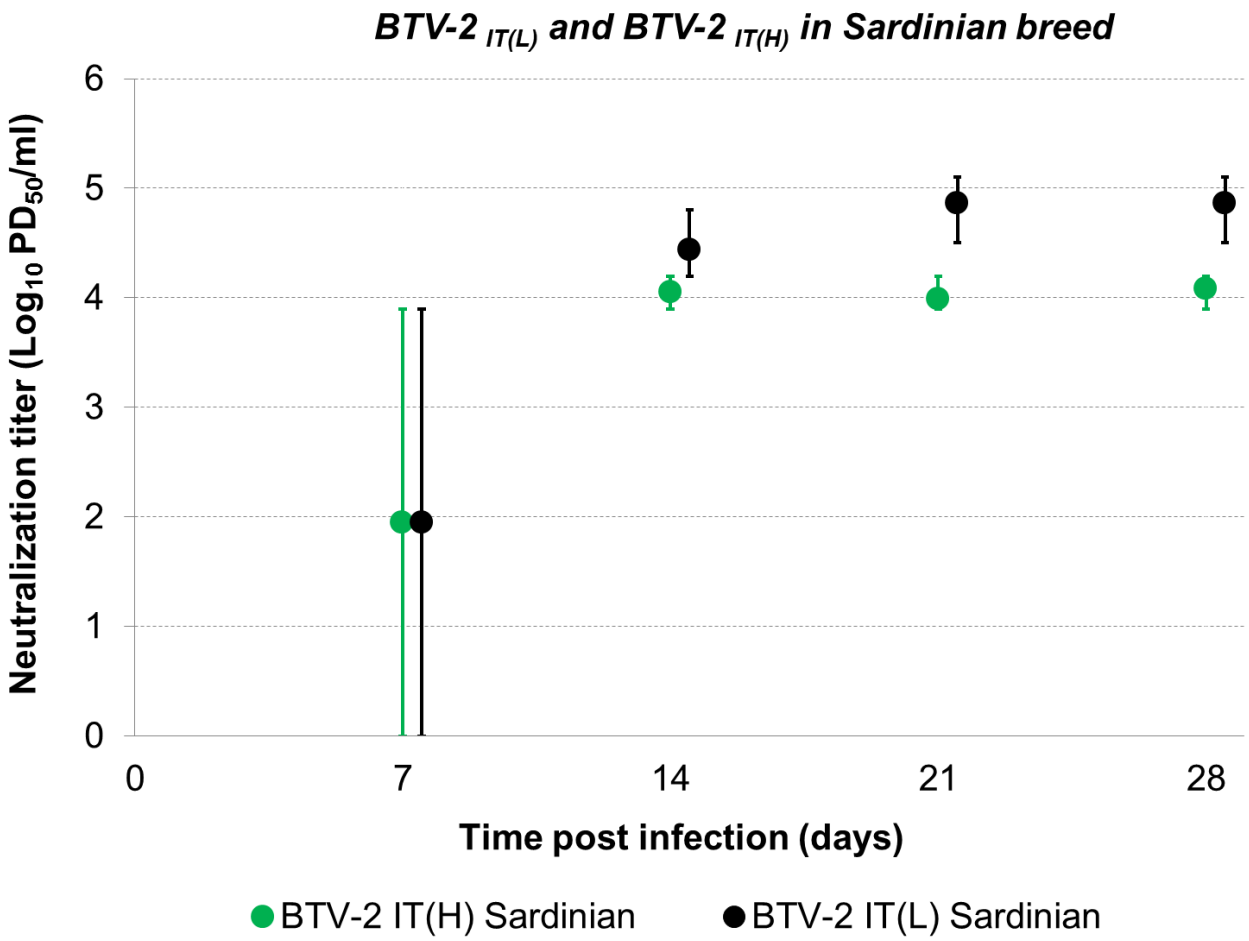
Mice Group	Virus Inoculation Dose	Survival / Mice	Antibody titres wk1	Antibody titres wk2	Virus challenge i.p.	Survival-Protected / Mice
A=6	10 TCID BTV-2ITI	0/6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B=6	100 TCID BTV-2ITI	1/6	0/1	0/1	100 TCID BTV-2ITI	0/1
C=6	10 TCID BTV-2ITh	6/6	min 0 ave 1/380 max 1/1280	min 0 ave 1/380 max 1/640	100 TCID BTV-2ITI	5/6
D=6	100 TCID BTV-2ITh	6/6	min 1/160 ave 1/320 max 1/640	min 1/160 ave 1/280 max 1/640	100 TCID BTV-2ITI	6/6
E=6	Negative	6/6	0/6	0/6	100 TCID BTV-2ITI	0/6

Caporale et all. J Virol. 2011 85(21):11479-89

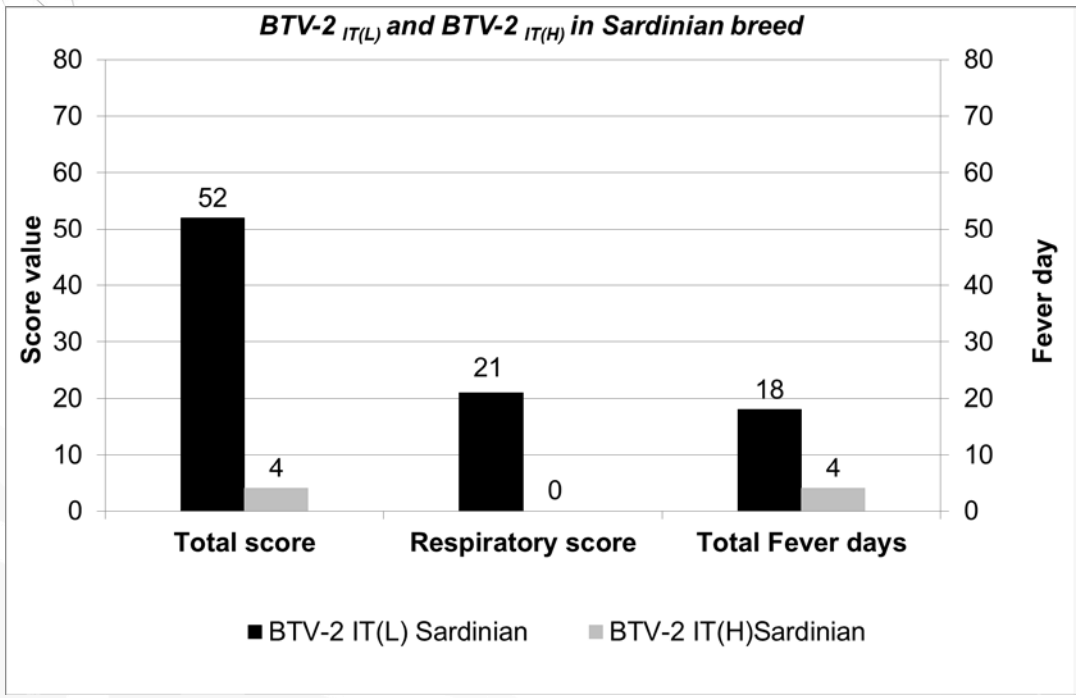
BTV-2ITh e' attenuato nella pecora

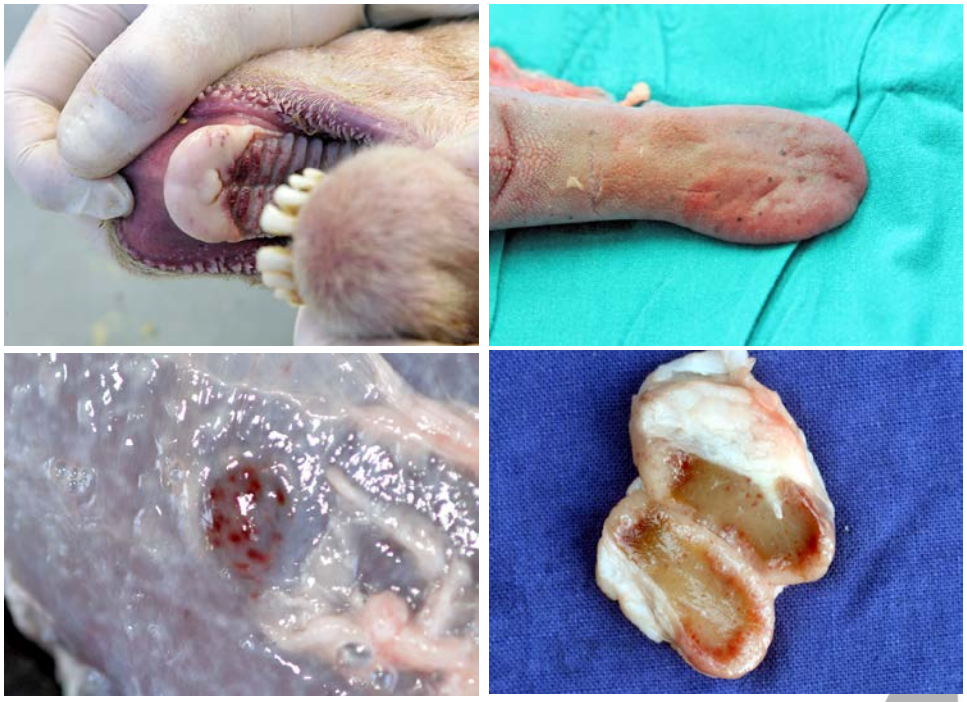


Risposta anticorpale



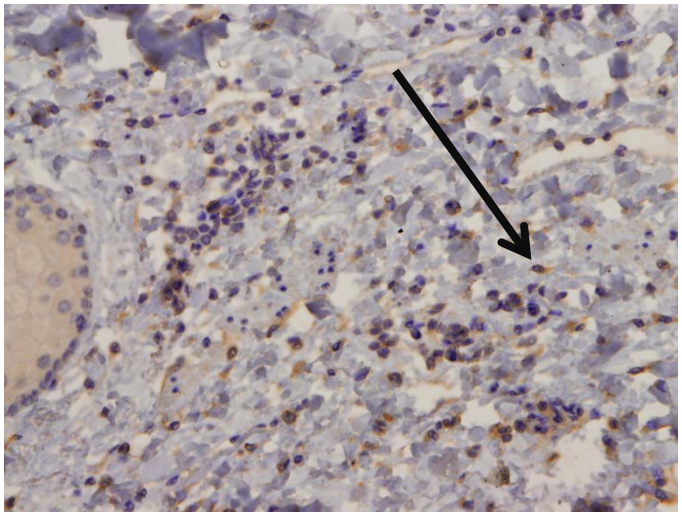
Score clinico e lesioni

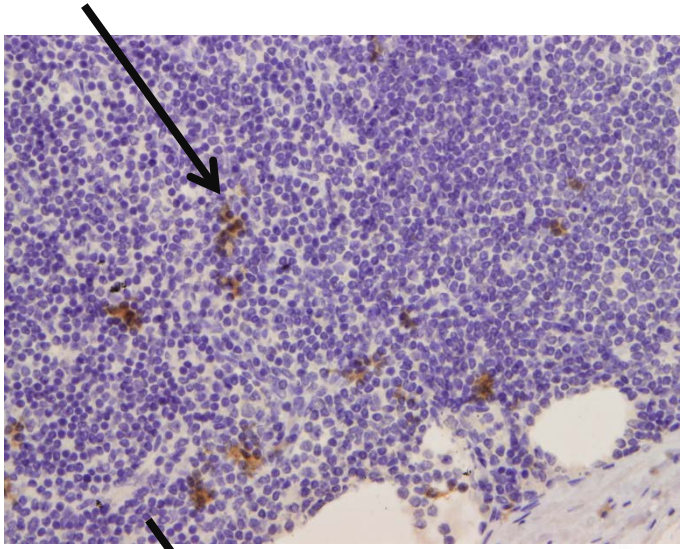




Cellule infettate da BTV nella pecora

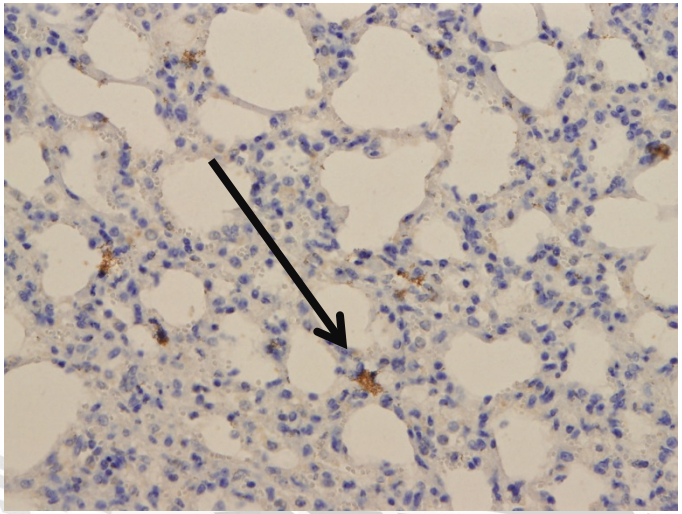
Cute

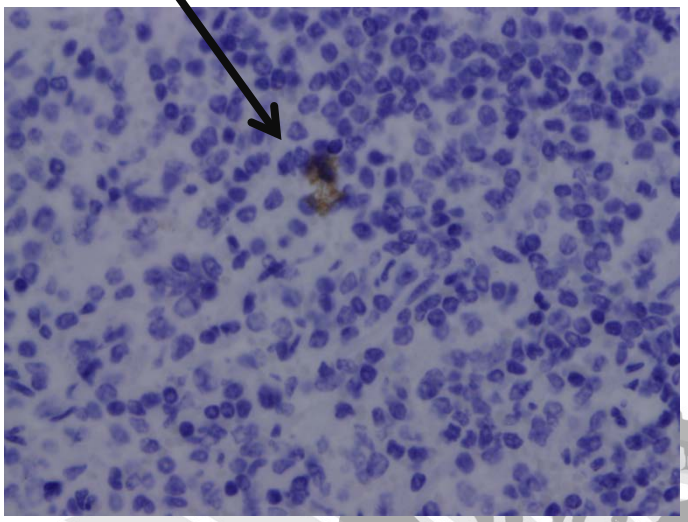




Linfonodo

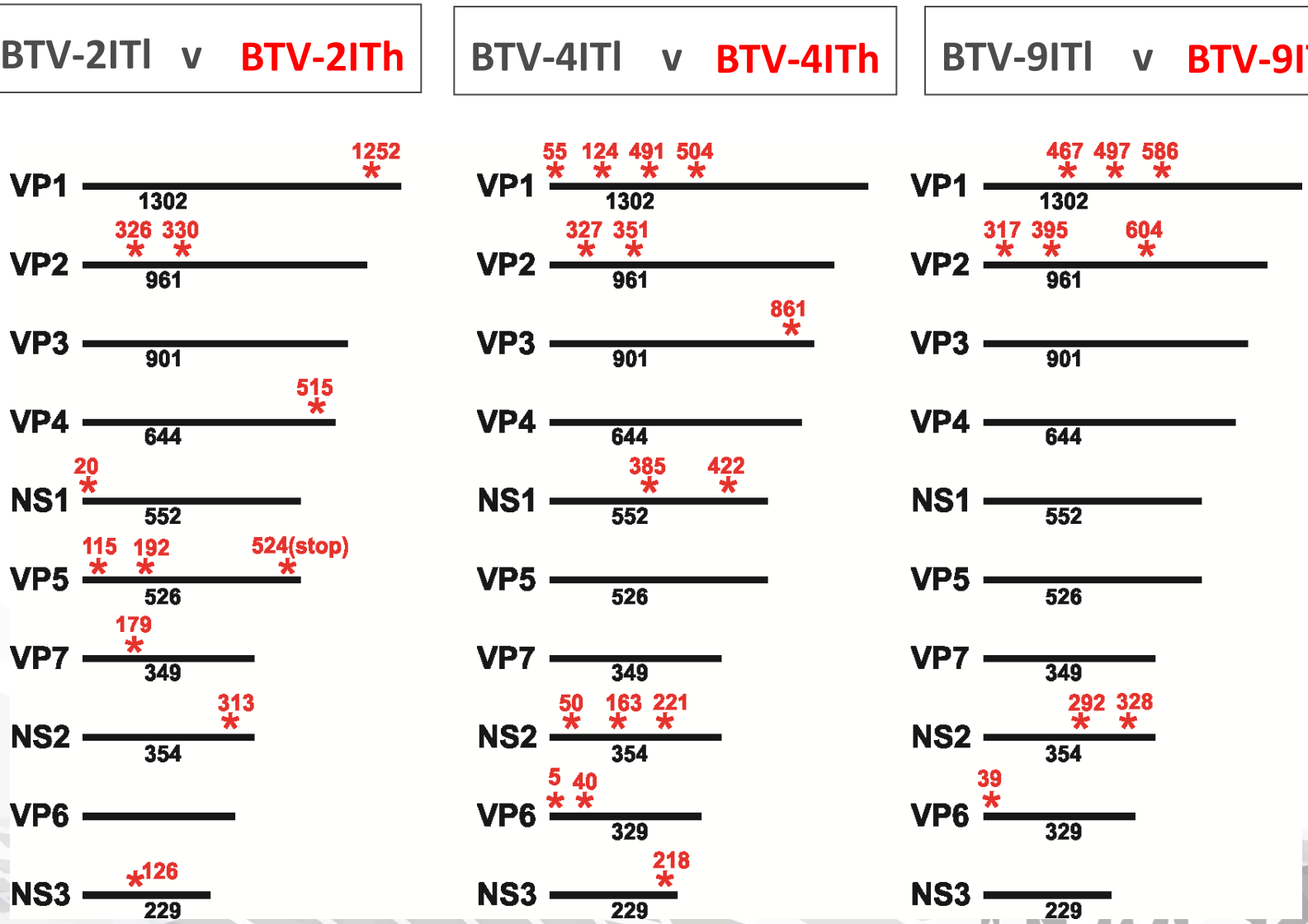
Polmone





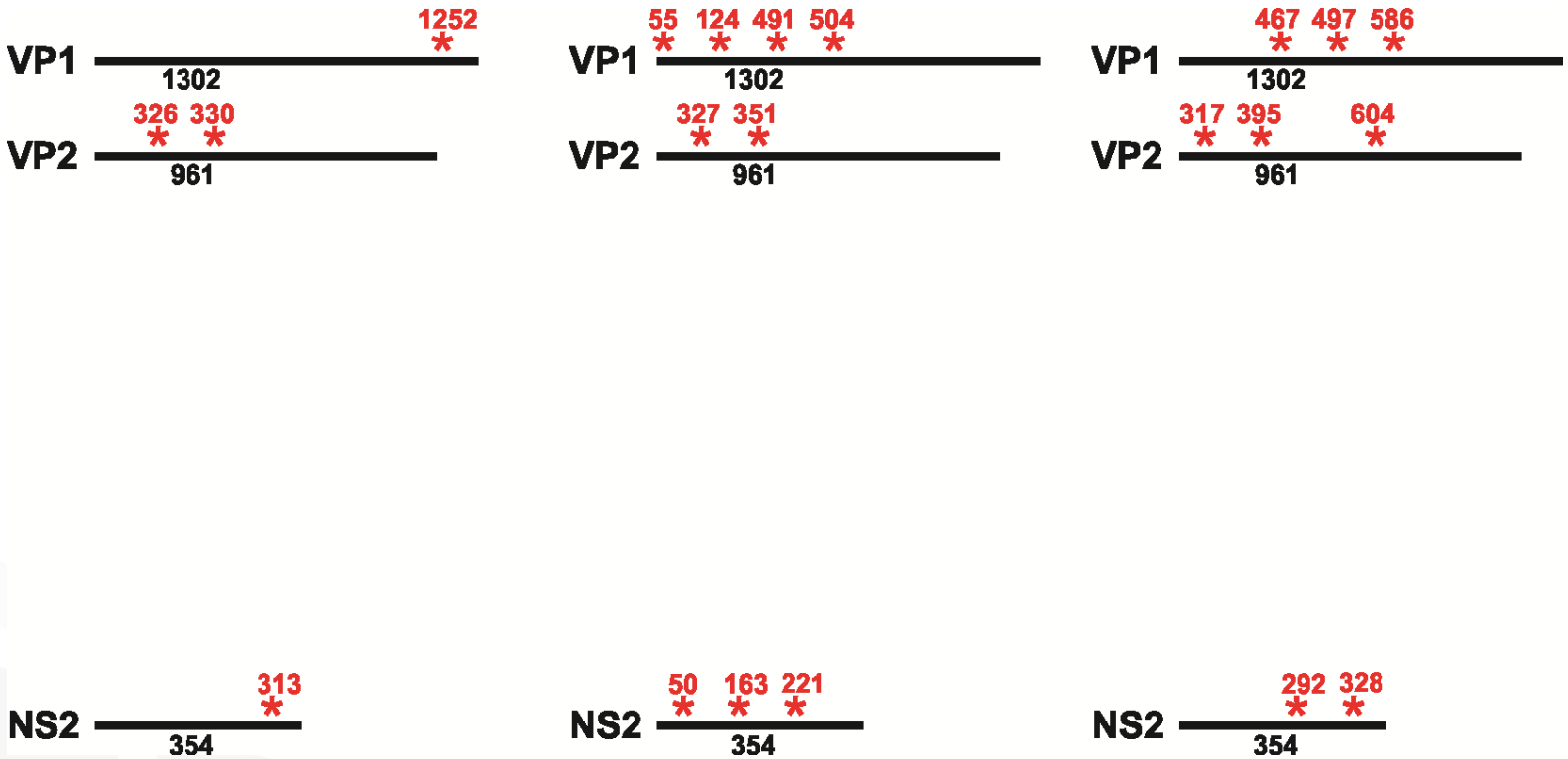
Milza

Differenze aminoacidiche tra i virus “low” e “high”

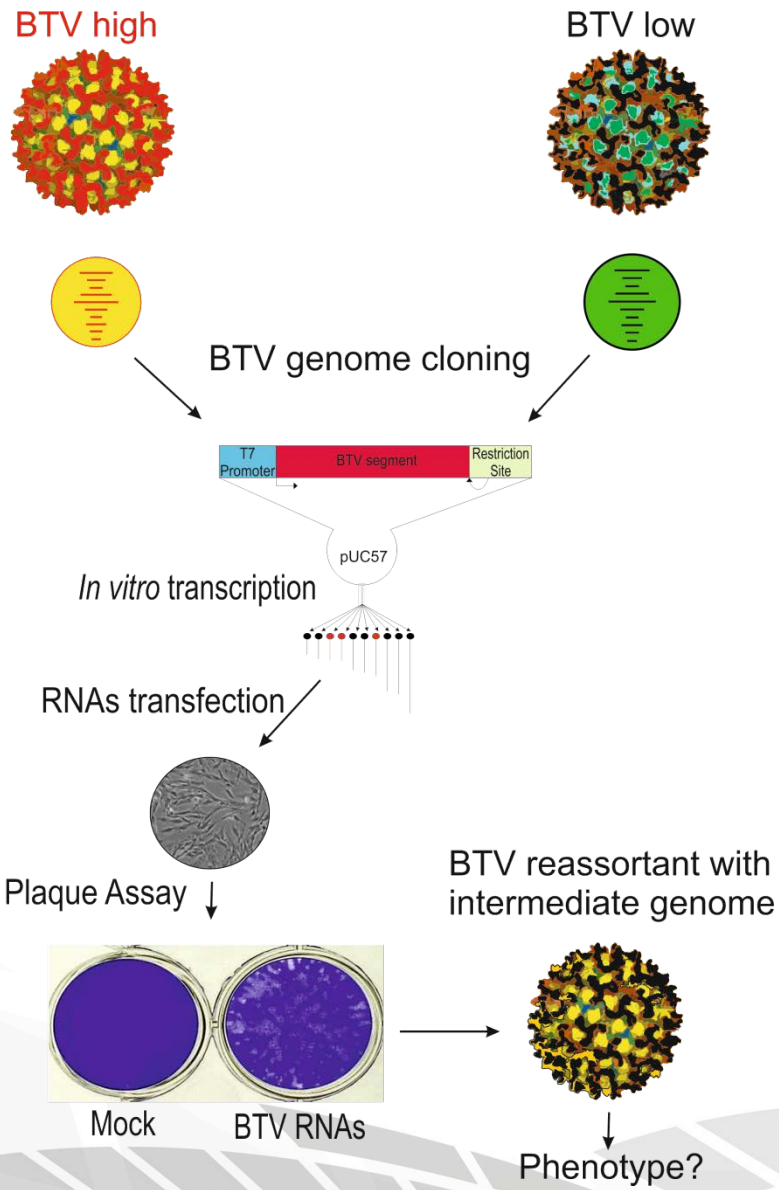


Differenze aminoacidiche tra i virus “low” e “high”

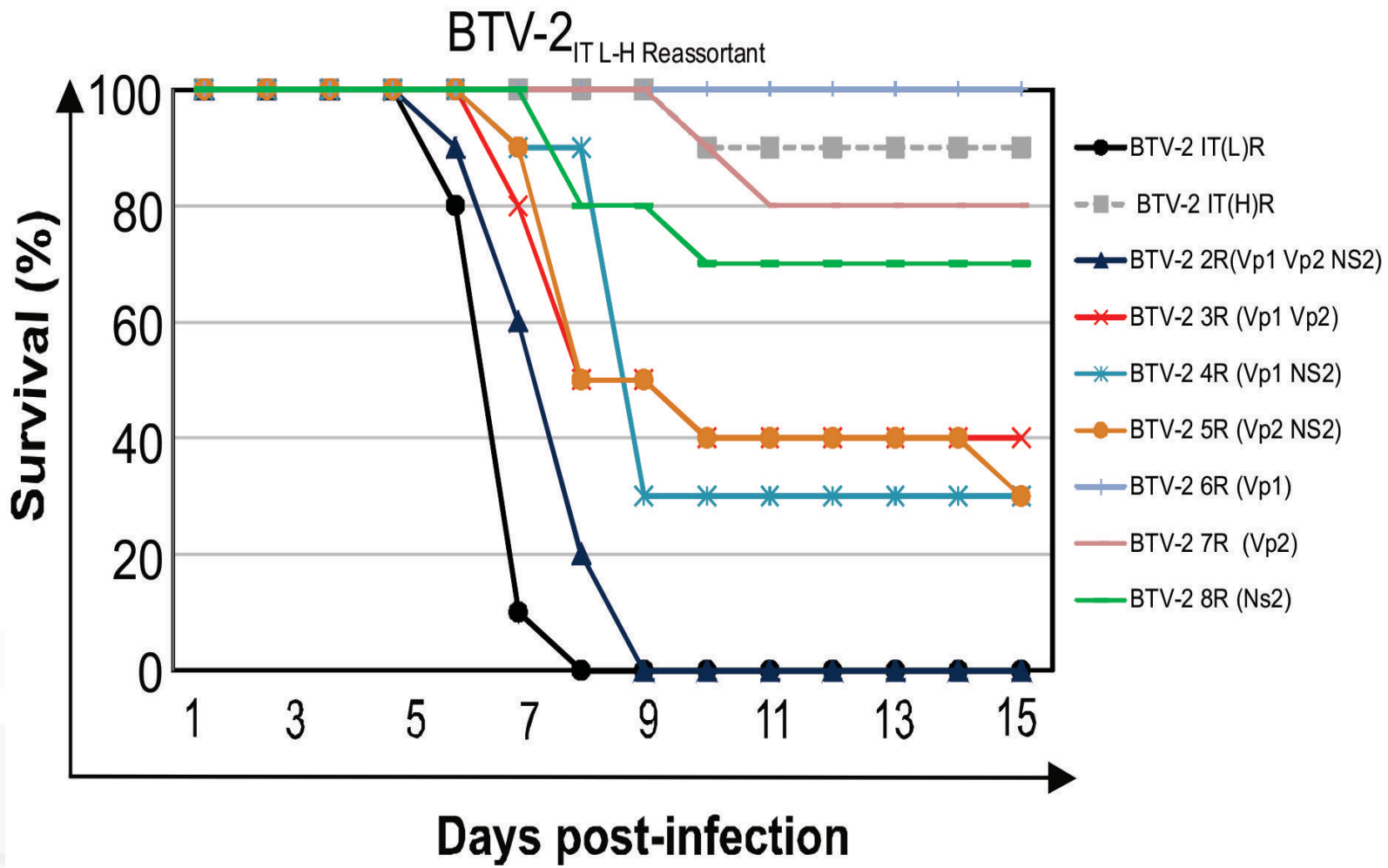
BTV-2ITl v BTV-2ITh	BTV-4ITl v BTV-4ITh	BTV-9ITl v BTV-9ITh



Reverse genetics di BTV



Nei topi IFNR(-/-) KO i determinanti patogenetici di BTV-2ITl sono multi fattoriali



Conclusioni

- Abbiamo ottenuto la sequenza genomica completa di 3 sierotipi di BTV (in realta' 12 sia ceppi "low" sia ceppi "high")

- Il ceppo di BTV "high" (attenuato) non causa mortalita' in topi INFAR KO e nei topi neonati inoculati i.c.

- La differenza tra BTV "low" e "high" nei topi non sembra essere correlata con il sistema immunitario innato (interferone) dell'ospite

- Il modello murino e' un ottimo strumento sperimentale per studiare la patogenesi della BT

Conclusioni

I determinanti della patogenicita' di BTV sono multi genetici e per BTV-2IT sono localizzati sulla:

VP1 (polymerase)

VP2 (outer core proteins)

NS2 (Viral inclusion body)

In progress:

- Costruzione reassortants usando come base il virus virulento (low), ed analisi del loro fenotipo
- Analisi dei fattori che condizionano la suscettibilita' all'infezione da parte dell'ospite

Ringraziamenti

IZS - Teramo
Luigina Di Gialleonardo, Gisella Armillotta, Paola Franchi, Attilio Pini, Gabriella Di Francesco, Giovanni Savini, Rossella Lelli, Mauro Di Ventura

MRC - University of Glasgow Centre for Virus Research
Massimo Palmarini
Wellcome Trust - Sanger Institute
Paul Kellam
The Pirbirght Institute
Peter Mertens
Central Veterinary Institute of Wageningen
Piet A. van Rijn