

ABSTRACT

Cattle babesiosis is a tick-borne disease transmitted by haemoparasites belonging to the phylum of Apicomplexa, such as *Babesia bovis* and *B.bigemina*. The pathology affects cattle mainly in tropical and subtropical areas, but also in Europe, strongly reducing meat and milk production. The study performed during these three years of PhD was addressed to the molecular characterization of Italian *B.bigemina* strains isolated from infected animals, with attention to the genes codifying for surface antigens, putative candidates for vaccine and diagnostic tools development. One of the molecules potentially involved in the erythrocyte invasion by *B.bigemina* is the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), an apical protein having a role in the host red blood cells invasion. In this study the AMA-1 sequences from many Apicomplexa were compared and useful information on this gene from Italian strains of *B.bigemina* is provided. Preliminary data about the immunogenicity of the purified protein obtained by synthesis in *E.coli* are reported. We further report the sequences of the rap-1b and gp45 genes from Italian strains of *B.bigemina*. The rhoptry associated protein-1 (rap-1) is an interesting vaccine candidate against bovine babesiosis. gp45 is one of the surface antigens bound to the membrane by a Glycosylphosphatidylinositol (GPI-anchor MSA), which have an important role in the bovine erythrocyte invasion by the parasite. Sequence analyses revealed that *B.bigemina* Gp45 is highly polymorphic, suggesting that it doesn't seem a good vaccine candidate. Its variability could make this gene a molecular marker useful for strain discrimination. The study concerned also a region initially considered homologous to *B.bovis* SBP-1 gene.

The research was addressed to the optimization of diagnostic tools based on Real Time PCR protocols using both SYBR Green and TaqMan strategies. In conclusion, our results provide useful information about the parasite and contribute to the improvement of disease control, in concert with the study of potential vaccine and diagnostic tools.

INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	La babesiosi: generalità	4
1.2	Classificazione	4
1.3	Il vettore	5
1.4	Aspetti clinici	9
1.5	Risposta immunitaria dell’ospite	13
1.6	Babesiosi umana: una zoonosi emergente?	15
1.7	Babesiosi bovina	19
1.8	<i>Babesia bigemina</i>	22
1.9	Fasi dell’invasione dell’eritrocita	23
1.10	Gli antigeni di superficie	25
2	OBIETTIVI	29
3	MATERIALI E METODI	30
3.1	Estrazione del DNA	30
3.2	PCR di screening per l’identificazione dei patogeni <i>B.bigemina</i> e <i>B.bovis</i>	30
3.3	Ottimizzazione di un saggio di Real Time PCR con il metodo SYBR Green per il rilevamento dei patogeni <i>B.bigemina</i> e <i>B.bovis</i>	31
3.4	Ottimizzazione di un saggio di Real Time PCR con il metodo TaqMan per il rilevamento dei patogeni <i>B.bigemina</i> e <i>B.bovis</i> .	32
3.5	Amplificazione delle regioni codificanti per alcuni antigeni di superficie di <i>B.bigemina</i>	33
3.6	Clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pCR2.1 TOPO TA	34
3.7	Amplificazione e clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pGEM T-easy vector per la costruzione degli standard delle Real Time PCR	36
3.8	Estrazione DNA plasmidico	37
3.9	Elettroforesi su gel d’agarosio	38
3.10	Analisi delle sequenze	38
3.11	Clonaggio in vettore pET160/GW/D-TOPO	39
3.12	Trasformazione delle cellule DE3 e saggio di espressione pilota	42
3.13	Espressione in grandi quantità delle proteine ricombinanti in <i>E.coli</i>	43
3.14	Elettroforesi su gel di poliacrilammide	43
3.15	Purificazione delle proteine attraverso cromatografia per affinità	44
3.16	Trattamento proteine con AcTEV Protease	44

3.17	Purificazione delle proteine attraverso cromatografia per affinità in seguito a trattamento con AcTEV Protease	45
3.18	Test ELISA per la ricerca di anticorpi anti- <i>B.bigemina</i>	45
3.19	Messa a punto di un saggio ELISA per la ricerca di anticorpi contro le proteine AMA-1 e SBP-1 di <i>B.bigemina</i>	46
4	RISULTATI	47
4.1	Raccolta e conservazione di campioni di siero e sangue provenienti da bovini naturalmente infettati dai parassiti <i>B.bigemina</i>	47
4.2	Analisi sierologica e biomolecolare dei campioni	47
4.3	Ottimizzazione di Real Time PCR con il metodo SYBR Green per il rilevamento dei patogeni <i>B.bigemina</i> e <i>B.bovis</i>	50
4.4	Ottimizzazione di Real Time PCR con il metodo TaqMan per il rilevamento dei patogeni <i>B.bigemina</i> e <i>B.bovis</i>	58
4.5	Studio del polimorfismo di geni codificanti per antigeni di superficie di <i>B.bigemina</i>	62
4.5.1	Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)	63
4.5.2	Putativa Spherical Body Protein 1 (SBP-1)	79
4.5.3	Glycoprotein gp45 (GP45)	84
4.5.4	Rhoptry Associated Protein 1b (RAP-1b)	88
4.6	Produzione proteine ricombinanti in <i>E.coli</i> e saggi di immunogenicità	90
4.6.1	Messa a punto del sistema di sintesi proteica in <i>E.coli</i>	90
4.6.2	Produzione della proteina AMA-1 in <i>E. coli</i> e studio delle sue proprietà immunogene	92
4.6.3	Produzione della proteina UP in <i>E. coli</i> e studio delle sue proprietà immunogene	105
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	111
	Ringraziamenti	120
	Bibliografia	121

1. INTRODUZIONE

1.1 La babesiosi: generalità

La babesiosi è una delle più comuni patologie che colpisce animali, selvatici e domestici, nelle fasce tropicali e subtropicali del Pianeta. Essa è causata dai parassiti intraeritrocitari del genere *Babesia*. La patologia che ne consegue è endemica nei Paesi Mediterranei e in una vasta area dell’America Latina e costituisce un grave limite per la produttività del bestiame nelle suddette regioni. Storicamente, Babes (1888) è stato il primo studioso a descrivere la presenza di tali piroplasmidi nel sangue di bovini durante un focolaio d’infezione che aveva determinato emoglobinuria in alcuni bovini in Romania. Egli pensava si trattasse di un batterio e lo denominò *Haematococcus bovis* (Bock *et al.*, 2004). Solo più tardi il nome di tale microrganismo fu cambiato in *Babesia bovis* (Angus, 1996).

Pochi anni dopo gli studi di Babes, altri due studiosi, Smith e Kilbourne, identificarono l’agente eziologico della “Febbre del Texas” che denominarono *Pyrosoma bigeminum*, successivamente denominata *Babesia bigemina*. Essi per primi dimostrarono la trasmissione di un agente patogeno da un artropode ad un ospite mammifero (Smith and Kilbourne, 1893). Dopo la pubblicazione di tale lavoro, la babesiosi fu riscontrata in numerose parti del mondo. Oggi le Babesie sono considerate tra i più diffusi e ubiquitari parassiti al mondo per numero e distribuzione delle specie negli animali, seconde solo al tripanosoma (Levine, 1988; Telford *et al.*, 1993).

1.2 Classificazione

Le Babesie sono protozoi appartenenti alla famiglia *Babesiidae*, ordine Piroplasmorida, all’interno del phylum Apicomplexa (Levine, 1971). Il Phylum *Apicomplexa*, oltre al genere *Babesia*, comprende molte specie patogene per l’uomo di notevole rilevanza, quali *Plasmodium falciparum*, agente eziologico della malaria, *Toxoplasma gondii*, responsabile della toxoplasmosi, ed altri. Attualmente sono note più di 100 specie appartenenti al genere *Babesia*.

La classificazione delle diverse specie appartenenti al genere *Babesia* è stata tradizionalmente basata sulla morfologia, in particolare sulla dimensione dei microrganismi - “piccole babesie” (da 1.0 a 2.5 μm) e “grandi babesie” (da 2.5 a 5 μm) - e sulla specificità d’ospite. I parassiti della famiglia *Babesiidae* presentano un ciclo

sessuale all'interno della zecca seguito da una fase di divisione asessuale all'interno degli eritrociti dell'ospite vertebrato.

L'analisi filogenetica, condotta attraverso l'analisi del 18s rRNA (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), ha permesso una suddivisione delle babesie in cinque gruppi: 1) il gruppo composto principalmente da specie di *Babesia* che infettano gli ungulati quali *Babesia bigemina*, *B.bovis*, *B.ovis*, *B.caballi*; 2) un secondo gruppo comprendente Babesie dei cani quali *Babesia canis* e *Babesia gibsoni*, insieme a *B.divergens* e *B.odocoilei*; 3) il gruppo della *B.microti*, comprendente anche *B.felis* e *B.rhodani*; 4) il gruppo comprendente microrganismi simili alla *Theileria*; 5) il gruppo della *Theileria*. Alcune di esse sono piuttosto rare in Italia, altre, come *Babesia divergens* e *Babesia microti*, sono agenti di zoonosi, essendo in grado di infettare l'uomo (Becker Claire, 2009).

Tutti gli organismi appartenenti al genere *Babesia* presentano due classi d'ospite, uno invertebrato e uno vertebrato. Il mantenimento delle specie del genere *Babesia* è dipendente da entrambi gli ospiti. Per quanto riguarda l'ospite invertebrato, ad oggi solo le zecche *Ixodidae* sono state identificate quali vettori per *Babesia* spp.

1.3 Il vettore

Le zecche sono Acari, animali appartenenti al Phylum degli Artropodi. Le zecche costituiscono il Sottordine Ixodida, del quale sono conosciute circa 900 specie, tutte ectoparassite, ematofaghe obbligate. Si tratta, cioè, di organismi che parassitano l'ospite rimanendo sulla superficie del suo corpo e che effettuano su di esso i pasti di sangue indispensabili per il loro sviluppo e per la riproduzione. Tali organismi attraversano, nel corso del loro ciclo vitale, quattro stadi di sviluppo: uovo embrionato, larva, ninfa e adulto. Dopo la schiusa, il passaggio da uno stadio al successivo avviene attraverso una muta che richiede un precedente pasto di sangue. L'accoppiamento negli ixodidi avviene di norma sull'ospite, ma le uova sono deposte sempre nell'ambiente circostante. La schiusa può avvenire rapidamente, in poche settimane o, viceversa, essere ritardata di diversi mesi, in modo da sincronizzare l'uscita delle larve con l'inizio della stagione favorevole. Le larve cercano l'ospite sul quale viene effettuato il primo pasto, al termine del quale, in molte specie, avviene il distacco e il ritorno all'ambiente per effettuare la muta. In altri casi la larva (e, talvolta, anche la ninfa repleta) resta sull'ospite stesso dove effettua la muta. Se la muta degli stadi immaturi avviene nell'ambiente, la ninfa o l'adulto che ne derivano si dedicano alla ricerca di un nuovo ospite, che può essere anche molto diverso da quello utilizzato nello stadio precedente. La durata di un intero

ciclo può essere di alcune settimane o mesi o anche di anni, a seconda della specie, della facilità di reperimento dell'ospite e, più in generale, del favore delle condizioni ambientali (Cringoli *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda gli effetti sull'ospite, oltre ad un'azione anemizzante e traumatica dovuta al danneggiamento della cute dell'ospite da parte dell'apparato boccale della zecca, è ampiamente conosciuta l'azione allergizzante degli estratti salivari e l'azione vettoriale, comune a tutte le specie. Le zecche si suddividono in due grandi gruppi: le così dette zecche dure (Ixodidae), di norma parassiti dei mammiferi, anche se alcune specie possono compiere il pasto di sangue su uccelli, anfibi e rettili, e gli Argasidae (zecche “mollì”, degli uccelli) che sono in grado di fare il pasto di sangue anche sull'uomo quando presenti in prossimità delle abitazioni. La straordinaria capacità delle zecche nel trasmettere microrganismi patogeni è in relazione alle modalità con cui questi artropodi compiono il pasto di sangue e alla composizione dei secreti salivari. La saliva contiene sostanze attive in grado di promuovere la crescita di virus (Hajnicka *et al.*, 1998) e la mobilità dei batteri (Shih *et al.*, 2002), oltre a sostanze anticoagulanti, anestetizzanti, antinfiammatorie, in grado di depolimerizzare il collagene e di interferire sulla reazione immunitaria locale oltre che sull'emostasi (Champagne, 1994): in tal modo attorno al punto della cute in cui la zecca affonda il suo apparato boccale si crea un microambiente idoneo alla trasmissione dell'agente patogeno.

Nel corso della vita parassitaria l'attività ematofagica della zecca è pressoché continua, con fasi lente e rapide di assunzione del sangue che affluisce nella microferita causata dal rostro: alla fase di assunzione segue una fase di rigurgito di larga parte della quota liquida (Kaufman, 1989). Tale meccanismo è dovuto alla necessità di mantenere l'equilibrio idrostatico da parte dell'artropode, che non potrebbe smaltire i volumi di sangue ingeriti (nelle fase rapida una singola femmina adulta del peso di 7-10 mg può assumere fino a 4 ml di sangue; Kaufman, 1989). È soprattutto nella fase di rigurgito che la trasmissione di microrganismi è più attiva. Il diffondersi dell'infezione è conseguenza dell'assunzione del patogeno da parte di una zecca non infetta che si alimenta su un ospite infetto; il successivo pasto di sangue su un ospite non infetto assicura la sopravvivenza e la diffusione del patogeno. Ne consegue che più elevato è il livello dell'infezione sistemica nell'ospite vertebrato maggiore è la probabilità per il vettore di infettarsi e la prevalenza di infezione tra ospiti vertebrati dovrebbe essere direttamente correlata alla presenza del patogeno nelle zecche.

La zecca può trasmettere il patogeno sia per via trans-stadiale (modalità di trasmissione orizzontale) sia per via trans-ovarica (modalità di trasmissione verticale). La trasmissione trans-ovarica è più efficace di quella trans-stadiale. Nel primo caso, una femmina infetta passa l'infezione a un grande numero di figli. Nel secondo caso invece l'infezione è passata soltanto allo stadio seguente dello stesso individuo. La maggior parte delle specie di *Babesia* è trasmessa mediante trasmissione trans-ovarica. L'infezione primaria viene acquisita dalla femmina adulta che la trasmette per via ovarica alla generazione successiva (Manilla, 1998). Per diverse specie di *Babesia* (*B. ovis*, *B. canis*, *B. major*), le zecche (*Haemophysalis*, *Rhipicephalus*) possono rimanere infettive per diverse generazioni (Iori *et al.*, 2010).

Le zecche Ixodidae

Le zecche della famiglia Ixodidae (zecche dure, Figura 1), genere *Rhipicephalus*, sono responsabili della trasmissione di numerose specie di *Babesia* spp. Queste zecche sono diffuse nelle regioni subtropicali, tropicali e temperate.

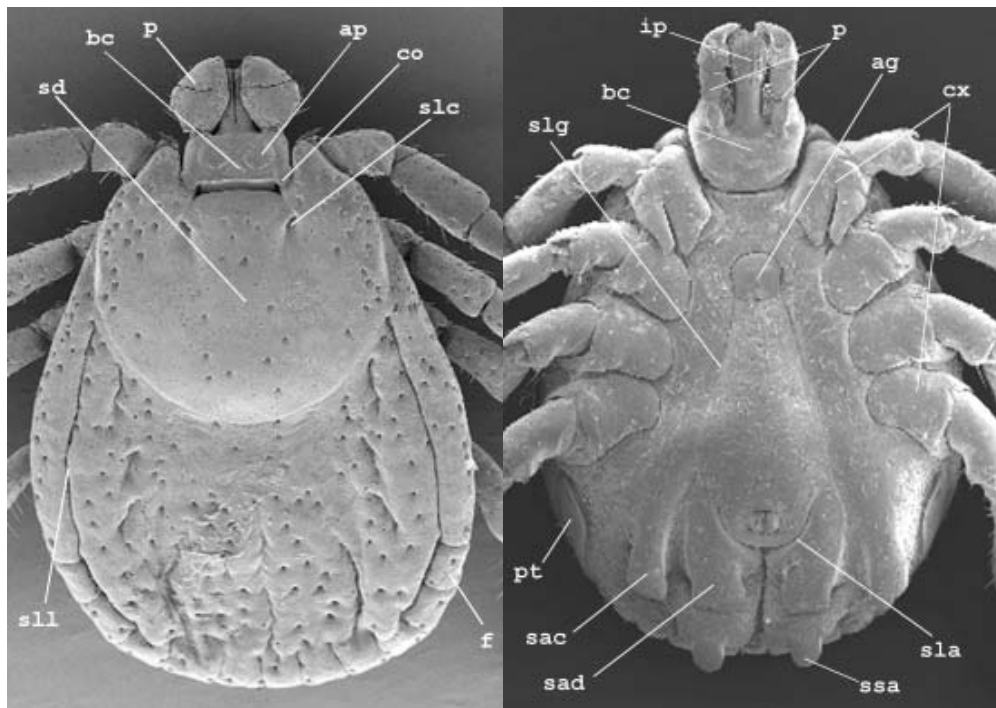


Figura 1. Zecca Ixodidae. a. (sinistra) *Habitus* dorsale (femmina) b. (destra) *Habitus* ventrale (maschio). Foto tratte da Cingoli *et al.*, 2005.

Il ciclo biologico degli Ixodida è caratterizzato da tre stadi di sviluppo separati da mute, con il trapasso della larva (esapode) alla ninfa (ottapode) e da questa all'adulto. Tra uno

stadio e l'altro è essenziale l'assunzione di sangue (parassitismo obbligatorio) che avviene alternando suzioni a secrezioni salivari (Manilla, 1998).

Una volta effettuato il pasto di sangue sull'ospite, la zecca può staccarsi da questo e mutare nell'ambiente oppure restare e mutare sull'ospite stesso. In funzione dell'una o dell'altra strategia si distinguono quindi specie: monofasiche, difasiche, trifasiche e polifasiche. Le specie del genere *Rhipicephalus*, in particolare, sono tutte monofasiche. Tutte le mute quindi avvengono sugli ospiti prediletti, che vengono ricercati dalle sole larve (Figura 2). Ne consegue che i loro cicli biologici, con la soppressione di due fasi di ricerca, sono molto più veloci che nella grande maggioranza delle altre specie di Ixodidae e che, in particolari condizioni climatiche, in uno stesso anno possono succedersi fino a tre o quattro generazioni. Dal comportamento monofasico della zecca deriva anche che gli ospiti risultano intensamente parassitati con le conseguenze che da esse possono derivare. Non a caso il primo e riuscito tentativo di eradicazione di una specie di Ixodidae fu realizzato in America proprio a spese di *Rhipicephalus annulatus*, dopo che gli allevatori texani si erano resi conto che le loro attività e i profitti da esse derivati erano vanificati dalla presenza della zecca.

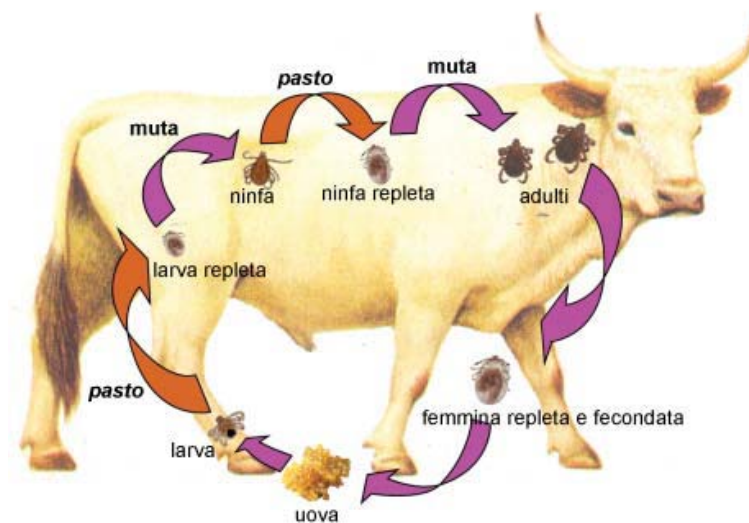


Figura 2. Rappresentazione schematica del ciclo vitale delle zecche del genere *Rhipicephalus*. Immagine tratta da Cringoli et al., 2005.

La zecca è attiva ininterrottamente dalla primavera all'autunno e la nutrizione richiede solo alcune settimane, durante le quali in ogni stadio assume sangue e muta, lasciandosi cadere solo allo stadio di adulto repleto, ossia solo dopo che ha terminato il pasto di sangue. Nelle condizioni più favorevoli, l'intero ciclo si compie in circa 2 mesi con la produzione di 3-4 generazioni annue, mentre in quelle più avverse esso richiede circa un

anno. La distribuzione geografica di *Rhipicephalus annulatus* riguarda le zone più meridionali degli Stati Uniti d’America, l’Europa, l’Asia e l’Africa settentrionale e nella zona nord e centrale della penisola arabica (Cringoli *et al.*, 2005).

1.4 Aspetti clinici

Sintomatologia

Le manifestazioni della malattia nella babesiosi sono causate dallo stadio riproduttivo asessuale del microrganismo negli eritrociti dell’ospite e dalla conseguente lisi delle cellule dell’ospite. Di conseguenza, vi è un quadro clinico che riflette in modo chiaro il livello di parassitemia nel sangue. La patogenesi è quasi interamente legata alla rapida, a volte massiccia, emolisi intravascolare. Si riscontra emoglobinuria e febbre. Nei casi più gravi, si possono presentare una grave e improvvisa anemia, ittero e perfino la morte. Il periodo di incubazione dal momento della trasmissione da parte della zecca fino alla comparsa dei sintomi è variabile e i fattori dell’ospite associati con la variabilità biologica della malattia sono poco compresi (Bock *et al.*, 2004).

Diagnosi

La diagnosi della babesiosi inizia con la storia descrittiva, che comprende manifestazioni cliniche appropriate e presenza di morsi di zecca o esposizione ad aree infestate da zecche. Le analisi successive includono l’esame degli strisci di sangue, analisi sierologiche attraverso valutazione degli anticorpi con test di fluorescenza indiretta, IFAT (Indirect Immunofluorescent Antibody Test) e analisi molecolari mediante PCR. L’esame degli strisci di sangue colorato col Giemsa è la procedura più comune, tuttavia i parassiti sono troppo piccoli per essere diagnosticati in maniera definitiva tramite questa tecnica. Una diagnosi più accurata è generalmente basata sull’osservazione dei trofozoiti intraeritrocitari o dei merozoiti in strisci di sangue colorati con Wright-Giemsa in immersione ad olio (Figura 3a). La Figura 3 a-h mostra la comune morfologia degli organismi *Babesia* in strisci di sangue prelevati da criceti infetti. Dal punto di vista morfologico vi è una grande variabilità nelle forme osservate: anelli semplici, trofozoiti piriformi singoli o a coppia (piriformi), e, più raramente, la croce Maltese. Le forme ad anello (Figura 3b) presentano nuclei scuri attorno alla periferia dell’anello con vacuoli di dimensioni variabili al centro. I merozoiti possono formare anche una struttura piriforme (Figura 3c), da cui il nome dell’ordine. La tetrade o croce maltese è mostrata in Figura 3d, ma occasionalmente possono essere identificati

anche merozoiti extracellulari (Figura 3e) o forme ameboidi (Figura 3f, 3g). Gli eritrociti possono anche presentare infezioni multiple (Figura 3h). È difficile distinguere *Babesia* da *Plasmodium* spp. agli strisci colorati col Giemsa. I trofozoiti di *Babesia* possono apparire simili ai trofozoiti di *Plasmodium* spp.; tuttavia *Babesia* manca delle deposizioni di emozoina nel citoplasma. Questa differenza non è sempre scontata dal momento che i giovani trofozoiti di *Plasmodium* non hanno emozoina. L'identificazione delle tetradi e dei merozoiti extracellulari di *Babesia* o di schizonti e gametociti di *Plasmodium* spp., quando presenti, è usata per differenziare questi organismi (Boustani and Gelfand, 1996). In generale, l'analisi degli strisci di sangue è un procedimento piuttosto soggettivo che dipende dall'esperienza dell'osservatore. La presenza di possibili bassi livelli di parassitemia può a volte non consentire di discriminare tra differenti tipologie di *Babesia* risultando a volte in una diagnosi poco accurata che può necessitare di ulteriori analisi.

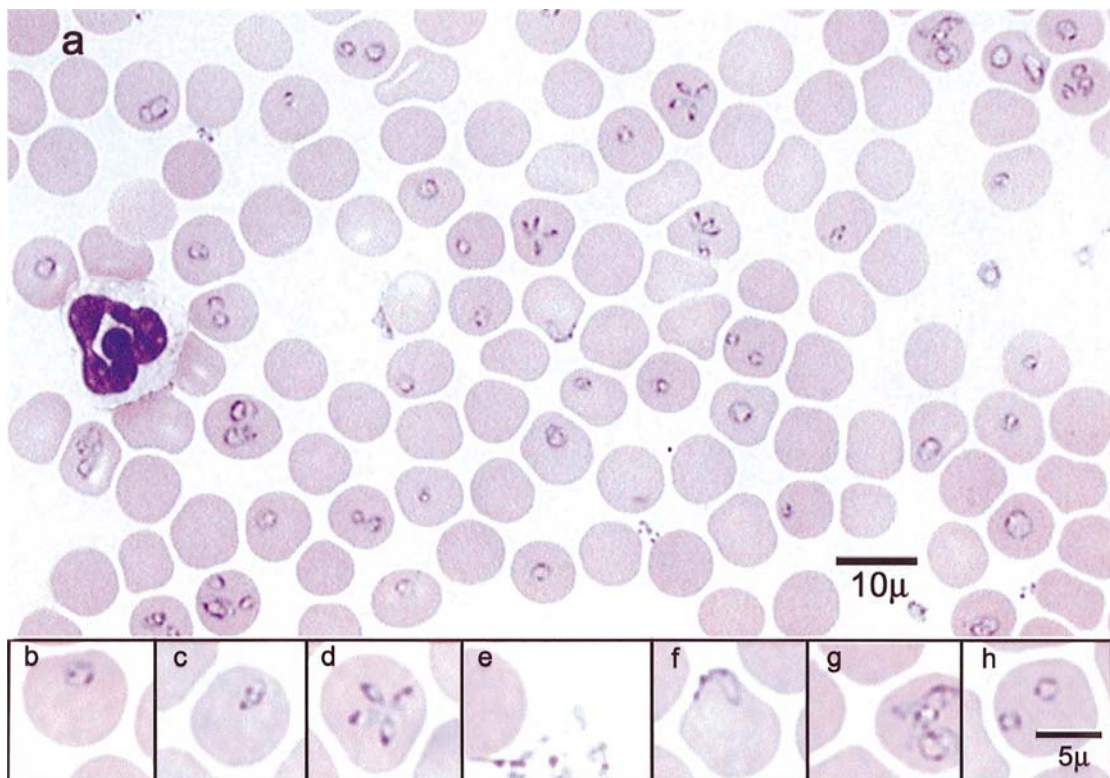


Figura 3. Strisci di sangue colorati con il Giemsa a partire da eritrociti di criceto infetti con il parassita *Babesia* WA1, successivamente denominato *B.duncani* (vedi il testo). Ingrandimento 112x per (a), 2000x per le figure da (b) ad (h). (a) Inquadratura ad immersione ad olio che mostra parassitemia severa; (b) ring form; (c) piriformi; (d) tetrade o croce maltese; (e) merozoiti extra-eritrocitari; (f, g) forme ameboidi; (h) infezione multipla di un eritrocita. (Da Kjemtrup and Conrad, 2000).

L'inoculo di animali suscettibili con il sangue intero di animali sospetti costituisce un'altra modalità di diagnosi. Prima della messa a punto di test basati sulla PCR per

B. microti, l'inoculo di criceti con sangue di organismi infetti era il metodo più sensibile per il rilevamento del parassita (Persing *et al.*, 1992). Il microrganismo richiede varie settimane per stabilire un'infezione rilevabile e il risultato può essere di difficile interpretazione a causa di fattori quali l'adattamento dell'ospite, la variabilità dell'isolato e la dose dell'inoculo. I criceti sono stati tradizionalmente utilizzati per isolare *B. microti*, mentre i gerbilli o ratti della sabbia e i bovini sono utilizzati per l'isolamento di *B. divergens*. L'inoculo degli animali richiede il monitoraggio dell'infezione attraverso l'esame degli strisci di sangue per 6 settimane (Telford *et al.*, 1993). Quindi, sebbene questo sistema sia molto sensibile permettendo di rilevare 300 organismi per ml di sangue, la procedura è lenta e costosa.

La PCR è dunque divenuta il test elettivo per la conferma di infezioni in atto in soggetti con anticorpi specifici e per monitorare la risposta terapeutica. Tuttavia, con tale metodo è necessario prestare molta attenzione per evitare contaminazioni potrebbero portare a falsi positivi (Persing *et al.*, 1992) e, pertanto, i dati della PCR dovrebbero, quando è possibile, essere accompagnati da indagini sierologiche.

L'amplificazione del DNA mediante PCR è utilizzata come tecnica più sensibile, in particolare quando le infezioni sono subcliniche o la parassitemia è bassa (Persing, 1992). Inoltre è possibile sequenziare il prodotto di PCR, consentendo l'identificazione della specie. Sono stati disegnati primers specifici che si appaiano a regioni del gene rRNA 18S (Persing and Conrad, 1995). Tale gene è utilizzato frequentemente come gene bersaglio in quanto è presente negli organismi in elevato numero di copie, la sua sequenza presenta informazioni da un punto di vista filogenetico e vi sono regioni conservate che permettono l'utilizzo di primers generici per l'identificazione di parassiti appartenenti a specie non ancora descritte. Questo metodo è sensibile e rapido consentendo di ottenere il risultato in 2-3 giorni. Animali con presenza di DNA del parassita rilevabile nel sangue vengono considerati parassitemici. Infatti vari studi hanno mostrato che il DNA del parassita è rapidamente rimosso dal sangue in assenza di replicazione, così la sua presenza a livelli rilevabili è indice di infezione attiva (Kain *et al.*, 1993; Krause *et al.*, 1998).

L'IFAT rimane la tecnica sierologica d'elezione per la ricerca degli anticorpi contro i parassiti del genere *Babesia*. Gli anticorpi sono generalmente rintracciabili in genere dopo qualche settimana dall'infezione e i titoli anticorpali possono rimanere elevati per un lungo periodo di tempo dall'infezione anche se ciò non implica necessariamente il perdurare dell'infezione. Un inconveniente dei test sierologici è dovuto al fatto che

parassiti diversi possono dar luogo a cross reattività, generando falsi positivi. Al contrario, animali il cui prelievo è eseguito negli stadi precoci dell'infezione possono generare falsi negativi. Oltre a tale tipologia di test, sono stati messi a punto saggi ELISA utilizzando antigeni ricombinanti che possono costituire un valido strumento per lo screening rapido di un ampio numero di campioni (Homer *et al.*, 2000b; Lodes *et al.*, 2000). Le metodiche che prevedono l'uso di antigeni ricombinanti costituiscono spesso le soluzioni più efficaci riguardo a rapidità, sensibilità e specificità.

Trattamento e prevenzione

La letteratura riporta numerose sostanze con attività babesicida, ma poche sono effettivamente disponibili in commercio. L'imidocarb è il farmaco maggiormente utilizzato per la babesiosi. Esso viene somministrato per via sottocutanea e la posologia prevede una somministrazione di 1-2 mg/kg mentre una somministrazione di 3 mg/kg viene utilizzata per la protezione di *B.bigemina* per almeno 2 mesi (Bock *et al.*, 2004).

Ad oggi, non esistono vaccini contro i microrganismi agenti della babesiosi, anche se sforzi significativi sono stati intrapresi per lo sviluppo di vaccini per i bovini e altri animali. Gran parte del lavoro svolto per la messa a punto di vaccini è stata focalizzata su *B.bovis*, *B.divergens* e *B.bigemina* (Palmer and McElwain, 1995). Gli sforzi sono stati indirizzati sia allo sviluppo di vaccini attenuati sia di vaccini che fanno uso di antigeni solubili ottenuti a partire da colture *in vitro* (Smith *et al.*, 1981), che di vaccini ricombinanti (Palmer *et al.*, 1995). La vaccinazione contro la babesiosi bovina è importante quando gli animali sono trasportati da regioni non colpite da zecche a regioni infestate da zecche. I vaccini attualmente disponibili si basano su parassiti vivi, che sono stati attenuati nella loro patogenicità. Sono prodotti in alcuni paesi come l'Argentina, Israele e Australia esclusivamente per uso circoscritto. Questi vaccini sono efficaci nel conferire un'immunità protettiva dopo una sola applicazione. Sono utilizzati maggiormente per gli animali di età inferiore a un anno per minimizzare il rischio di malattie. Quando viene applicato per gli animali più vecchi, questi devono essere attentamente monitorati dopo la vaccinazione in quanto potrebbero sviluppare segni clinici e persino morire a causa del vaccino, effetto particolarmente preoccupante nel caso di bovini di alto valore economico. Questi episodi sono probabilmente legati al fenomeno della stabilità endemica, di cui si dirà più avanti. I parassiti utilizzati nei vaccini vivi possono essere coltivati *in vitro* o amplificati in giovani bovini

splenectomizzati. Una produzione di successo di questo tipo di vaccini implica un rigoroso sistema di controllo per evitare la possibilità di co-trasmissione di altri microrganismi patogeni. La produzione è ingombrante e i vaccini devono essere tenuti refrigerati o congelati. Inoltre, esiste il rischio di problemi nel vaccino apparentemente causati dalla reversione dei parassiti al loro status patogenico (Bock *et al.*, 2004). Tuttavia, nonostante i loro svantaggi, i vaccini appaiono come una migliore soluzione per controllare i focolai di babesiosi rispetto al trattamento di animali malati con antiparassitari, in quanto alcuni farmaci efficaci a volte presentano problemi di sicurezza o di persistenza di residui. Ad esempio, un rapporto dell'OMS sulla imidocarb (Good, 1998), il farmaco più comune usato attualmente contro le babesie, ha indicato residui persistenti nei tessuti animali, in particolare nel fegato, fino a 90 giorni dopo il trattamento. Inoltre, i vaccini sono più appropriati per l'allevamento estensivo del bestiame, quando il monitoraggio di singoli animali è più difficile.

1.5 Risposta Immunitaria dell'ospite

Tutti i mammiferi esaminati sono riusciti a sviluppare un'immunità ai parassiti del genere *Babesia*, sia in seguito a episodi di infezione e guarigione, sia dopo immunoprofilassi. Nell'immunità alla babesiosi sono implicati sia fattori umorali che cellulari. Quando si verifica l'infezione in seguito a morso di zecca, gli sporozoiti sono liberi nel plasma del torrente circolatorio per un breve periodo di tempo. In questa fase, le immunoglobuline G (IgG) possono prevenire l'infezione legando e neutralizzando gli sporozoiti prima che essi invadano le cellule bersaglio (Figura 4a).

Una nuova fase inizia quando il microrganismo intraprende la fase intraeritrocitaria. È durante questa fase che la parassitemia aumenta e che la patologia acuta può manifestarsi. Le cellule dell'immunità innata controllano il tasso di crescita del parassita e quindi l'entità della parassitemia (Figura 4b). Macrofagi e cellule NK sono implicate nella risposta immunitaria anti-*Babesia*. L'inibizione della replicazione del patogeno è accompagnata dalla produzione di fattori solubili quali interferone gamma (IFN- γ) da parte delle cellule NK e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), ossido nitrico (NO), e specie reattive dell'ossigeno (ROSS) da parte dei macrofagi. Tuttavia, non è chiaro se queste molecole siano in grado di interferire con la moltiplicazione del patogeno all'interno dell'eritrocita (Homer *et al.*, 2000a).

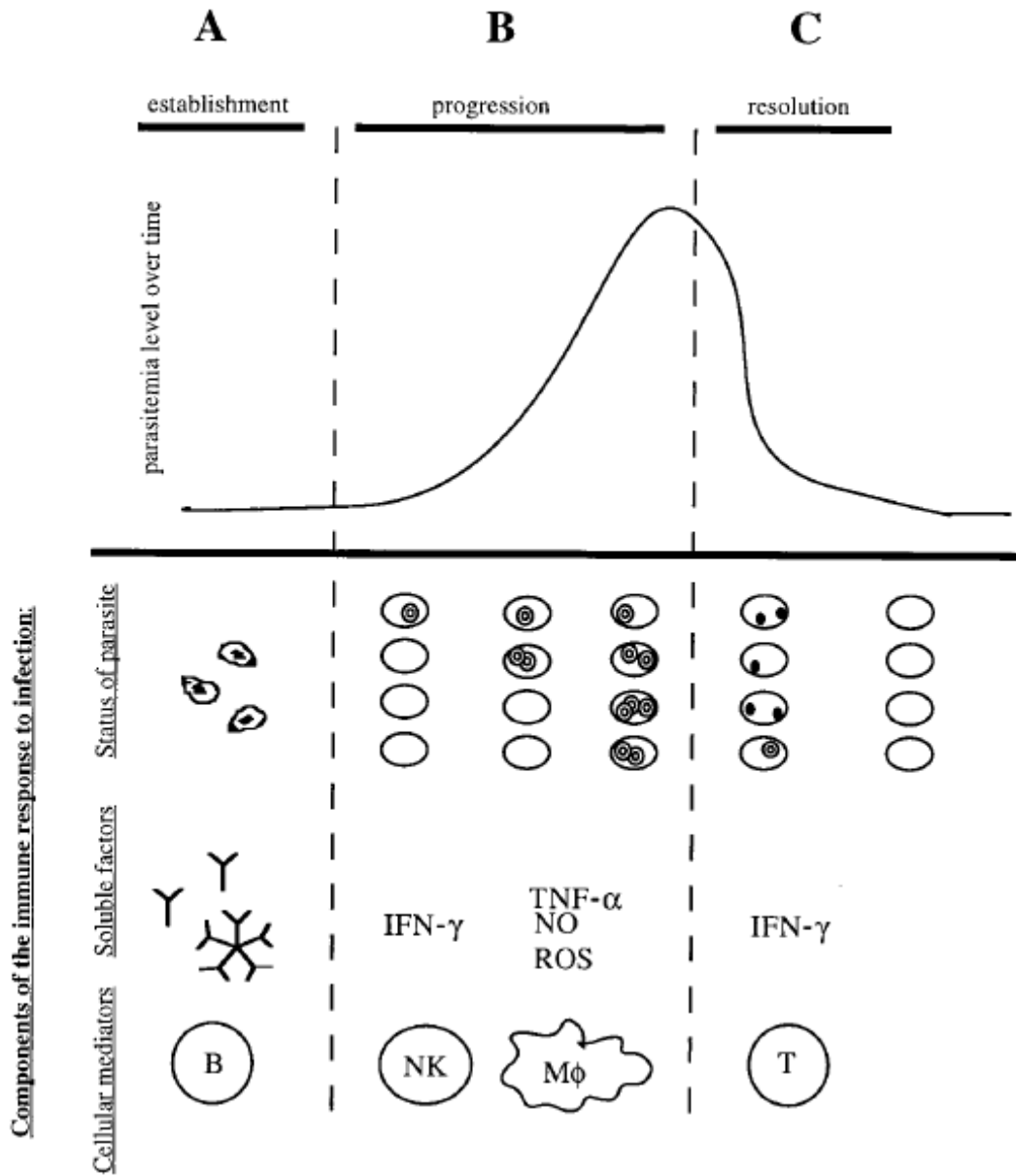


Figura 4 a-c. Ipotesi del meccanismo d’azione delle cellule e delle molecole implicate nell’immunità verso le specie di *Babesia* (tratta da Homer *et al.*, 2000a).

È stato dimostrato che anticorpi nel siero neutralizzano gli sporozoi o i merozoiti che si trovano ad uno stadio extracellulare (Hines *et al.*, 1989), mentre l’immunità cellulo-mediata svolge un importante ruolo anche attraverso la milza nella difesa dell’ospite contro le varie specie di *Babesia*. La milza è un grande organo linfoide, popolato da cellule T, B, natural killer (NK) e macrofagi. Alcune di tali popolazioni cellulari potrebbero essere responsabili degli effetti protettivi evidenziati.

Nello stadio di guarigione (Figura 4c), i livelli di parassitemia iniziano a declinare e ciò sembra dovuto almeno in parte alla degenerazione del patogeno all’interno

dell'eritrocita. I linfociti T, in particolare la sottopopolazione di cellule CD41 IFN- γ , sembrano i responsabili dell'eliminazione del parassita. Il meccanismo di eradicazione del parassita e la sua correlazione con la produzione di IFN- γ rimangono tuttavia sconosciuti.

1.6 Babesiosi umana: una zoonosi emergente?

Il caso di babesiosi umana, attribuito a *B.bigemina*, in un individuo splenectomizzato della Jugoslavia nel 1957 (Homer *et al.*, 2000a) è stato il primo fenomeno di zoonosi per opera di specie appartenenti al genere *Babesia*. Da allora più di 31 casi di babesiosi umana sono stati riportati nell'uomo in Europa, 23 dei quali causati da *B.divergens* (Gorenflot *et al.*, 1998). Più della metà di questi casi sono stati riportati tra Francia e Gran Bretagna, fenomeno probabilmente dovuto ad una maggiore attenzione dei medici piuttosto che ad una reale maggiore prevalenza della malattia (Gorenflot *et al.*, 1998). *Babesia divergens* è un parassita dei bovini importante dal punto di vista economico in Europa. Trasmesso attraverso la zecca *Ixodes ricinus*, la femmina adulta acquisisce il parassita in seguito al pasto di sangue su un bovino infetto e tramanda l'infezione alla progenie. La zecca è in grado di trasmettere l'infezione in tutti gli stadi del suo ciclo vitale. I casi clinici nei bovini si manifestano da Maggio a Giugno con un secondo picco tra Settembre e Ottobre. Anche i casi di babesiosi umana possono verificarsi tra Maggio e Settembre (Gorenflot *et al.*, 1998). La distribuzione dei casi corrisponde al picco dell'attività della zecca *I.ricinus* allo stadio di ninfa in tarda primavera e di zecca adulta in autunno. La sovrapposizione geografica delle popolazioni delle zecche *I.ricinus*, dei bovini infetti e dei casi umani, suggerisce fortemente l'implicazione di *I.ricinus* come vettore responsabile della trasmissione di *B.divergens* all'uomo in Europa. Le popolazioni maggiormente a rischio di acquisizione della babesiosi sono allevatori, agricoltori, forestali.

La splenectomia rimane il principale fattore di rischio per l'infezione dell'uomo per opera di *B.divergens*. Circa l'84% dei casi noti si è verificato in individui in cui la milza era stata asportata. Non sono ancora state riportate infezioni di *B.divergens* in individui HIV-positivi. La babesiosi dovuta a *B.divergens* presenta un'insorgenza acuta in pazienti splenectomizzati ed è considerata un'emergenza sanitaria. Non vi sono invece in Europa casi di babesiosi dovuti a *B.microti*, principale agente responsabile della babesiosi umana in America, nonostante il microrganismo è stato documentato come parassita dei roditori in molti paesi europei (Karbowiak *et al.*, 1996). Questo può essere

dovuto al fatto che in Europa la zecca in grado di mantenere il parassita *B.microti* nei roditori, *Ixodes trianguliceps*, non morde l'uomo oppure alla possibilità che il ceppo europeo di *B.microti* non sia patogeno per l'uomo.

Per quanto riguarda l'America, il primo caso di babesiosi umana, riportato nel 1969 nella costa orientale degli USA, ha attirato su di sé l'interesse della comunità medica poiché si è trattato di un caso fulminante in un individuo con milza assolutamente sana. L'agente eziologico è stato identificato come il parassita dei roditori *B.microti*. La patologia fu indicata come febbre di Nantucket poiché tale caso e più di 40 ulteriori episodi si sono verificati nella decade successiva nelle aree di Nantucket Island, Massachusetts, Long Island, New York, rendendo evidente che un focolaio endemico di *B.microti* si era stabilito in tale area. Più di 300 casi di babesiosi umana sono stati riportati negli Stati Uniti (Telford *et al.*, 1993). Inoltre, molti casi di infezione hanno probabilmente sintomatologia subclinica e pertanto non vengono riportati (Krause *et al.*, 1998). Tra le specie che più probabilmente potrebbero fungere da ospite vertebrato del parassita si annoverano *Peromyscus leucopus* (il topo dalle zampe bianche), *Microtus pennsylvanicus* (il topo di campo) e *Sylvilagus oridanus* (coniglio). I soggetti asplenicici infetti con *B. microti* possono presentare babesiosi severa; tuttavia, a differenza delle infezioni con *B.divergens*, l'assenza della milza non è un requisito per la malattia. Fattori di rischio per la patologia severa includono l'età avanzata (>55 anni), sistema immunitario compromesso in seguito ad AIDS, somministrazione di farmaci immunorepressori in seguito a trapianto d'organi e chemioterapia (Evenson *et al.*, 1998). Casi di babesiosi umana attribuiti ad una diversa specie di *Babesia* si sono verificati in California a partire dal 1968 (Homer *et al.*, 2000a). Tali casi vennero attribuiti a una specie di *Babesia* denominata CA1. Altri casi si sono verificati nello stato di Washington (Quick *et al.*, 1983) e l'aspetto più preoccupante di tali casi è che uno dei pazienti colpiti, un soggetto di 41 anni, non mostrava alcun tipico fattore di rischio per babesiosi fulminante. Questo nuovo agente fu chiamato WA1. Altri tre casi sono stati descritti in California e attribuiti a tre specie denominate CA2-CA4-CA4 tra il 1992 e il 1993 (Persing *et al.*, 1995) e tra essi l'infezione con CA3 è risultata fatale. Tutti gli agenti responsabili di tali casi oggi vengono annoverati all'interno di una nuova specie, *B.duncani* (Conrad *et al.*, 2006). L'esiguo numero di casi di babesiosi umana imputabili a tale specie non consente la descrizione di segnali clinici ed epidemiologici distintivi. Tutti gli individui con tale tipologia di infezione hanno manifestato segnali clinici simili a quelli di uno stato influenzale: febbre, mal di testa, vomito e, nei casi più

gravi, coagulazione intravasale disseminata, congestione polmonare e insufficienza renale. L'emoglobinuria è stata riscontrata solo in alcuni casi, suggerendo che i segnali clinici non sono totalmente correlati alla distruzione degli eritrociti (Homer *et al.*, 2000a). Oltre al morso di zecca, esistono altre due modalità di trasmissione del parassita all'uomo. Infezioni ad opera di *B. microti* sono state documentate a partire dal 1980 in più di 20 casi di babesiosi acquisita in seguito a trasfusione (McQuiston *et al.*, 2000) e, dopo *Plasmodium*, è il secondo parassita più diffuso acquisito in seguito a trasfusioni. I parassiti del genere *Babesia* possono essere trasmessi in una varietà di componenti del sangue inclusi eritrociti e piastrine.

Tutti i donatori implicati erano asintomatici al momento della donazione (McQuiston *et al.*, 2000), fenomeno che sottolinea il carattere subclinico di molte infezioni di *B. microti*. La seconda modalità di trasmissione che non implica la zecca vettore è la trasmissione transplacentare. Solo due casi umani sono stati documentati in maniera convincente (Esernio-Jenssen *et al.*, 1987; New *et al.*, 1997). Inoltre, è stato riportato un caso di infezione della madre con *B. microti* durante la gravidanza, seguita da trattamento, che non ha determinato trasmissione del parassita al feto (Homer *et al.*, 2000a). Casi di trasmissione transplacentare sono frequenti per molti agenti di babesiosi di rilevanza veterinaria, in particolare *T. equi* (*Babesia equi*) nei cavalli, *B. bovis* nei bovini e *B. canis* nei cani. Inoltre, si può verificare aborto in seguito a babesiosi ad opera di *B. bovis* durante la gravidanza. Sebbene non siano molti i casi umani di trasmissione transplacentare di babesiosi, la capacità dei piroplasmi di essere trasmessi per via transplacentare e causare potenzialmente aborto, implica che la trasmissione transplacentare del parassita, in particolare nelle aree endemiche, può essere più comune di quanto non si pensi (Homer *et al.*, 2000a).

La sintomatologia estrema è spesso descritta come infezione fulminante simile alla malaria. I sintomi possono includere malessere, brividi, mal di testa, anemia, affaticamento e febbre anche fino ai 40°C. In alcuni casi sono riportate anche nausea, vomito, sudore notturno, perdita di peso, ematuria, che si pensa siano associati con i livelli di parassitemia più elevati (Persing and Conrad, 1995). Epatomegalia e splenomegalia possono essere presenti. L'anemia emolitica si manifesta per molti giorni fino ad arrivare a qualche mese nei casi più severi, in genere soggetti asplenicici o anziani. Le complicazioni si hanno di solito in pazienti immunocompromessi e possono comprendere peggioramento di uno stato di salute già precario o, raramente, alterazioni respiratorie. I casi dovuti a infezioni con *B. divergens* verificatisi in Europa sono risultati

in genere più gravi di quelli causati da *B.microti*. L’insorgenza dei sintomi della malattia di norma avviene entro 1-3 settimane dal morso della zecca infetta. La malattia è apparsa improvvisamente con emoglobinuria come sintomo immediato seguito da itterizia fino ad emolisi severa. Nei casi più gravi, i pazienti hanno mostrato una parvenza simile a shock, con problemi renali ed edema polmonare (Gorenflot *et al.*, 1998). La presenza o meno di alcuni sintomi in genere dipende dal livello di parassitemia. Casi clinici evidenti possono sviluppare elevati livelli di transaminasi, fosfatasi alcalina, bilirubina non coniugata, lattico-deidrogenasi nel siero. Possono essere presenti anemia normocitica, trombocitopenia e, occasionalmente, leucopenia. Ciò può derivare da risposta infiammatoria mediata da TNF, simile alla patogenesi delle infezioni malariche severe. Tuttavia, alla luce dei ritrovamenti di coinfezione nell’uomo da parte di agenti multipli trasmessi da zecca, è possibile che alcuni dei più variabili aspetti della malattia possono essere associati alla coinfezione.

Il numero sempre maggiore di casi di babesiosi umana diagnosticati induce a considerare emergente tale malattia. Per malattia emergente si intende un’infezione nuova, tradizionale o farmaco resistente la cui incidenza è incrementata negli ultimi 20 anni o è destinata ad aumentare nel prossimo futuro. In virtù dei casi di babesiosi umana descritti a partire dal 1980 (più di 300), essa può essere considerata come patologia emergente. Le ragioni dell’incrementata incidenza della babesiosi sono complesse, implicando soprattutto cambiamenti ecologici, aumentata attenzione alla malattia, incremento del numero di individui suscettibili, come ad esempio i soggetti infetti da virus HIV.

L’incremento del numero di grandi animali, possibili ospiti di zecche, ha facilitato la diffusione di *I.scapularis* nel nord-est degli Stati Uniti. Attività residenziali o ricreative in ambienti rurali infestati da zecche contribuiscono all’aumento dell’esposizione dell’uomo agli agenti della babesiosi (Pruthi *et al.*, 1997). L’emergenza anche di altri agenti trasmessi da zecche quali *Borrelia burgdorferi*, l’agente della Lyme disease e dell’erlichiosi granulocitica, ha contribuito ad aumentare l’attenzione sanitaria anche verso le altre patologie trasmesse da zecche quali la babesiosi. L’incremento del numero della popolazione anziana, l’aumento del numero di individui HIV positivi, di individui che ricevono farmaci immunosoppressori o chemioterapici ha contribuito ad aumentare il numero di casi di babesiosi umana.

1.7 Babesiosi bovina

La babesiosi bovina è causata principalmente dagli Apicomplexa *Babesia bigemina*, *B.bovis* e *B.divergens*, la cui trasmissione avviene per mezzo di zecche del genere *Ixodidae* (Bock *et al.*, 2004). Tale infezione causa enormi perdite economiche nell'industria del bestiame in tutto il mondo. Un report della FAO del 1989 ha stimato che nel solo continente Americano le perdite dovute alla Babesiosi bovina ammontano a 1365 milioni di dollari l'anno, e la situazione non è ancora migliorata. Il bovino affetto da tali parassiti soffre di grave anemia, emoglobinemia ed emoglobinuria, accompagnate da sintomi aspecifici quali febbre, atassia, anoressia e, nei casi più gravi, da sintomi neurologici quali aggressività, depressione e, talora, coagulazione intravasale disseminata (Bock *et al.*, 2004). Se i sintomi sono riconosciuti in tempo e la malattia adeguatamente diagnosticata, è possibile trattare il bovino con Imidocarbide, alla dose di 1-3 mg/Kg.

Stabilità endemica

La stabilità endemica o enzootica è definita come lo stato in cui la relazione tra l'ospite, il patogeno, il vettore e l'ambiente è tale che i segni clinici della malattia si verificano raramente o non si verificano affatto. La resistenza acquisita passivamente attraverso il colostro permane per i primi due mesi ed è seguita dall'instaurarsi dell'immunità innata tra i tre e i nove mesi d'età. Pertanto, i bovini esposti alla babesiosi tra i sei e i nove mesi d'età raramente mostrano i segni clinici e sviluppano un'immunità duratura (Bock *et al.*, 2004). Se la stabilità enzootica ha luogo, non sono necessarie misure di controllo per evitare focolai di babesiosi. I bovini diventano naturalmente infetti con il patogeno per mezzo delle zecche quando sono giovani abbastanza per superare la malattia e rimangono protetti per tutta la vita.

Tuttavia, tali condizioni raramente si presentano, poichè la stabilità può essere turbata da numerose eventi, quali condizioni climatiche o prescrizioni legislative come l'uso discontinuo di acaricidi. Pertanto, quando si verifica l'instabilità enzootica, e la popolazione di zecche infette diminuisce, i bovini possono non ricevere una naturale inoculazione di parassiti *Babesia* prima di raggiungere un'età più avanzata e in tal caso possono sviluppare sintomi della malattia molto severi, a volte fatali. Il monitoraggio periodico dei titoli anticorpali contro *B.bigemina* negli allevamenti di queste regioni consente di valutare il loro livello di protezione.

Vaccini

Vari sono stati i tentativi indirizzati alla messa a punto di un vaccino contro i patogeni responsabili della babesiosi bovina. I primi tentativi in tal senso si ebbero in seguito all'osservazione che gli animali che avevano superato un'infezione causata da tali piroplasmidi, risultavano essere efficacemente protetti dalla reinfezione (de Waal and Combrink, 2006). È stato inoltre notato che se tali bovini venivano utilizzati come donatori di sangue per bovini non infetti, questi ultimi non sviluppavano i segni clinici più severi della malattia. Nel secolo da poco concluso si è affinata la tecnica del “bovino donatore” sostituendola all'utilizzo di un vaccino costituito da un ceppo attenuato del parassita. Sebbene in alcuni Paesi del mondo tale vaccino sia ancora in uso, come accade in tutti i casi di utilizzo di vaccini vivi attenuati, anche questo ceppo continua a mostrare reversione verso il *wild type*, divenendo causa di fenomeni di epidemie localizzate. Inoltre i metodi di produzione del vaccino prevedono che il parassita sia fatto riprodurre in colture cellulari di eritrociti di bovino, per mantenere le quali è necessario prelevare eritrociti non infetti e siero da due bovini differenti. Tali pratiche purtroppo non sono prive di rischio, dal momento che i bovini potrebbero essere portatori di altri microrganismi che verrebbero trasmessi insieme all'inoculo del vaccino. Sebbene i vaccini attenuati risultano efficaci, essi presentano numerosi problemi. Tra essi il principale è rappresentato dalla possibilità di cotrasmissione di altri agenti patogeni. Pertanto, numerosi studi sono indirizzati allo sviluppo di differenti metodiche. Eritrociti infetti con i parassiti *B.bovis*, *B.bigemina* e *B.major* irradiati sono stati utilizzati per prevenire la parassitemia ma non risultano pienamente efficaci (Palmer *et al.*, 1995). Inoltre, il confronto tra ceppi attenuati e virulenti ha permesso di comprendere alcuni processi della malattia e di identificare alcuni fattori chiave coinvolti. Studi indirizzati alla messa a punto di vaccini contro varie specie di *Babesia* hanno contribuito a far luce su alcuni meccanismi del sistema immunitario attuati in risposta al processo di infezione.

La ricerca di vaccini ricombinanti è stata indirizzata verso lo studio dei principali antigeni di superficie del patogeno. In particolare, le proteine del complesso apicale risultano di particolare interesse per il loro ruolo nel processo di invasione cellulare. Antigeni ottenuti a partire da tali proteine hanno mostrato l'induzione di una risposta immunitaria che potrebbe risultare sufficiente per la protezione dell'ospite. Numerosi candidati vaccinali sono stati identificati nelle diverse specie di *Babesia*, tra cui le proteine associate al rostro (RAP), che sono codificate da una famiglia multigenica

(Palmer *et al.*, 1995). RAP-1 sia di *B.bovis* che di *B.bigemina* è altamente immunogenica per le cellule B e T (Brown *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1996), inducendo una risposta immunitaria di tipo Th1 nelle cellule T helper, in grado di indurre un'immunità parzialmente protettiva nei confronti della malattia. Tuttavia, la presenza di specifici anticorpi anti-RAP-1 non correla del tutto con il livello di immunità determinato (Ushe *et al.*, 1994), implicando un ruolo più elaborato per le cellule CD4⁺ T. I meccanismi effettori responsabili della protezione immunitaria necessitano di ulteriori delucidazioni in modo da selezionare un appropriato sistema di presentazione dell'antigene. Naturalmente ancora numerosi sono gli aspetti del ciclo cellulare e del processo di infezione della *Babesia* che devono essere approfonditi in vista dello sviluppo di vaccini. Un vaccino a subunità contro la babesiosi bovina, senza gli svantaggi di vaccini vivi, porterebbe un beneficio importante per gli allevatori di bestiame delle regioni tropicali e subtropicali.

Un vaccino a base di proteine ricombinanti espresse in batteri è di costruzione relativamente semplice, e il processo può essere facilmente esteso su larga scala. Questo tipo di vaccini sarebbe più sicuro e avrebbe ulteriori vantaggi, quali la commercializzazione in forma liofilizzata, con una conseguente diminuzione dei costi e semplicità di distribuzione. Secondo gli studi sulla risposta immunitaria di bovini alle infezioni ad opera di *B.bovis* e *B.bigemina*, i vaccini dovrebbero suscitare sia la produzione di anticorpi opsonizzanti sia l'attivazione di cellule T CD4⁺ (Brow and Palmer, 1999). La strategia di sviluppo di un vaccino a subunità è stata esplorata per il parassita Apicomplexa correlato *Theileria parva* con risultati promettenti. La vaccinazione dei bovini con forme ricombinanti dell'antigene di superficie dello sporozoita p67 ha significativamente ridotto lo sviluppo della febbre East Coast dopo l'infezione naturale da parte della zecca in Kenya (Musoke *et al.*, 2005). Anche nel caso di *B.divergens*, una forma ricombinante dell'antigene Bd37 era in grado di proteggere i gerbilli, utilizzati come modello sperimentale, dall'infezione con diversi ceppi virulenti (Hadj-Kaddour *et al.*, 2007). Una strategia razionale nella ricerca di vaccini candidati consiste nell'individuare proteine rilevanti da un punto di vista fisiologico o funzionale per il patogeno, cioè quelle che partecipano a fasi critiche del ciclo di vita parassita, come l'invasione degli eritrociti bovini da merozoiti. Questo processo comporta meccanismi di riconoscimento e di attaccamento che portano all'internalizzazione del parassita all'interno degli eritrociti. Molecole di superficie del parassita svolgono un ruolo importante in questo processo e costituiscono quindi candidati vaccinali

interessanti, dal momento che la loro funzione è fondamentale per la sopravvivenza. Inoltre, a causa della loro localizzazione, le proteine di superficie sono facilmente riconoscibili dalla risposta immunitaria dell'ospite.

1.8 *Babesia bigemina*

Babesia bigemina è stata identificata da Smith e Kilbourne nel 1983 come patogeno dei vertebrati trasmesso da artropodi. *B. bigemina* è in grado di infettare gli eritrociti dei bovini per mezzo della zecca *Rhipicephalus* spp. (fam. Ixodidae). Fu inizialmente classificata come agente eziologico della “Febbre del Texas” e denominata “Pirosooma” (Smith and Kilbourne, 1983).

B. bigemina è un parassita intraeritrocitario in grado di infettare l'eritrocita del bovino evolvendo all'interno di tale cellula in una forma detta trofozoita (Figura 5). I trofozoiti si dividono per scissione binaria in due strutture rotondeggianti, che assumono successivamente aspetto piriforme, da cui il nome attribuito all'ordine. Tali forme sono dette merozoiti e, quando giungono a maturità, fuoriescono dall'eritrocita lisandolo. Ciascuno dei due merozoiti è in grado di invadere un altro eritrocita. Durante il pasto di sangue una zecca può assumere gli eritrociti infetti. La gametogenesi e la formazione dello zigote avvengono nel lume intestinale dell'artropode. I gameti ivi rilasciati si fondono dando origine allo zigote il quale ha capacità invasive, penetra nelle cellule intestinali della zecca e lì procede nel suo sviluppo, dando origine ad un cinete. Il cinete fuoriesce dall'enterocita della zecca sul versante opposto rispetto al lume intestinale e si ritrova libero nell'emolinfa, tramite la quale invade tutti i tessuti della zecca, incluse le ovaie e gli oociti. Dunque la larva che si svilupperà dall'uovo risulterà infetta. Quando tale larva si nutrirà in un bovino, le variazioni delle condizioni ambientali, quali la temperatura, causeranno la migrazione dei cineti nelle ghiandole salivari della larva. Una volta che il parassita giunge agli acini ghiandolari, si sviluppa in essi una forma multinucleata e indifferenziata chiamata sporoblasto. Da esso fuoriescono sporozoiti che vengono rilasciati nel torrente circolatorio del bovino dove evolvono nuovamente in trofozoiti in grado di infettare gli eritrociti dell'ospite (Homer *et al.*, 2000a). Studi effettuati presso il Centro di Referenza Nazionale per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria* (Torina and Caracappa, 2007) hanno dimostrato la presenza tanto del parassita quanto del vettore anche nella penisola italiana, e i dati sulla sua diffusione sono preoccupanti. Inoltre è ragionevole supporre che le variazioni climatiche che si stanno verificando negli ultimi anni comportino una estensione verso Nord dei territori in cui la

zecca vettore trova il microclima ideale per la sua moltiplicazione, espandendo così le aree endemiche per il parassita.

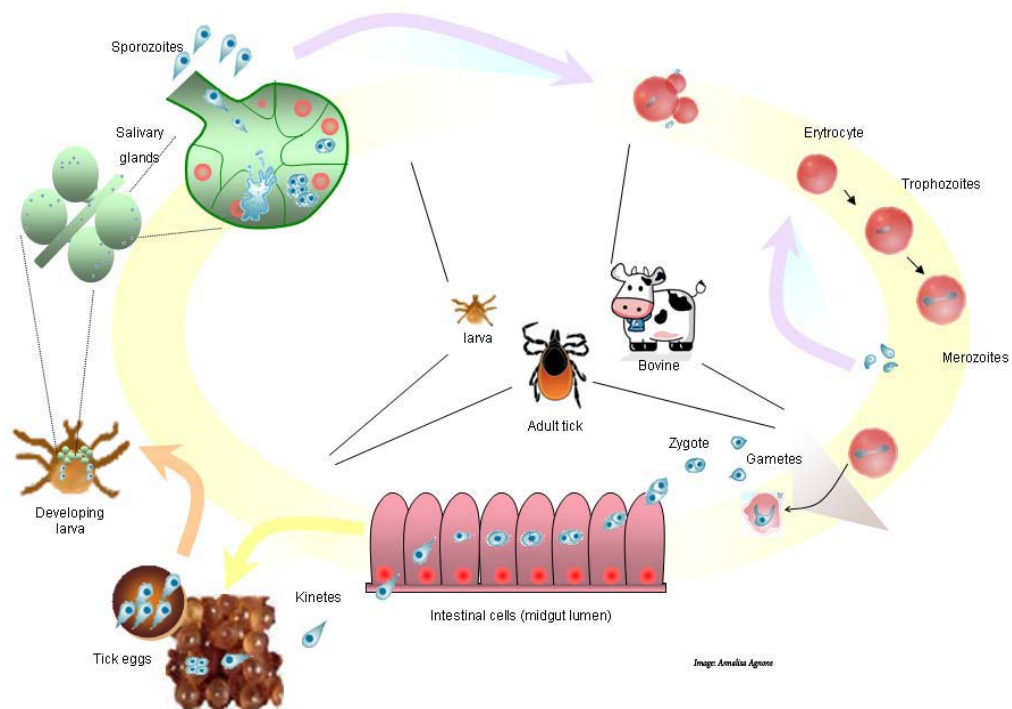


Figura 5. Ciclo vitale di *Babesia bigemina*. Immagine presentata al convegno internazionale STVM, Lübeck Germania (Torina *et al.*, 2009).

1.9 Fasi dell'invasione dell'eritrocita

Numerose omologie sono state osservate tra i generi *Babesia* e *Plasmodium*. In particolare *Plasmodium falciparum*, molto studiato in quanto costituisce uno dei principali agenti responsabili della malaria, condivide con *Babesia* diverse proteine implicate nella fase di infezione dell'eritrocita. Il processo di invasione è inoltre estremamente simile a quello attuato dal Piroplasma strettamente correlato *Babesia bovis* (Yokoyama *et al.*, 2006). Soltanto alcune delle molecole di superficie che hanno un ruolo nell'invasione dell'eritrocita da parte di *B.bigemina* sono state caratterizzate. In tal modo sono stati definiti alcuni degli antigeni che agiscono in ciascuno degli stadi del processo. Di seguito sono elencati gli stadi principali del processo di invasione dell'eritrocita da parte del parassita e sono descritte alcune delle proteine coinvolte (Figura 6).

1) **Attacco:** il merozoita del parassita entra in contatto con la cellula ospite. Durante questo stadio, una serie di fattori risulta essere coinvolta, tra cui le proteine GP45 e

GP55. GP45 è una proteina di membrana, legata ad essa tramite un’ancora di Glico-Fosfatidil Inositolo (Carcy *et al.*, 2006).

2) **Ri-orientamento**: il merozoita riorienta la sua posizione nei confronti del globulo rosso, in modo che i propri organelli risultino in posizione perpendicolare alla membrana del globulo rosso. In funzione di dati ottenuti dallo studio su *Plasmodium* (Gaffar *et al.*, 2004a) e di *B. bovis*, sembra che durante il ri-orientamento agiscano proteine identificate come **TRAP** (*Thrombospondin-Related Anonymous Protein*). Tali proteine sono rilasciate dai micronemi, organelli del complesso apicale che secernono il loro contenuto sulla superficie dello sporozoita e che sembrano coinvolti nel riconoscimento e nel legame della cellula bersaglio.

3) **Formazione delle tight junctions**: il parassita riversa gli enzimi litici contenuti nei propri organelli e si prepara allo stadio successivo. La formazione delle *tight junctions* fra il parassita e l'eritrocita è tuttora controversa. In *Plasmodium* le proteine coinvolte in questa fase di penetrazione sono le proteine AMA - *Apical Membrane Antigen* (Gaffar *et al.*, 2004b). Pare che tali proteine siano rilasciate dai micronemi.

4) **Invasione**: il merozoita del parassita penetra nella cellula ospite. Durante questa fase agiscono le proteine RAP (*Rhoptry-Associated Protein*).

5) **Internalizzazione**: Il parassita invade la cellula ospite con formazione di un vacuolo la cui membrana, dopo un breve periodo di tempo, va incontro a disgregazione liberando il parassita nel citoplasma del globulo rosso. Attualmente si ritiene (Hines *et al.*, 1995) che nell’ultimo stadio agiscano le proteine **SBPs** (*Spherical Body Proteins*).

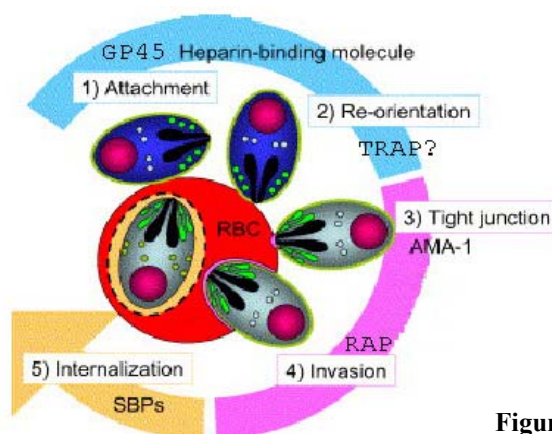


Figura 6: Immagine modificata da Yokoyama *et al.*, 2006.

Oggi la ricerca è rivolta allo studio di *Babesia bigemina* dal punto di vista molecolare, al fine di individuare e studiare le molecole di superficie che non solo inducano nel bovino uno stimolo antigenico, ma che, affinché il vaccino sia efficace su ampia scala, siano sufficientemente conservate e quindi efficaci contro l'infezione da parte di qualsiasi ceppo. La produzione di vaccini contro il parassita è ostacolata da un certo polimorfismo in alcune proteine del parassita, in particolare in quelle espresse sulla superficie del parassita.

1.10 Gli antigeni di superficie

Le molecole potenzialmente implicate nell'invasione dell'eritrocita sono numerose, tuttavia in *B.bigemina* solo alcune sono state caratterizzate. Di seguito sono descritte brevemente alcune di esse, oggetto del presente studio.

- **Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1).** L'Antigene Apicale di Membrana (AMA-1) è una proteina a localizzazione apicale presente in numerosi organismi Apicomplexa. Tali proteine esibiscono caratteristiche comuni in ragione delle quali sono state incluse all'interno di una famiglia (AMA-1): sono accomunate dalla presenza di un peptide segnale che ne determina la localizzazione alla membrana del parassita, da un'elica transmembrana (TM) e da ponti disolfuro che suddividono le stesse in domini funzionali. I membri della famiglia AMA-1 hanno un ruolo nel processo di invasione cellulare dei globuli rossi e sono state studiate con grande interesse in vista di una loro possibile inclusione in un vaccino a subunità.

La proteina Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) è stata intensamente studiata e caratterizzata in *Plasmodium falciparum* (PfAMA) dal momento che, tra i pochi candidati vaccinali antimalarici in via di sviluppo, essa costituisce uno dei più promettenti fra quelli che agiscono nella fase eritrocitaria. (Latitha *et al.*, 2008). Studi basati su peptidi sintetici di PfAMA-1 hanno mostrato che essi sono in grado di innescare una risposta immunitaria specifica in soggetti naturalmente esposti al parassita della malaria (Lal, 1996). PfAMA-1 è una proteina di 622 residui avente un peso molecolare di 83 KDa e tre domini principali delimitati da otto legami disolfuro (Escalante *et al.*, 2001; Hodder *et al.*, 1996). Tale proteina è localizzata nei micronemi all'estremità apicale del merozoita, lo stadio del parassita in grado di infettare gli eritrociti. Questo precursore viene sottoposto a taglio proteolitico e forma una proteina di 66 KDa che trasloca dai micronemi alla superficie dei merozoiti dove si ritiene abbia

un ruolo nella fase di riorientamento del merozoita rispetto all'eritrocita. Anticorpi monoclonali e policlonali diretti contro PfAMA-1 sono in grado di inibire l'invasione degli eritrociti *in vitro*, mentre vi è una buona evidenza dell'efficacia in modelli animali di PfAMA-1 come candidato vaccinale (Deans *et al.*, 1988; Crewther *et al.*, 1996). Vari studi hanno mostrato che anticorpi diretti contro PfAMA-1 hanno un importante ruolo nell'immunità protettiva in adulti che vivono in zone endemiche della malaria (Hodder *et al.*, 2001). Analisi condotte sia a livello del proteoma che del trascrittoma (LeRoch *et al.*, 2003) indicano che PfAMA-1 è espresso non solo dai merozoiti, ma anche dagli sporozoiti, stimolando ricerche volte a dimostrare che anticorpi diretti verso tale antigene possono prevenire non solo l'invasione degli eritrociti ma anche l'infezione degli epatociti (Silvie *et al.*, 2004). Inoltre è stato riportato che tale antigene è in grado di stimolare sia l'immunità umorale che cellulo-mediata (Spring *et al.*, 2009). Nel 2004, Eric de Vries e colleghi (Gaffar *et al.*, 2004b) sono riusciti a identificare e caratterizzare la proteina AMA-1 di *B. bovis* (BbAMA-1), codificata da una sequenza di 1.818 bp e con un peso molecolare di 67.2KDa. Antisieri diretti contro peptidi derivanti da BbAMA-1 riducono *in vitro* in modo specifico l'efficienza dell'invasione di *B. bovis*, indicando che AMA-1 è in effetti localizzato sulla superficie del merozoita ed è accessibile agli anticorpi (Gaffar *et al.*, 2004b). Recentemente nel genoma di *B. bigemina* è stata evidenziata una regione con elevata omologia a quella codificante la proteina AMA-1 presente negli altri Apicomplexa (Mosqueda *et al.*, 2007). Così come avviene in numerosi altri Apicomplexa, si ritiene che la proteina AMA-1 svolga un ruolo cruciale nell'invasione degli eritrociti anche da parte del parassita *Babesia bigemina* (Yokoyama, 2006).

- **Rhoptry-associated protein-1 (Rap-1)**. Tra i più importanti candidati per lo sviluppo di vaccini contro la babesiosi bovina vengono considerate le proteine del rostro della famiglia **rap-1**. La famiglia genica rap-1 (rhoptry-associated protein-1), inizialmente descritta in *B. bovis* e *B. bigemina*, è stata evidenziata in tutte le specie di *Babesia* esaminate. L'immunizzazione di bovini con la proteina RAP-1 α 1 di *B. bigemina* purificata induce protezione dall'infezione e anticorpi monoclonali contro RAP-1 di *B. bigemina* inibiscono l'invasione da parte dei merozoiti del parassita (Ushe *et al.*, 1994). Le caratteristiche molecolari della famiglia delle proteine RAP-1 includono la presenza di un peptide segnale, la conservazione di 4 cisteine, un motivo di 14 aminoacidi e numerosi motivi più corti nei primi 300 aminoacidi della molecola. La

struttura del *locus* e il numero di copie è invece variabile tra le diverse specie di *Babesia*. In *Babesia bigemina* il *locus* dei geni *rap-1* contiene cinque copie del gene *rap-1a* (Figura 7), separate da regioni intergeniche (IG) di 3.38 Kb ciascuna delle quali contiene una copia identica di un gene correlato chiamato *rap-1b*. Una copia addizionale del gene *rap-1b* è presente all'estremità 3' del *locus* insieme ad una copia di un ulteriore gene correlato, *rap-1c*. Studi condotti per verificare se i prodotti di tutti questi geni fossero co-espressi hanno mostrato che il gene *rap-1a* produce il livello di messaggero più elevato, mentre il gene *rap-1b* presenta, nonostante l'elevato numero di copie, la quantità di trascritto meno abbondante (Suarez *et al.*, 2003).

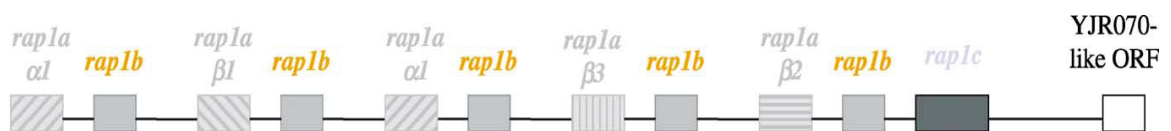


Figura 7. Schematizzazione del locus *rap-1* di *Babesia bigemina* (Immagine tratta da Suarez *et al.*, 2003).

- **GP45.** Antigeni di superficie ancorati alla membrana tramite un'ancora di Glicosilfosfatidil inositolo (GPI-anchor MSA) hanno un importante ruolo nel processo di invasione dell'eritrocita dell'ospite da parte del parassita *Babesia*. A causa della loro funzione essenziale per la sopravvivenza del parassita, tali proteine costituiscono potenziali candidati per lo sviluppo di vaccini contro la babesiosi. A tali proteine appartengono gli antigeni variabili MSA di *Babesia bovis* (vMSA – variable merozoite surface antigen), le proteine di *Babesia bigemina* gp45 e gp55 e l'antigene Bd37 di *Babesia divergens*, agenti eziologici della babesiosi bovina, e Bc28 di *Babesia canis*, principale responsabile della babesiosi nel cane. Tali antigeni tuttavia presentano un certo grado di polimorfismo che consente al parassita di evadere la risposta immunitaria dell'ospite (Carcy *at al.*, 2006). Gp45 è una glicoproteina di 45 kDa legata alla membrana di *Babesia bigemina* attraverso un'ancora di GPI avente un importante ruolo nella fase iniziale di attacco del parassita alla membrana del globulo rosso del bovino. Il *locus* del genoma di *B. bigemina* sembra contenere una singola copia del gene gp45 mancante di introni (Fischer *et al.*, 2001). Studi hanno mostrato come l'immunizzazione con tale antigene di superficie induca protezione dall'infezione da parte dello stesso ceppo (McElwain *et al.*, 1991).

- **SBPs.** Alcune proteine sono rilasciate dal parassita all'interno della cellula ospite durante il processo di invasione al fine di rendere ottimale l'ambiente per il parassita. Tali proteine possono svolgere numerose funzioni e ad esempio agire nella fase della penetrazione, del trasporto o favorire la crescita del parassita. Le specie del genere *Babesia*, a differenza di altri Apicomplexa, non presentano granuli densi, ma un unico organello denominato *spherical body* all'interno del complesso apicale. All'interno di tale struttura è stata evidenziata in *B.bovis* la presenza di tre proteine: spherical body 1 (SBP-1), spherical body 2 (SBP-2) e spherical body 3 (SBP-3). Tali proteine sono rilasciate sul versante citoplasmatico della membrana dei globuli rossi infetti durante il processo dell'invasione (Yokoyama *et al.*, 2006). Poco è noto riguardo alla presenza di proteine SBP in *B.bigemina*, ma alcuni studi condotti in precedenza suggerivano la presenza in *Babesia bigemina* di una proteina con un certo grado di similarità a SBP-1 di *B.bovis*.

2. OBIETTIVI

Il presente studio, condotto in collaborazione con il Centro di Referenza per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria* (C.R.A.Ba.R.T), diretto dalla Dottoressa Alessandra Torina, presso l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, ha riguardato la caratterizzazione molecolare di ceppi di *B.bigemina* ottenuti da bovini infetti, al fine di studiarne differenze e omologie, con particolare attenzione ai geni codificanti per gli antigeni di superficie. Il progetto è stato rivolto inoltre all’ottimizzazione di test diagnostici basati sulla Real Time PCR e allo studio della loro efficacia rispetto ad altri potenziali strumenti diagnostici già a disposizione.

Lo studio svolto durante il periodo di Dottorato è stato, in particolare, rivolto al conseguimento dei seguenti obiettivi:

- a) Raccolta, conservazione e analisi di campioni di zecca e di siero e sangue provenienti da bovini naturalmente infettati dai parassiti *B.bigemina*.
- b) Ottimizzazione di test diagnostici basati sulla Real Time PCR.
- c) Studio dei geni codificanti per alcuni degli antigeni di superficie dei parassiti. In particolare le analisi hanno riguardato i geni codificanti per le proteine AMA-1, RAP1, GP45 e SBP-1.
- d) Clonaggio di geni codificanti le proteine AMA-1 ed SBP-1 in vettori di espressione procariotici per consentire la sintesi delle corrispondenti proteine in *E.coli*.
- e) Espressione e purificazione delle proteine corrispondenti;
- f) Studio delle proprietà antigeniche di queste proteine mediante l’allestimento di test ELISA.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Estrazione del DNA.

Il DNA genomico è stato estratto a partire da campioni di zecca e da campioni di sangue o tessuto di bovini naturalmente infetti utilizzando il PureLink Genomic Mini kit (Invitrogen). Il protocollo prevede la lisi delle cellule presenti nel campione di sangue a 55°C per 10' mediante aggiunta dell'opportuno “buffer di lisi/legame alla membrana” e Proteinasi K (20mg/ml). In caso di campione di tessuto o di zecca, viene eseguita prima la digestione del campione a 55°C per due ore o per l'intera notte rispettivamente, mediante aggiunta di buffer di digestione e Proteinasi K. Segue la lisi cellulare per aggiunta al campione del “buffer di lisi/legame alla membrana”. Ai campioni (sangue, tessuti o zecche) viene poi aggiunto etanolo e si procede con il trasferimento degli stessi su colonnina con membrana di silice. Dopo l'esecuzione di due lavaggi con gli opportuni buffer, il DNA viene eluito dalla membrana mediante aggiunta di TE (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA), incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugazione per 1 minuto a 13,000 × g.

In questa fase si è cercato di ottimizzare le procedure di estrazione del DNA dei campioni, modificando il protocollo di estrazione finora in uso presso il CraBART. In particolare sono stati esaminati gli effetti sulla resa determinati dalle seguenti variazioni:

- Al fine di arricchire il campione di sangue della fase eritrocitaria, si è lasciato che gli eritrociti sedimentassero per gravità al fondo della provetta prima di prelevare l'idonea quantità di materiale direttamente dal sedimento.
- Sono stati provati tempi di incubazione a temperatura ambiente più lunghi rispetto ai 5' del protocollo iniziale, dopo l'aggiunta di TE, prima di procedere con la tappa di centrifugazione finale.

3.2 PCR di screening per l'identificazione dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis*.

Il DNA, proveniente tanto da zecche che da tessuti, sangue intero o frazione eritrocitaria, è stato saggiato tramite PCR utilizzando la tecnica descritta in *Figueroa et al, (1993)*, che amplifica sequenze ribosomiali specifiche di questo patogeno, al fine di rintracciare l'eventuale presenza del parassita. In ciascuna reazione è stato utilizzato un controllo positivo, costituito dal DNA estratto a partire da un bovino infetto, e un controllo negativo, in cui il DNA era sostituito dall'aggiunta di acqua distillata sterile.

3.3 Ottimizzazione di un saggio di Real Time PCR con il metodo SYBR Green per il rilevamento dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis*.

I plasmidi pGEM- T Easy Vector contenenti come inserto i frammenti del gene del citocromo b di *B.bigemina* e *B.bovis*, ottenuti come descritto in Materiali e Metodi sezione *Amplificazione e clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pGEM T-easy vector per la costruzione degli standard delle Real Time PCR*, sono stati quantizzati mediante analisi al Nanodrop 200 (Thermo Scientific) e al Qubit (Invitrogen). Sulla base delle dimensioni del plasmide e della corrispondente massa, sono state effettuate diluizioni seriali 1:10 fino ad ottenere una serie di standard tale da coprire un intervallo da 10 a 10⁶ copie di DNA plasmidico/μl.

Aliquote di tali diluizioni sono state conservate a -20°C e scongelate solo una volta per essere utilizzate come standard.

Le reazioni di SYBR Green Real Time PCR per il rilevamento dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis* sono state eseguite utilizzando rispettivamente i primers Bbig For/Bbig Rev e Bbov For/Bbov Rev, riportati in Tabella 1 (Buling *et al.*, 2007). Le reazioni sono state condotte su un termociclatore 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizzando la iTaq SYBR Green Supermix con aggiunta del riferimento interno passivo ROX (Biorad) che consente la normalizzazione del segnale. Al fine di ottimizzare il saggio sono state testate diverse temperature di annealing (58°C, 60 °C e 62°C) e diverse concentrazioni di primers (0.25, 0.5 e 0.8 μM). Ciascuna reazione è stata condotta in un volume finale di 20 μl, comprendenti comprendente 10 μl di iTaq SYBR Green Supermix, ciascun primer ad una delle diverse concentrazioni testate, 3-8 μl di acqua distillata sterile, 3 μl di DNA stampo. La reazione è stata condotta in duplicato per ciascuno standard e ciascun campione; in ciascun esperimento è stato incluso almeno un campione in cui acqua distillata sterile era aggiunta al posto del DNA (no-template control). Il protocollo termico prevedeva: una fase di denaturazione iniziale a 95 °C per 15 secondi, seguito da 40 cicli comprendenti ciascuno una fase a 95 °C per 15 secondi e una fase di annealing/allungamento per 1 minuto. L'incremento nel segnale di fluorescenza è stato registrato durante la fase di polimerizzazione della reazione e i dati sono stati analizzati attraverso il software 7300 SDS Software v 1.4.

Saggio	Primers	Dimensioni amplificato	T _m (°C)
<i>B.bigemina</i> Green qPCR	SYBR Bbig For: 5'-tggtccaggagatgttgattc-3'	88 bp	55.9
	Bbig Rev: 5'-agcatggaataacgaagtgc-3'		55.9
<i>B.bovis</i> Green qPCR	SYBR Bbov For: 5'-tggtctggaagcgttgattc-3'	88 bp	57.9
	Bbov Rev: 5'-agcgtgaaataacgcattgc-3'		55.9

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati per la Real Time PCR per *B.bigemina* e *B.bovis* secondo il metodo SYBR Green (Buling *et al.*, 2007).

3.4 Ottimizzazione di un saggio di Real Time PCR con il metodo TaqMan per il rilevamento dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis*.

I plasmidi pGEM-T Easy Vector contenenti come inserto i frammenti del gene del citocromo b di *B.bigemina* e *B.bovis* quantizzati e diluiti come descritto in precedenza sono stati utilizzati come standard nella reazione di Real Time PCR condotta secondo il metodo TaqMan utilizzando i primers e le sonde descritte in Criado-fornelio *et al.* (2009) e riportate in Tabella 2. Si è proceduto con l'ottimizzazione di un saggio di Real Time PCR secondo il metodo TaqMan in quanto tale metodica risulta estremamente utile in ambito diagnostico. Essa, basandosi sull'appaiamento di una sonda alla sequenza bersaglio, è in grado di assicurare una maggiore specificità e un minore rumore di fluorescenza di fondo, consentendo così una più sicura diagnosi anche dei campioni debolmente positivi.

Saggio	Primers	Dimensioni amplificato	T _m (°C)	Sonda
<i>B.bigemina</i> TaqMan qPCR	PSOBI-2b 5'- cccaacctatattaacctcagt-3'	70 bp	54.0	5'- FAM- cgaatgtgttatcagagtat- 3' TAMRA
	PSOBI-1b 5'- ttatgtccaggagatgttga-5'		54.0	
<i>B.bovis</i> TaqMan qPCR	PSOBO-1 5'- tggtctggaagcgttgattc-3'	70 bp	57.9	5' VIC- tgaatgtgtaattagagtgc -3' TAMRA
	PSOBO-2b 5'-ccaacctatattgacttcage-3'		57.9	

Tabella 2. Sequenze dei primers e delle sonde utilizzati per la Real Time PCR per *B.bigemina* e *B.bovis* secondo il metodo TaqMan (Criado-Fornelio *et al.*, 2009).

Le reazioni sono state condotte su un termociclatore CFX96 Biorad utilizzando la TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) con ROX. Al fine di ottimizzare il saggio sono state testate diverse temperature di annealing (58°C, 60 °C e 62°C) e diverse concentrazioni di primers (0.25, 0.5 e 0.8 µM). Ciascuna reazione è stata condotta in un volume finale di 20 µl, comprendenti 10 µl di TaqMan Master Mix,

ciascun primer ad una delle diverse concentrazioni testate, 3-8 μ l di acqua distillata, 3 μ l di DNA stampo. La reazione è stata condotta in duplicato per ciascuno standard e ciascun campione; in ciascun esperimento è stato incluso almeno un campione in cui acqua era aggiunta al posto del DNA (no-template control). Il protocollo termico prevedeva: una fase di denaturazione iniziale a 95 °C per 15 secondi, seguito da 40 cicli comprendenti ciascuno una fase a 95 °C per 15 secondi e una fase di annealing/allungamento per 1 minuto. L’incremento nel segnale di fluorescenza è stato registrato durante la fase di polimerizzazione della reazione e i dati sono stati analizzati attraverso il software CFX Manager 1.6.

3.5 Amplificazione delle regioni codificanti per alcuni antigeni di superficie di *B.bigemina*.

Sono state amplificate le regioni codificanti per gli antigeni di superficie di *B.bigemina* AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1), GP45 (Glicoprotein 45 kDa), Rap-1b (Roptry associated protein 1 b) ed Sbp-1 (spherical body protein 1) al fine di consentire l’inserimento dei corrispondenti prodotti di amplificazione nel vettore pCR2.1 TOPO TA (vedi oltre). Le coppie di primers utilizzate sono riportate in Tabella 3.

Gene bersaglio	Primer	Sequenza	Dimensioni amplificato	Tm (°C)
Ama-1	AMA-1Fb	5'-GCAGTGCATATTGAATAGGAT TAC-3'	1788 bp	57.6
	AMA-1Rb	5'-TCAGTTGAGCTTAGTCAGGTGTACTG-3'		63.2
	AMA-1intF	5'- GTG CTC TTA CAA AGG CAG GC-3'	732 bp	59.4
	AMA-1intR	5'- CGT TGA TGA TGA GGC AGG TAG -3'		59.8
Gp45	GP45F	5'- GCACCTGCAAAGCAATGTAGC - 3'	1 Kb	59.8
	GP45R	5'- CGCAGTTGATCGCGTGTC -3'		58.2
Rap-1b	Rap-1bF	5'-ATGATGGCACCTGTTTTGAAG -3'	1 Kb	62.0
	Rap-1bR	5'-GGCGGCGTCCTCTGTTTTGC -3'		63.1
SBP	Bv80aF	5'-CGT TGT CTA CCC TCT CGG AAA C-3'	1.1 Kb	62.0
	Bv80aR	5'-CTC GCC AAG GAT CAA ATG GT-3'		61.0

Tabella 3. Sequenze dei primers utilizzati per le PCR descritte nel testo.

La coppia di primers AMA-1intF e AMA-1intR, che si appaiano a sequenze più interne del gene Ama-1, è stata utilizzata per il sequenziamento dell’intero gene in quanto è stato necessario adottare la tecnica del primer walking. Per consentire l’inserimento direzionale delle regioni codificanti le proteina AMA-1, Rap-1b e SBP nel vettore

d'espressione pET160/GW/D-TOPO sono state disegnate le coppie di primers riportate in Tabella 4.

Primer	Sequenza	Dimensioni amplificato	Tann
Ama160FnoSP	5' – CACCGCCTTCGTGACCTTC -3'		50.0
Ama160RevStop	5'- TCACTTCTTCACGTTGTGCGAGCA-3'	1698 pb	52.2
Ama160Rev3TM	5'- TCAAACCGCAGCCTTCTTCAC-3'	1455 pb	59.8
SBP1-160F	5'- CACCATGTCCAAATCCGTATCA-3'	1.1Kb	58.4
SBP1-160R	5'- CTACGATTCTGAAGTGGT-3'		51.4

Tabella 4. Sequenze dei primers disegnati per il trasferimento direzionale dei geni AMA-1 ed Sbp-1 nel vettore d'espressione pET160/GW/D-TOPO.

Per il trasferimento del prodotto di amplificazione all'interno del vettore d'espressione pET160/GW/D-TOPO (vedi oltre), il primer forward di ciascuna delle sequenze contiene al 5' la sequenza CACC necessaria per l'inserimento nel vettore, il primer reverse termina con il codone di stop. Nel caso di SBP, i primers amplificano l'intera ORF. Per quanto riguarda AMA-1, invece, il primer forward si appaia immediatamente a valle della sequenza codificante il peptide segnale. Il primer reverse inizialmente utilizzato (Ama160RevStop), terminante con il codone di stop naturale della proteina, è stato in seguito sostituito con il primer Ama160Rev3TM che si appaia alla regione immediatamente a monte della regione codificante per l'elica transmembrana, in modo da abbassare l'idrofobicità della proteina. Le amplificazioni sono state eseguite direttamente a partire dal DNA genomico. Oltre alle appropriate quantità di stampo, la miscela di reazione comprendeva 1/5 del volume finale del Buffer di reazione 5X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, i due primers, forward e reverse, alla concentrazione 0.4 μM, 0.025U/μl di Taq Polimerasi (5U/μl, Promega). Il protocollo termico comprendeva 10 minuti a 95°C, 35 cicli costituiti ciascuno da 1 minuto a 95°C, 30 secondi alla corretta temperatura di annealing per ciascuna coppia di primers e 1 minuto a 72 °C ed infine una fase di allungamento di 10 minuti a 72°C.

3.6 Clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pCR2.1 TOPO TA.

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati mediante il Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice e sono stati clonati nel vettore pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen, Figura 8). Il vettore, fornito in

forma lineare, presenta una Timina protruding in ciascuna estremità 3' in modo da permettere il clonaggio TA dei prodotti di PCR. Inoltre al vettore è legata covalentemente la Topoisomerasi I di virus *Vaccinia* (Figura 9). Il vettore contiene i geni per la resistenza all'ampicillina e alla kanamicina per la selezione in *E.coli* e consente la distinzione bianco/blu delle colonie per in attivazione inserzionale del gene della β -galattosidasi.

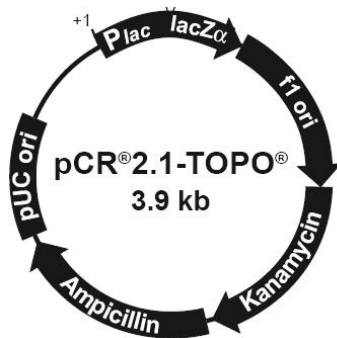


Figura 8. Mappa del vettore pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen).

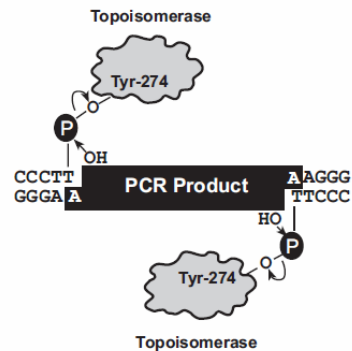


Figura 9. Le estremità 3' del vettore presentano una Timina protruding e la Topoisomerasi legata covalentemente

La miscela di reazione comprendeva 1 μ l dell'appropriata Soluzione Salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 1 μ l di vettore Invitrogen pCR2.1 TOPO TA (10ng/ μ l), le opportune quantità di frammenti di DNA in modo da avere un rapporto molare inserto/vettore di circa 5:1, e la quantità di H₂O necessaria per raggiungere il volume finale di 6 μ l.

La miscela di reazione è stata posta ad incubare 20 minuti a temperatura ambiente. Tre microlitri del prodotto della reazione sono stati utilizzati per trasformare 50 μ l cellule competenti di *E.coli* (Invitrogen, One Shot Top10 Chemically Competent *E.coli*). Tali cellule sono state poste ad incubare prima in ghiaccio per 5 minuti, quindi a 42°C per 30 secondi e infine nuovamente in ghiaccio per 5 minuti. Aggiunti 250 μ l di SOC medium (Invitrogen) preriscaldato a 37 °C, la sospensione cellulare è stata posta ad incubare per 60 minuti a 37°C. Aliquote crescenti di tale sospensione cellulare sono state dunque piastrate su piastre di LB-agar contenenti ampicillina 100 μ g/ μ l e, per la selezione bianco/blu delle colonie, X-gal 2% e IPTG 20%. Le piastre sono state poste ad incubare a 37°C overnight.

3.7 Amplificazione e clonaggio dei prodotti di PCR nel vettore pGEM T-easy vector per la costruzione degli standard delle Real Time PCR.

Per la costruzione dei DNA standard, utilizzati per le reazioni di qPCR sia mediante metodo SYBR Green sia mediante metodo TaqMan, è stata condotta sul DNA estratto a partire da bovini infetti rispettivamente con *B.bigemina* e *B.bovis* una PCR con le coppie di primers riportate in Tabella 5 (Buling *et al.*, 2007), che amplificano una regione di 263 pb del gene codificante per il citocromo b. Le reazioni di amplificazione sono state condotte alle stesse condizioni descritte in precedenza. I prodotti di PCR sono stati purificati mediante il Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice, clonati nel vettore pGEM T-easy vector (Promega, Figura 10) e propagati in cellule competenti JM109 di *E. coli*. Il vettore utilizzato, fornito in forma lineare, presenta una Timina protruding a ciascuna estremità 3' in modo da permettere il clonaggio TA dei prodotti di PCR. Permette la selezione bianco/blu delle colonie per inattivazione inserzionale del gene della β -galattosidasi. Il vettore contiene il gene per la resistenza all'ampicillina per la selezione in *E.coli*

Saggio	Primers	Sequenza	Dimensioni amplificato	Tm (°C)
Amplificazione Cyt b <i>B.big</i>	cybi F	5'- gttccaggagatggtgattc -3'	263 bp	50.7
	cbbR	5'- ctccccagtaactcattgt -5'		51.9
Amplificazione Cyt b <i>B.bovis</i>	cyboF	5'- gttcctggaagcgttgattc -3'	263 bp	54.0
	cbbR	5'- ctccccagtaactcattgt -3'		51.9

Tabella 5. Sequenze dei primers utilizzati per la costruzione degli standard delle Real Time PCR per *B.bigemina* e *B.bovis* (Buling *et al.*, 2007).

La miscela di reazione di ligasi comprendeva 5 μ l dell'appropriata Soluzione Salina 2X, 1 μ l di vettore Promega pGEM T-Easy vector (50ng/ μ l), le opportune quantità di frammenti di DNA in modo da avere un rapporto molare inserto/vettore di circa 5:1, 1 μ l di T4 DNA Ligasi (3 Unità/ μ l) e la quantità di H₂O necessaria per raggiungere il volume finale di 10 μ l. La miscela di reazione è stata posta ad incubare a 4°C overnight. Due microlitri del prodotto della reazione sono stati utilizzati per trasformare 50 μ l cellule competenti di *E.coli* (Promega, JM109). Tali cellule sono state poste ad incubare prima in ghiaccio per 20 minuti, quindi a 42°C per 45 secondi e infine nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Aggiunti 950 μ l di SOC medium (Invitrogen) preriscaldato a 37°C, la sospensione cellulare è stata posta ad incubare per 90 minuti a 37°C con agitazione. Aliquote crescenti di tale sospensione cellulare sono state dunque piastrate

su piastre di LB-agar contenenti ampicillina 100 µg/µl e, per la selezione bianco/blu delle colonie, X-gal 2% e IPTG 20%. Le piastre sono state poste ad incubare a 37°C overnight.

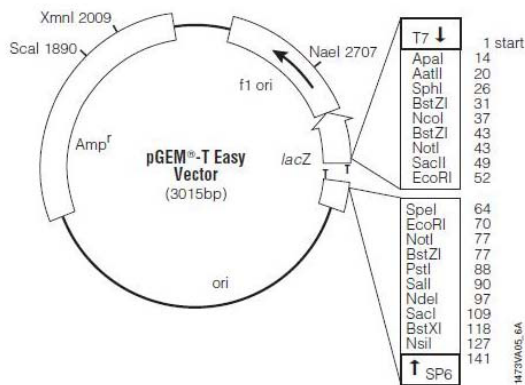


Figura 10. Mappa del vettore pGEM- T Easy Vector.

3.8 Estrazione DNA plasmidico.

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata a partire da cellule batteriche Top10 o JM109 di *E. coli* trasformate prelevate da una singola colonia, inocolata in 5 ml di terreno LB-BROTH contenente Ampicillina 100 µg/µl e lasciata crescere a 37°C overnight con lieve agitazione. Sei colonie bianche sono state scelte a partire da ciascuna miscela di cellule trasformate e da queste è stato estratto il DNA plasmidico utilizzando il sistema di purificazione Wizard SV Minipreps DNA purification system (Promega). Il plasmide ottenuto in questo modo è stato quantizzato, analizzato mediante PCR per verificare la presenza dell'inserto e inviato a Macrogen.Inc per il sequenziamento. Il sequenziamento sia dei frammenti clonati in Topo 2.1 sia di quelli clonati in pGEM- T Easy Vector è stato condotto sia nella direzione forward che reverse utilizzando i primers universali M13F e M13R (Tabella 6), che si appaiano a sequenze presenti sia nel vettore pCR2.1 TOPO TA che nel vettore pGEM- T Easy Vector.

Primer	Sequenza	Tm (°C)
M13F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	53.0
M13R	5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'	53.0

Tabella 6. Sequenze dei primers universali utilizzati per sequenziamento sia dei frammenti clonati in Topo 2.1. sia di quelli clonati in pGEM- T Easy Vector.

Per il sequenziamento dell'intero gene AMA-1 (1788 bp) è stato necessario adottare la tecnica del primer walking, utilizzando i primers AMAIntF e AMAIntR (vedi sopra), che si appaiano a sequenze più interne del gene.

3.9 Elettroforesi su gel d'agarosio.

I gel d'agarosio sono stati preparati sospendendo un'opportuna quantità di agarosio in polvere in tampone TBE (Tris 44.5 mM, Acido Borico 44.5 mM, EDTA 1mM), e aggiungendo Etidio Bromuro 1 µg/ml. La corsa è stata eseguita a voltaggio costante (6 Volt/cm). Per visualizzare il DNA, al termine della corsa, il gel è stato osservato al transilluminatore alla lunghezza d'onda di 254 nm e fotografato mediante fotocamera digitale.

3.10 Analisi delle sequenze.

Le sequenze ottenute sono state allineate utilizzando i software **Bioedit** (Tom Hall, Ibis Biosciences) e **ClustalW2.0.10** (Larkin, 2007). I software **DAMBE** (Xia, 2001; Xia, 2000) e **MEGA** (Kumar, 2008; Tamura, 2007) sono stati usati per calcolare la percentuale di similitudine tra le sequenze analizzate. Tutti i risultati si basano sull'analisi delle sequenze a coppie (Pairwise analysis) e sul metodo del Maximum Composite Likelihood (MEGA 4). Per ottenere informazioni sulle principali caratteristiche fisico-chimiche della proteina (composizione aminoacidica, punto isoelettrico, peso molecolare, indice di instabilità), le sequenze sono state analizzate mediante il software **ProtFarm**, disponibile presso il Server EXPASY Proteomic (Gasteiger, 2003). Ciascuna sequenza aminoacidica è stata inoltre analizzata per individuare la presenza di possibili peptidi segnale utilizzando il software **SignalP** e di possibili eliche transmembrana mediante il software **TMHMM**. È stata ricercata la presenza di possibili epitopi per cellule B mediante il software **Predicting Antigenic Peptides**, disponibile all'indirizzo:

<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>.

La presenza di siti per l'addizione di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) è stata predetta mediante il software disponibile all'indirizzo <http://mendel.imp.ac.at/home/Birgit.Eisenhaber>.

La possibile formazione di legami disolfuro è stata analizzata attraverso il software **DiANNA 1.1** (Ferre and Clote, 2005; Ferre and Clote, 2006), mentre l'omologia funzionale della proteina AMA-1 di *B.bigemina* è stata esaminata mediante ricerca di

domini funzionali conservati all'interno del database di famiglie di proteine **P-Fam** (Finn, 2008). La predizione della struttura tridimensionale delle proteine è stata eseguita utilizzando il software **CPHmodels-3.0**.

3.11 Clonaggio in vettore pET160/GW/D-TOPO (Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology).

È stato individuato nel Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology un valido sistema per il clonaggio direzionale dei prodotti di PCR, l'espressione inducibile della proteina in *E.coli* e l'identificazione specifica attraverso il sistema Lumio.

Il sistema comprende:

1. Il vettore pET160/GW/D-TOPO (Figura 11), che consente l'inserimento direzionale dei prodotti di PCR con estremità piatte per l'espressione regolata in cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*.

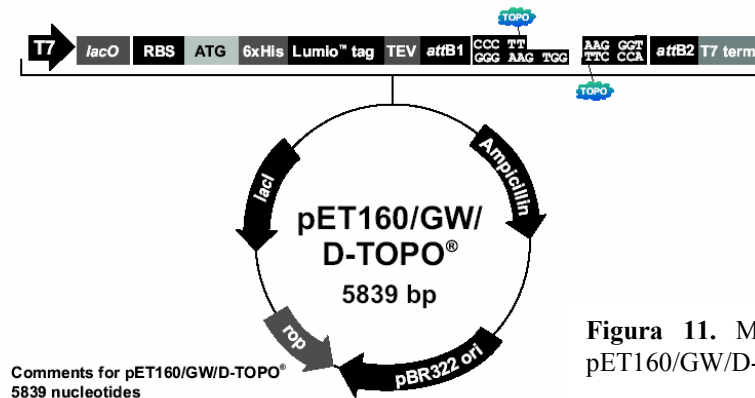


Figura 11. Mappa del vettore pET160/GW/D-TOPO.

Le caratteristiche del vettore pET160/GW/D-TOPO, del cui sito di clonaggio è riportata la mappa in Figura 12, sono:

- Promotore *T7lac* per un'espressione ad alti livelli, IPTG-indotta del gene di interesse in *E.coli* (Dubendorf and Studier, 1991);
- Un sito di clonaggio direzionale per l'inserimento di prodotti di PCR ad estremità piatte. È necessario includere all'estremità 5' del primer forward una sequenza di 4 basi (CACC), essenziale per il clonaggio direzionale;
- Lumio Tag all'N-terminale per la visualizzazione specifica di proteine ricombinanti mediante il Lumio™ Green Detection Kit. Il sistema Lumio è basato sulla tecnologia FLAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin), che utilizza un reagente biarsenicale per legare e marcare proteine con un Lumio tag (Griffin et al., 1998), ossia un dominio

tetracisteinico (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys). Tale dominio mostra un’elevata affinità per i composti biarsenicali che diventano fluorescenti solo in seguito al legame con il dominio tetracisteinico, consentendo la visualizzazione specifica delle proteine di fusione direttamente nel gel;

- 6xHis tag all’N-terminale per la purificazione delle proteine di fusione;
- Sito di riconoscimento per la proteasi TEV per il taglio della sequenza di fusione dalla proteina di interesse.



Figura 12. Mappa del sito di clonaggio del vettore pET160/GW/D-TOPO.

- 2) Il plasmide di espressione controllo pET160-GW/CAT (Figura 13) che presenta il gene per la cloramfenicol-acetiltransferasi (CAT) in associazione con il Lumio Tag. Il peso molecolare della proteina di fusione CAT è di circa 32 kDa.

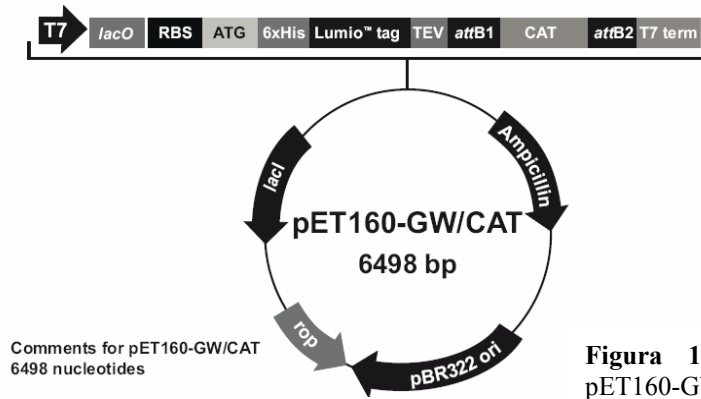


Figura 13. Mappa del vettore pET160-GW/CAT.

Entrambi i vettori contengono il gene per la resistenza all'ampicillina per la selezione in *E.coli*. I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati mediante il Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice e sono stati clonati nel vettore di clonaggio pET160/GW/D-TOPO (Invitrogen). La miscela di reazione comprendeva 1 µl dell'appropriata Soluzione Salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 1 µl di vettore Invitrogen pET160/GW/D-TOPO (10ng/µl), a cui è legata covalentemente la Topoisomerasi I del virus *Vaccinia*, le opportune quantità di frammenti di DNA in modo da avere un rapporto molare inserto/vettore di circa 5:1, e la quantità di H₂O distillata necessaria per raggiungere il volume finale di 6 µl. La miscela di reazione è stata posta ad incubare 20 minuti a temperatura ambiente. Tre microlitri del prodotto della reazione sono stati utilizzati per trasformare 50 µl cellule competenti di *E.coli* (Invitrogen, One Shot Top10 Chemically Competent *E.coli*), secondo il protocollo descritto in precedenza. A partire da cellule batteriche Top10 di *E. coli* trasformate prelevate da una singola colonia, inoculata in 5 ml di terreno LB-BROTH contenente Ampicillina 100 µg/µl e lasciata crescere a 37°C overnight con lieve agitazione, è stato estratto il DNA plasmidico. Il plasmide ottenuto è stato quantizzato, analizzato mediante PCR per verificare la presenza dell'inserto e inviato a Macrogen.Inc per il sequenziamento. Il sequenziamento dei frammenti clonati in tale vettore è stato condotto sia nella direzione forward che reverse utilizzando i primers universali T7F e T7R (Tabella 7), che si appaiano a sequenze presenti nel vettore.

Primer	Sequenza	Tann (°C)
T7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	43.0
T7R	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'	47.0

Tabella 7. Sequenze dei primers universali utilizzati per il sequenziamento dei frammenti clonati in pET160-Gw/D-Topo.

3.12 Trasformazione delle cellule DE3 e saggio di espressione pilota.

Al fine di testare il sistema e di metterne a punto le condizioni ottimali per l'espressione proteica in *E.coli*, le cellule BL21 Star™(DE3) competenti di *E. coli* (Invitrogen) sono state trasformate sia con il plasmide ricombinante pET160/GW/D-TOPO (Invitrogen) sia con il plasmide di espressione controllo pET160-GW/CAT. Sono state utilizzate cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli* in quanto consentono l'espressione del gene di interesse sotto il controllo inducibile di un promotore dipendente dalla T7 RNA polimerasi. Tali cellule, inoltre, a causa della mutazione *rne131*, mancano di una RNasi E funzionale, esibendo quindi una maggiore stabilità degli mRNA. Per la trasformazione, da 5 a 10 ng di vettore sono stati utilizzati per 50 µl cellule competenti. Tali cellule sono state poste ad incubare prima in ghiaccio per 5 minuti, quindi a 42°C per 30 secondi e infine nuovamente in ghiaccio per 5 minuti. Aggiunti 250 µl di SOC medium (Invitrogen) preriscaldato a 37 °C, la sospensione cellulare è stata posta ad incubare per 60 minuti a 37°C. Così come indicato dalla casa produttrice e come descritto in materiali e metodi, al termine della trasformazione, 500 µl di ciascuna sospensione cellulare ottenuta sono stati inoculati in 10 ml di terreno LB-BROTH contenente ampicillina 100 µg/µl. Le sospensioni cellulari sono state poste a incubare a 37°C o.n. con lieve agitazione. Il giorno successivo, dopo averne misurato le O.D. a 600 nm, le sospensioni cellulari sono state diluite in modo da presentare un valore di densità ottica prossimo a 0.06. Le sospensioni cellulari così diluite sono state poste a incubare a 37°C con lieve agitazione. La misurazione delle O.D. a 600 nm è stata ripetuta a intervalli di circa 30 minuti fino a che non è stato raggiunto il valore di circa 0.6, indice di fase intermedia della crescita esponenziale. Ciascuna coltura è stata allora separata in due aliquote da 5 ml, delle quali soltanto una è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG alla concentrazione finale 0.75 mM. Le colture sono state lasciate crescere a 37°C con agitazione per circa tre ore. Ogni trenta minuti sono state misurate le O.D. e 500 µl di ciascuna sospensione cellulare sono stati prelevati e centrifugati a $13,000 \times g$ per 10 minuti. Aspirato il supernatante, i pellet sono stati posti a -20°C.

Tali aliquote cellulari sono state in seguito processate per l'analisi dell'espressione della proteina mediante Lumio™ Green Detection Kit, secondo quanto descritto dalle istruzioni della casa produttrice e i lisati proteici ottenuti sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa la proteina di fusione è stata visualizzata agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm.

3.13 Espressione in grandi quantità delle proteine ricombinanti in *E.coli*.

Una volta individuate, attraverso l’allestimento di opportuni saggi di espressione pilota, le migliori condizioni per l’espressione delle proteine ricombinanti in *E.coli*, si è passati alla produzione delle proteine in grandi quantità, utilizzando volumi maggiori delle colture cellulari. In particolare sono stati impiegati 200-300 mL di sospensione cellulare per ogni ciclo di produzione effettuato, per un totale di circa 1000 mL di coltura batterica per ciascuna proteina prodotta.

3.14. Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Al fine di visualizzare su gel le proteine, una aliquota di esse è stata frazionata su gel di poliacrilammide Nu PAGE NOVEX Midi Gels Bis-tris (Invotrogen) gel. La corsa, eseguita utilizzando il buffer di scorrimento NuPAGE® MES SDS Running Buffer (2.5 mM MES, 1 mM Tris Base, 0.005% SDS, 0.05 mM EDTA, pH 7.3), è stata condotta ad un voltaggio costante di 200 V per un tempo di 40 minuti. La visualizzazione delle proteine nel gel è stata ottenuta mediante una delle seguenti tecniche:

- **Colorazione con Blue di Coomassie.** Al termine della corsa, il gel è stato posto a contatto con la stain solution (0,2% Blue Brillante in 20% di metanolo e 0,5% di acido acetico) per 60 minuti. Trascorso questo tempo la stain solution è stata allontanata e il gel risciacquato con acqua Milli-Q. Per la decolorazione il gel è stato posto in 100 ml di metanolo al 30% in leggera agitazione. La soluzione è stata ricambiata ogni 30’ fino a soddisfacente schiarimento del background.

- **Lumio Technology.** Dal momento che le proteine ricombinanti presentavano alla loro estremità N-terminale la “lumio tag”, ossia il motivo tetracisteinico in grado di legare i composti biarsenicali, si è proceduto alla visualizzane delle proteine su gel mediante il Lumio™ Green Detection Kit, utilizzato secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Al termine della corsa, i campioni così trattati sono stati visualizzati direttamente agli UV. L’illustrazione schematica del meccanismo d’azione del Lumio Green Reagent è riportata in Figura 14.

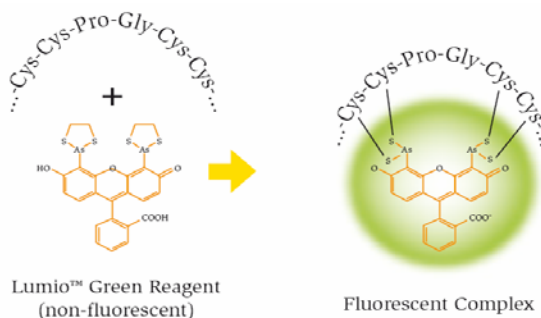


Figura 14. Illustrazione schematica del meccanismo d’azione del Lumio Green Reagent, molecola biarsenicale che lega il motivo tetracisteinico presente all’estremità N-terminale delle proteine di fusione.

3.15 Purificazione delle proteine attraverso cromatografia per affinità.

Le proteine ricombinanti sono state purificate mediante cromatografia per affinità attraverso colonnine di Ni-Sefarosio (His Gravi Trap, GE Healthcare) sfruttando la presenza delle istidine all'estremità N-terminale di tali polipeptidi. Il pellet batterico ottenuto dalle colture cellulari è stato diluito con binding buffer (2mM sodio fosfato, 500 mM NaCl, 20 mM imidazolo) aggiungendo 5 ml di buffer per ogni grammo di pellet. La sospensione cellulare è stata dunque sottoposta a lisi mediante sonicazione (8 cicli da 10 sec ciascuno con pause di 10 sec in ghiaccio).

Dopo averne aggiustato il pH a 7.4, il lisato è stato centrifugato a 39000 g per 20 minuti a 4°C ed il supernatante raccolto è stato sottoposto a passaggio attraverso colonnine di Ni-Sefarosio precedentemente equilibrate con 10 ml di binding buffer. Dopo aver effettuato un lavaggio con 10 ml di binding buffer, le proteine ricombinanti sono state eluite in 3 ml di elution buffer (2mM sodio fosfato, 500 mM NaCl, 500 mM imidazolo). Al termine della purificazione, le proteine recuperate sono state quantizzate al Nanodrop A280 e sottoposte a verifica elettroforetica su gel di poliacrilammide.

3.16 Trattamento proteine con AcTEV Protease

Al fine di rimuovere le regioni della proteina codificate da sequenze presenti nel vettore d'espressione e non presenti nella forma nativa della stessa, le proteine purificate sono state sottoposte a trattamento con l'enzima AcTEV Protease (Invitrogen). Si tratta di una forma modificata della proteasi di Tobacco Etch Virus (TEV) altamente sito-specifica, attiva e stabile. Tale proteasi riconosce una sequenza di sette aminoacidi (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) e taglia tra gli Gln e Gly con elevata specificità. È utilizzata per rimuovere le code da proteine di fusione. Agisce a 30°C e a pH compreso tra 6.0 e 8.5, e, in seguito alla digestione, viene facilmente allontanata dalla miscela di reazione mediante cromatografia per affinità grazie alla presenza di una coda di polistidine all'estremità N-terminale. Le condizioni di reazione prevedono per ogni 20 µg di proteina di fusione, 7.5µl dell'apposito buffer di reazione TEV 20X, 1.5 µl di MDTT 0.1 M, 10 Unità di AcTEV Proteasi, in un volume finale di 150 µl. La miscela di reazione viene lasciata ad incubare per 3 ore a 30°C.

3.17 Purificazione delle proteine attraverso cromatografia per affinità in seguito a trattamento con AcTEV Protease.

In seguito al trattamento con AcTEV Protease le proteine ricombinanti sono state nuovamente purificate mediante cromatografia per affinità attraverso colonnine di Ni-Sefarosio (His Gravi Trap, GE Healthcare). La miscela di reazione è stata sottoposta a passaggio attraverso colonnine di Ni-Sefarosio precedentemente equilibrate con 10 ml di binding buffer. Questa volta la purificazione consente di rimuovere dalla miscela di reazione l'enzima, le code di istidina rimosse e le proteine di fusione non processate dall'enzima. La frazione di proteine senza le code di poli-istidina, che invece attraversa la colonnina, è stata recuperata e quantizzata al Nanodrop.

3.18 Test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*B.bigemina*.

Per la ricerca di anticorpi specifici contro *Babesia bigemina* nel siero di bovini è stato utilizzato il kit SVANOVIR *B.bigemina* Ab-ELISA (Svanova Biotech AB). In tale saggio, basato su una metodica di ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indiretta, il siero dei campioni, prediluito 1/100 con PBS (Phosphate Buffered Saline) – Tween 20 Buffer, è stato aggiunto ai pozzetti della piastra rivestiti con l'antigene ricombinante p200 (Tebele *et al.*, 2000). Le analisi per ciascun campione sono state ripetute in doppio. Se anticorpi diretti verso l'antigene del parassita sono presenti nel campione, essi si legano all'antigene ricombinante formando un complesso antigene-anticorpo. L'aggiunta della perossidasi di rafano coniugata con anticorpi monoclonali anti-IgG di bovino forma un complesso con gli anticorpi di *Babesia bigemina*. Il materiale non legato è rimosso mediante lavaggi con PBS-Tween 20 prima dell'aggiunta del substrato ABTS (acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico), in seguito a cui si sviluppa, nei campioni positivi, una colorazione blu dovuta alla conversione del substrato ad opera del coniugato. La reazione è interrotta dall'aggiunta della Stop solution. Il risultato viene letto allo spettrofotometro, misurando la densità ottica a 405 nm. In ciascun saggio almeno un Controllo Positivo e un Controllo Negativo, entrambi forniti dal kit, sono stati inclusi. Per calcolare la Percentuale di Positività (PP) sia per il controllo negativo che per i campioni è stata utilizzata la formula:

$$PP = \frac{\text{Valore medio delle OD del campione/controllo negativo}}{\text{Valore medio delle OD controllo positivo}} \times 100$$

Campioni con PP minore o uguale a 25 sono stati considerati negativi, campioni con PP maggiori o uguali a 40 sono stati considerati positivi, mentre i campioni con PP comprese tra 26 e 39 sono stati ritenuti dubbi.

3.19 Messa a punto di un saggio ELISA per la ricerca di anticorpi contro le proteine AMA-1 e SBP-1 di *B.bigemina*.

Ciascuna delle proteine ricombinanti purificate è stata diluita in buffer carbonato (0.1 M di bicarbonato di sodio in acqua distillata a pH 8.2) in modo da ottenere diverse concentrazioni. Tali soluzioni sono state utilizzate per ricoprire il fondo dei pozzetti di una piastra per ELISA a 96 pozzetti (Maxisorp, Nunc). In particolare, in ciascun pozzetto sono stati posti 50 µl della soluzione proteica alla concentrazione desiderata. Le piastre sono state lasciate a 4°C per una notte. Il giorno successivo è stata aggiunta una soluzione di PBS (Phosphate Buffered Saline) al 5% di siero albumina bovina e la piastra è stata posta a 37°C per 1h30' al fine di saturare i siti aspecifici dei pozzetti. I sieri da testare sono stati diluiti 1:100 o 1:200 in PBS-Tween 20 Buffer e 50 µl di tali diluizioni sono stati aggiunti ai corrispondenti pozzetti della piastra. Come controllo negativo è stato utilizzato il controllo fornito dal kit SVANOVIR *B.bigemina* Ab-ELISA (Svanova Biotech AB). Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio. Le piastre sono state lasciate 30 minuti a 37 °C. Eseguiti 4 lavaggi con PBS-Tween, sono stati aggiunti anticorpi monoclonali anti-IgG di bovino coniugati con la perossidasi di rafano. Il materiale non legato è stato rimosso mediante lavaggi con PBS –Tween 20 prima dell'aggiunta del substrato prima dell'aggiunta del substrato ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico), in seguito a cui si sviluppa, nei campioni positivi, una colorazione blu dovuta alla conversione del substrato ad opera della perossidasi. La reazione è stata interrotta dopo l'opportuno periodo di incubazione minuti mediante l'aggiunta della Stop solution. Il risultato è stato letto allo spettrofotometro, misurando la densità ottica a 405 nm.

4. RISULTATI

I risultati ottenuti nel corso del Dottorato hanno fornito utili informazioni sulle caratteristiche di alcuni geni codificanti per antigeni di superficie del microrganismo *B. bigemina* a partire da ceppi Italiani del parassita ed hanno permesso di ottenere informazioni predittive in relazione alle corrispondenti proteine attraverso strumenti bioinformatici. Gli studi sono stati indirizzati anche all’ottimizzazione di tecniche diagnostiche e di ricerca basate sulla Real Time PCR.

4.1 Raccolta e conservazione di campioni di siero e sangue provenienti da bovini naturalmente infettati dai parassiti *B.bigemina*.

Nel corso del periodo 2009-2011 sono state raccolte 325 zecche. Durante il suddetto periodo sono pervenuti 812 campioni di sangue e tessuti per la ricerca mediante tecniche molecolari del parassita *B.bigemina*, di cui 72 provenienti da animali selvatici. Tra questi ultimi, in particolare, 40 campioni derivavano da *Sus scrofa* (cinghiale) e 32 da *Dama dama* (daino). Contestualmente sono pervenuti 415 campioni di siero per la determinazione di anticorpi anti-*Babesia bigemina* mediante ELISA.

I campioni di siero, sangue, tessuto o zecca pervenuti al C.R.A.Ba.R.T. (Centro di Referenza per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria*) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia sono stati analizzati al fine di determinarne l’idoneità al processamento (corretta tecnica di prelievo, opportune condizioni di trasporto) e i campioni ritenuti idonei sono stati accettati, convenientemente conservati e processati.

4.2 Analisi sierologica e biomolecolare dei campioni

- Test di screening per la ricerca di anticorpi anti-*Babesia bigemina*.

I campioni di siero pervenuti sono stati analizzati mediante ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-*Babesia bigemina*, come descritto in *Materiali e Metodi*. Dei 415 campioni analizzati, 108 sono risultati positivi. I risultati sono sintetizzati in tabella 8.

- Tecniche di estrazione di DNA

Le procedure di estrazione del DNA dei campioni sono state ottimizzate come segue:

- Il campione di sangue è stato arricchito della fase eritrocitaria, lasciando che gli eritrociti sedimentassero per gravità al fondo della provetta prima di prelevare l’idonea quantità di materiale direttamente dal sedimento.

▪ Il tempo di incubazione a temperatura ambiente, dopo l’aggiunta di TE, è stato aumentato da 5’ a 1h, prima di procedere con la tappa di centrifugazione finale. Questi semplici accorgimenti hanno permesso il recupero di una maggiore quantità di DNA dai campioni di sangue, tessuto o zecca consentendo di migliorare l’efficienza dei test di screening (vedi oltre).

- Test di screening per il ritrovamento del DNA del patogeno *Babesia bigemina* nei campioni analizzati.

Gli acidi nucleici estratti sono stati saggiati tramite PCR utilizzando le tecniche descritte in *Figueroa et al*, (1993), al fine di rintracciare l’eventuale presenza del DNA del parassita *B.bigemina*. Per eseguire la PCR sono stati utilizzati primers complementari a sequenze di DNA del genoma di *B.bigemina*, che generano un frammento di 269 bp. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d’agarosio 1.5% (Figura 15).

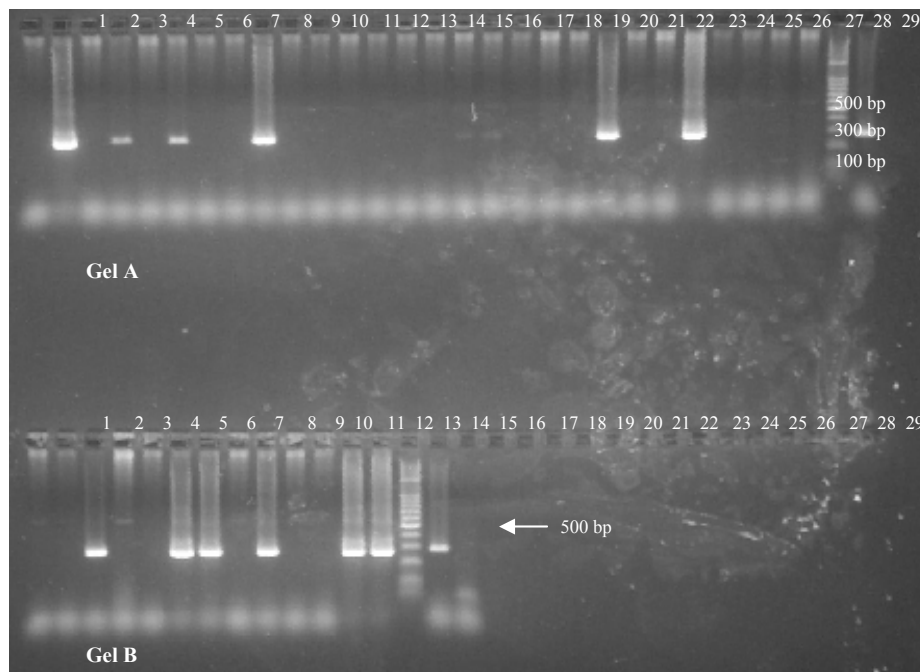


Figura 15. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.5% dei prodotti di amplificazione ottenuti secondo il metodo descritto in *Figueroa et al* (1993) su alcuni dei campioni analizzati nel corso dello studio. **Gel A:** Corsie 1-27: campioni 58-84; corsia 28: Ladder 100 bp; corsia 29: controllo negativo; corsia 30: campione VMRD come controllo positivo. **Gel B:** Corsie 1-13: campioni 85-97; corsia 14: 5µl di DNA Ladder 100 bp (Promega) 0.13µg/µl; corsia 15: campione VMRD come controllo positivo; corsia 16: controllo negativo.

Dei campioni di sangue analizzati per la ricerca mediante tecniche molecolari del DNA del parassita *B.bigemina*, 72 sono risultati positivi all’infezione da parte di *B.bigemina*;

dei 325 campioni di DNA estratti da zecche analizzati, 4 sono risultati positivi alla presenza del patogeno *B.bigemina*. I risultati sono riportati nella tabella 8.

	Totale	Positivi
N° campioni analizzati per ELISA <i>B.bigemina</i>	415	108
N° campioni di sangue o tessuto analizzati per <i>B.bigemina</i> mediante PCR	899	74
Di cui selvatici	72	2
N° zecche analizzate mediante PCR per <i>B.bigemina</i>	325	4

Tabella 8. Campioni sottoposti a ricerca, mediante tecniche sierologiche, di anticorpi anti- *B.bigemina* e campioni sottoposti a ricerca, mediante tecniche molecolari, del DNA del parassita *B.bigemina* nel corso del periodo 2009-2011.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalle analisi condotte sui campioni di zecche, essi sono statisticamente in linea con quelli ottenuti dai campioni di DNA estratti da sangue intero. Il numero apparentemente esiguo di campioni positivi deve essere letto alla luce della provenienza dei campioni di zecca. Alcune di esse sono state prelevate direttamente da capi bovini, altre erano free living e, in quest’ultimo caso, la probabilità di ritrovare un campione positivo è inversamente proporzionale alla distanza da allevamenti bovini.

Dalla tabella si evince inoltre che il DNA del patogeno *B.bigemina* è rintracciabile anche in campioni provenienti da animali selvatici (*Sus scrofa* e *Dama dama*). Tuttavia il ritrovamento di DNA nei campioni di questi animali non implica necessariamente che essi possano essere ritenuti reservoirs dei parassiti, in quanto le analisi biomolecolari effettuate non sono in grado di stabilire se il microrganismo sia in grado di effettuare, anche parzialmente, il proprio ciclo vitale nell’ospite.

4.3 Ottimizzazione di Real Time PCR con il metodo SYBR Green per il rilevamento dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis* da utilizzare per fini diagnostici e di ricerca.

La quantizzazione degli acidi nucleici è divenuta sempre più rilevante, tanto in campo diagnostico che di ricerca, e in tale prospettiva è stato ottimizzato un protocollo in grado di rilevare efficacemente la quantità di acido nucleico dei parassiti *B.bigemina* e *B.bovis* a partire da campioni di sangue.

Sono state utilizzate due coppie di primers (vedi Materiali e Metodi, Tabella 5) che si appaiano a sequenze del gene del citocromo b di *B.bigemina* e *B.bovis*, rispettivamente.

Al fine di ottenere gli standard, è stata condotta una reazione di PCR con le coppie di primers di cui sopra sul DNA estratto a partire da bovini positivi a *B.bigemina* e *B.bovis* rispettivamente, generando in entrambi i casi un frammento delle dimensioni attese. I prodotti di PCR ottenuti sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1.5%, purificati e clonati nel vettore di clonaggio pGEM T-easy vector (Promega), utilizzato per trasformare cellule competenti di *E.coli* Top10. Il DNA plasmidico, estratto utilizzando il sistema di purificazione Wizard SV Minipreps DNA purification system (Promega), è stato quantizzato allo spettrofotometro a 260nm, analizzato mediante PCR per verificare la presenza dell'inserto e inviato a MacroGen.Inc per il sequenziamento. Il plasmide contenente l'inserto atteso è stato quantizzato mediante analisi sia al Nanodrop 200 (Thermo Scientific) che al Qubit (Invitrogen), al fine di ottenere una stima più accurata della concentrazione. Sulla base delle dimensioni del plasmide e della corrispondente massa, sono state effettuate diluizioni seriali 1:10 fino ad ottenere una serie di standard tale da coprire un intervallo da 100 a 10⁶ copie di DNA/μl. Aliquote di tali diluizioni sono state conservate a -20°C e scongelate solo una volta per essere utilizzate come standard.

Nell'ottimizzazione del saggio sono state provate svariate condizioni, quali diverse concentrazioni di primers e diverse temperature di annealing/extension. Sulla base dei coefficienti di correlazione e del valore di pendenza delle curve standard ottenute, si è ritenuto che le reazioni, condotte in un volume finale di 20 μl, risultavano ottimizzate alle seguenti condizioni: 10 μl di iTaq SYBR Green Supermix con aggiunta della sonda passiva ROX, ciascun primer alla concentrazione 0.5 μM e 3 μl di DNA stampo. Le condizioni ottimali di reazione erano: uno step di denaturazione iniziale a 95°C per 15 secondi, seguito da 40 cicli comprendenti ciascuno uno step a 95°C per 15 secondi, seguito da una fase di annealing/allungamento a 60°C per 1 minuto.

Le curve standard della Real Time PCR per *B.bigemina* e *B.bovis*, mostrate nelle Figure 16 e 17 rispettivamente, presentano coefficienti di correlazione molto prossimi a 0.99 e un valore di pendenza di circa -3.33 per *B.bigemina* e di -3.37 per *B.bovis*, indicando che entrambi i saggi possono essere considerati molto efficienti e riproducibili. La sensibilità, per entrambe le reazioni, era nell'ordine delle 100 copie di DNA target.

Standard curve

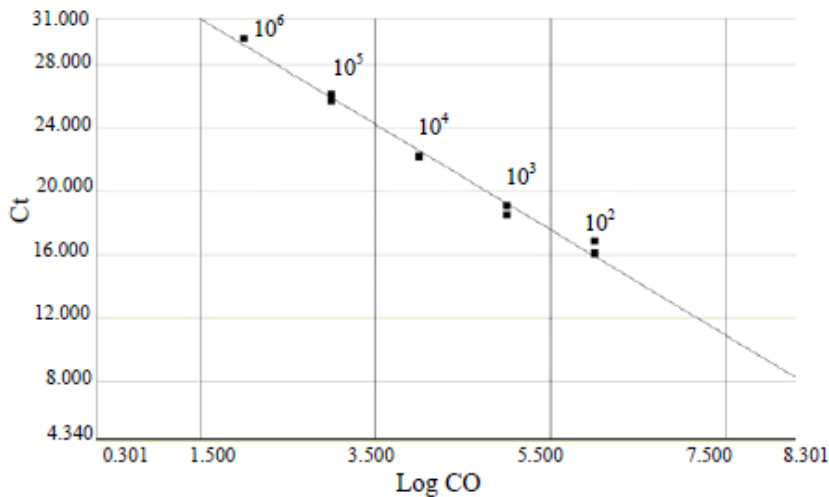


Figura 16. Curva standard per *B.bigemina* ottenuta utilizzando diluizioni seriali del plasmide ricombinante tali da coprire un intervallo da 10^2 a 10^6 copie di DNA/ μ l. La curva presenta coefficienti di correlazione pari a 0.994 e un valore di pendenza di -3.33.

Standard curve

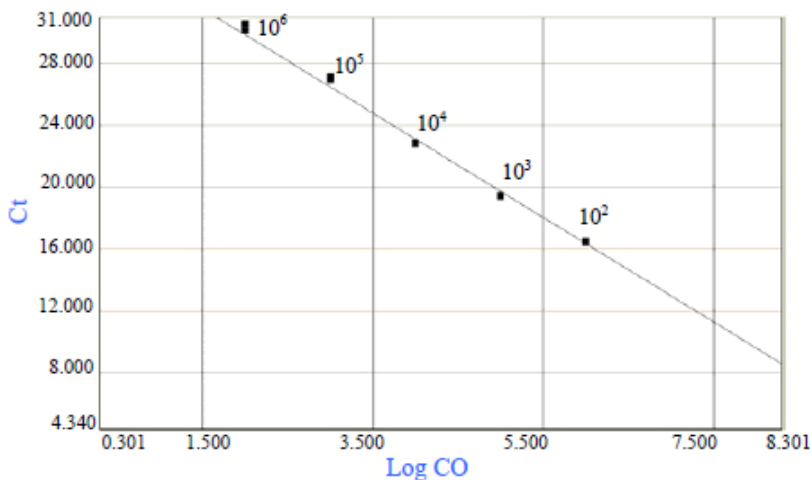


Figura 17. Curva standard per *B.bovis* ottenuta utilizzando diluizioni seriali del plasmide ricombinante tali da coprire un intervallo da 10^2 a 10^6 copie di DNA/ μ l. La curva presenta coefficienti di correlazione pari a 0.994 e un valore di pendenza di -3.37.

In entrambi i casi, l'analisi della temperatura di melting dei prodotti di amplificazione (Figura 18a per *B.bigemina* e 18b per *B.bovis*), ha mostrato che le reazioni erano specifiche.

Dissociation Curve

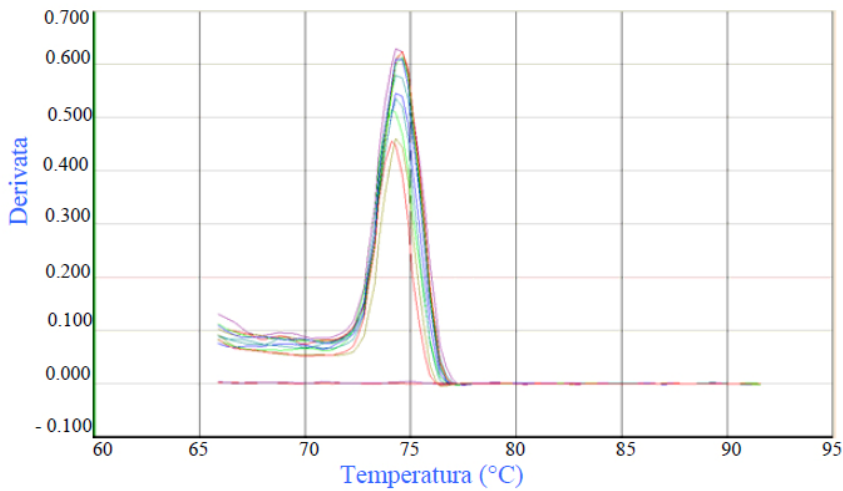


Figura 18a. Curve di melting ottenuta dalla qPCR per *B. bigemina* e *B. bovis*. L'analisi della temperatura di denaturazione dei prodotti di amplificazione indica che la reazione è specifica.

Dissociation Curve

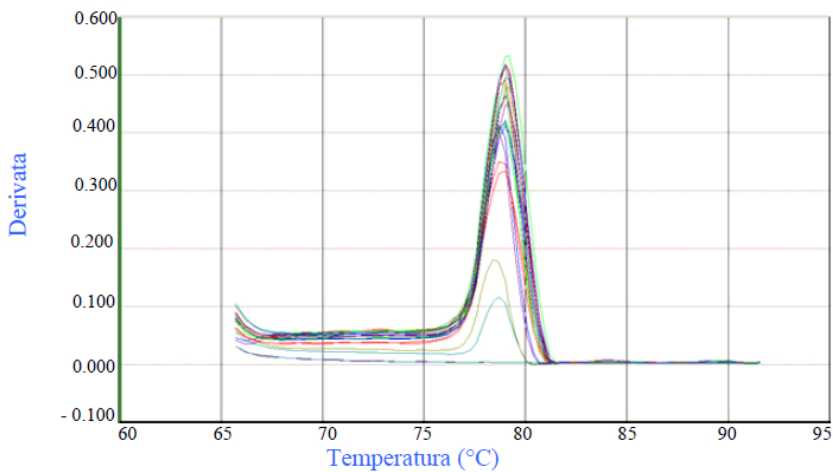


Figura 18b. Curve di melting ottenuta dalla qPCR per *B. bovis*. L'analisi della temperatura di denaturazione dei prodotti di amplificazione indica che la reazione è snecifica.

Una volta ottimizzato il saggio, esso è stato utilizzato per monitorare il livello di parassitemia in campioni animali. In particolare le analisi sono state condotte su alcuni bovini di due allevamenti della provincia di Palermo: uno dell'area di Piana degli Albanesi (allevamento 1) e l'altro di San Giuseppe Jato (allevamento 2). Il DNA di tali campioni è stato estratto a partire da 200 μ l di sangue intero come descritto in Materiali e Metodi. Un primo screening è stato effettuato mediante PCR tradizionale (Figuroa *et al.*, 1993). I risultati della PCR sono mostrati in figura 19a corsie 1-9 per i bovini provenienti dall'allevamento 1, 19a corsie 21-26 e 19b 1-6 per i bovini provenienti dall'allevamento 2.

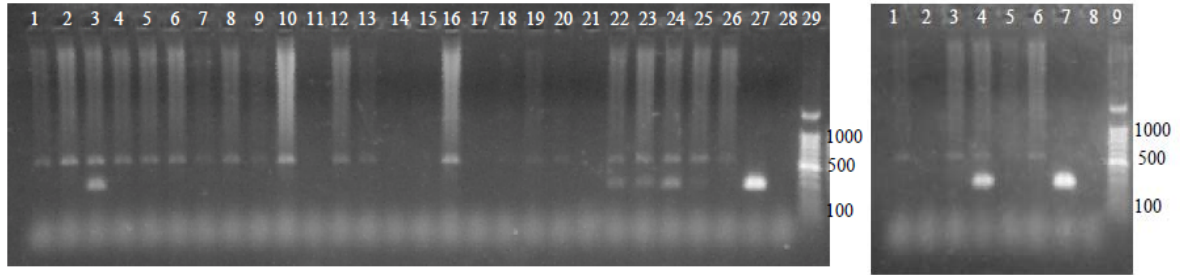


Figura 19 a-b. Profili di migrazione elettroforetica su gel d'agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione ottenuti secondo il metodo descritto in *Figueroa et al (1993)* sui bovini provenienti dai due allevamenti monitorati. **19a (sinistra):** bovini provenienti dall'allevamento 1 (corsie 1-9), bovini provenienti dall'allevamento 2 (corsie 21-26); campione VMRD come controllo positivo (corsia 27), controllo negativo (corsia 28); marcatore di peso molecolare (corsia 29). **19b (destra):** bovini provenienti dall'allevamento 2 (corsie 1-6); campione VMRD come controllo positivo (corsia 7), controllo negativo (corsia 8); marcatore di peso molecolare (corsia 9).

Tra i bovini provenienti dall'allevamento 1 è stata rilevata la presenza di un campione positivo a *B.bigemina*, mentre nessun campione è risultato positivo all'infezione da parte di *B.bovis* (foto non mostrate). Nel secondo allevamento invece è stata rilevata la presenza di cinque campioni positivi a *B.bigemina*, mentre nessun campione è risultato positivo alla PCR di screening per *B.bovis* (foto non mostrate). Sui campioni di entrambi gli allevamenti è stata eseguita la Real Time PCR per *B.bigemina* e l'esito di tale analisi è riportato in figura 20 a-c.

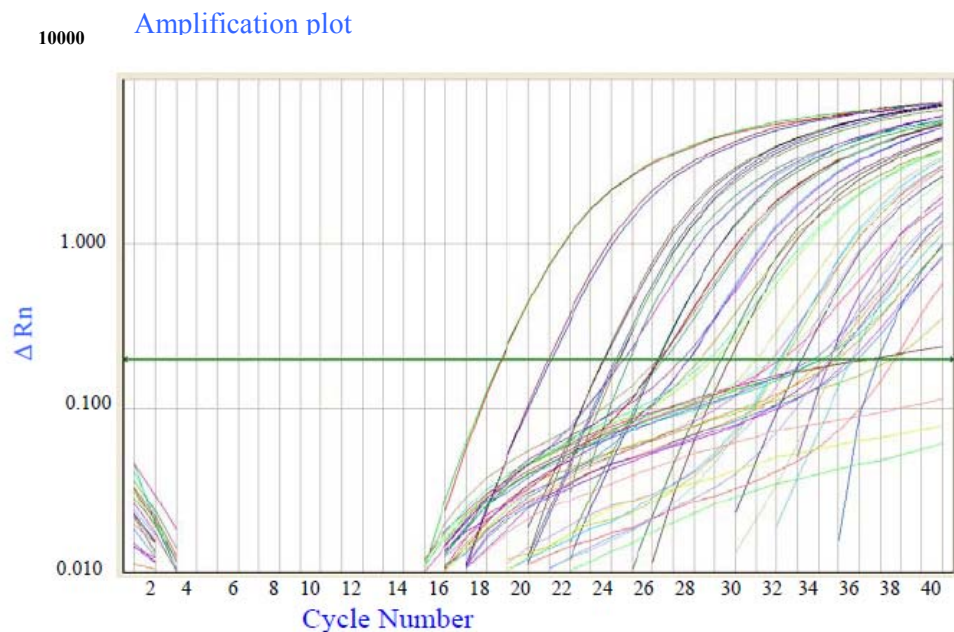


Figura 20a. Andamento della fluorescenza con l'avanzare del numero di cicli durante la reazione di Real Time PCR per *B.bigemina*. Ciascuna delle curve mostrate è relativa ad un campione. Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio.

Melting curve

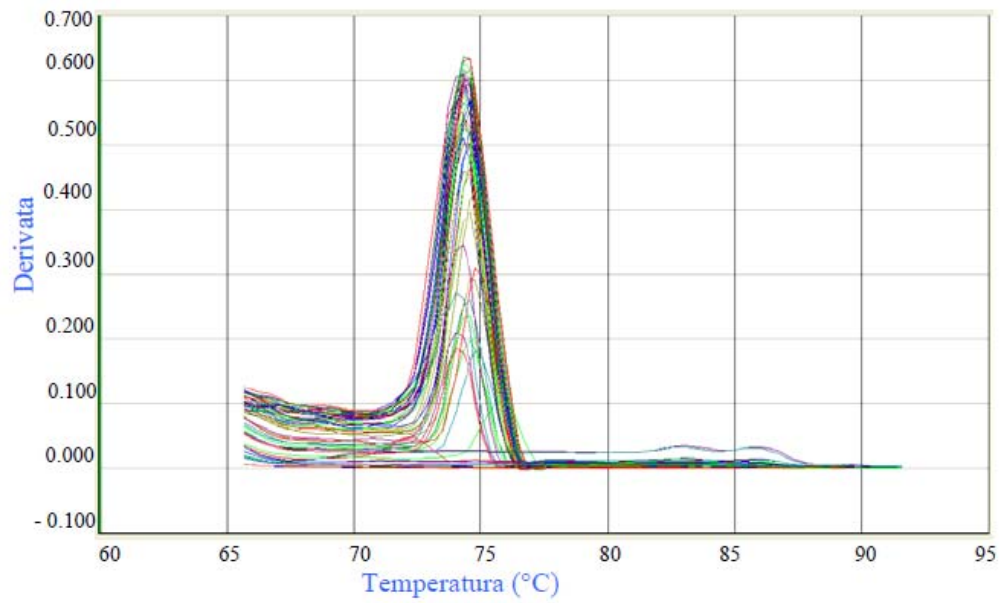


Figura 20b. Curve di melting ottenuta dalla qPCR per *B.bigemina*. L'analisi della temperatura di denaturazione dei prodotti di amplificazione indica che la reazione è specifica.

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Tm
S11	Cyt	Standard	18.668	0.031	1.0e+006			74.0 °C
S11	Cyt	Standard	18.6242	0.031	1.0e+006			74.3 °C
S12	Cyt	Standard	21.0891	0.0845	1.0e+005			74.3 °C
S12	Cyt	Standard	20.9656	0.0845	1.0e+005			74.3 °C
S13	Cyt	Standard	26.1963	0.0391	1.0e+004			74.3 °C
S13	Cyt	Standard	26.2517	0.0391	1.0e+004			74.3 °C
S14	Cyt	Standard	29.6847	0.294	1.0e+003			74.3 °C
S14	Cyt	Standard	29.2656	0.294	1.0e+003			74.3 °C
S15	Cyt	Standard	33.1667	0.993	100			74.6 °C
S15	Cyt	Standard	34.5709	0.993	100			74.3 °C
	Cyt	NTC	Undet.					68.8 °C
	Cyt	NTC	Undet.					68.8 °C
bov6	Cyt	Unknown	23.6319	0.0356	3.716e+004	3.77222e+004	795	74.3 °C
bov8	Cyt	Unknown	23.5815	0.0356	3.82843e+004	3.77222e+004	795	74.6 °C
k+1	Cyt	Unknown	24.1837	0.065	2.68036e+004	2.60947e+004	1.00343e+003	74.6 °C
k+1	Cyt	Unknown	24.2766	0.065	2.53846e+004	2.60947e+004	1.00343e+003	74.3 °C
k+3	Cyt	Unknown	24.8214	0.34	1.8375e+004	2.14015e+004	4.28019e+003	74.3 °C
k+3	Cyt	Unknown	24.3405	0.34	2.44281e+004	2.14015e+004	4.28019e+003	74.3 °C
3630 bov15	Cyt	Unknown	36.8515	1.58	14.8291	37.5871	32.2	74.6 °C
3630 bov15	Cyt	Unknown	34.4809	1.58	60.3451	37.5871	32.2	74.6 °C
25	Cyt	Unknown	36.6163	1.75	17.0242	45.4913	40.3	74.8 °C
25	Cyt	Unknown	34.1973	1.75	73.9583	45.4913	40.3	74.6 °C
35	Cyt	Unknown	29.3007	0.0252	7.49250e+003	7.41457e+003	110	74.6 °C
35	Cyt	Unknown	26.3722	0.0252	7.33643e+003	7.41457e+003	110	74.6 °C
45	Cyt	Unknown	35.8896	0.808	26.5202	36.3324	18.1	74.8 °C
45	Cyt	Unknown	34.7276	0.808	52.1447	36.3324	18.1	74.6 °C
55	Cyt	Unknown	37.5563	2.41	9.75307	41.5972	45	72.4 °C
55	Cyt	Unknown	34.1491	2.41	73.4413	41.5972	45	74.6 °C
65	Cyt	Unknown	36.5375	1.1	17.9644	31.4862	19.1	71.8 °C
65	Cyt	Unknown	34.9762	1.1	45.008	31.4862	19.1	74.0 °C
75	Cyt	Unknown	34.4311		62.1484			74.6 °C
75	Cyt	Unknown	Undet.					68.8 °C
85	Cyt	Unknown	32.0286	1.19	257.727	176.509	115	74.8 °C
85	Cyt	Unknown	33.7052	1.19	95.2903	176.509	115	74.8 °C
95	Cyt	Unknown	37.6441		9.27555			75.7 °C
95	Cyt	Unknown	Undet.					69.6 °C

Figura 20c. Riepilogo dei risultati ottenuti dalla Reazione di Real Time PCR per *B.bigemina*. Con la freccia sono indicati i campioni risultati positivi alla PCR tradizionale che hanno confermato la loro positività alla Real Time PCR. Con la punta di freccia rossa sono indicati i campioni positivi alla Real Time PCR che erano risultati negativi all'analisi attraverso PCR tradizionale.

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	Tm
2865 bov1	Cyt	Unknown	Undet.				69.1 °C
2865 bov1	Cyt	Unknown	Undet.				69.1 °C
2	Cyt	Unknown	26.2464	0.214	7.90376e+003	7.2543e+003	74.6 °C
2	Cyt	Unknown	26.5497	0.214	6.60484e+003	7.2543e+003	74.6 °C
3	Cyt	Unknown	27.3673	0.631	4.02244e+003	3.197e+003	74.6 °C
3	Cyt	Unknown	28.2798	0.631	2.37157e+003	3.197e+003	74.6 °C
4	Cyt	Unknown	27.6963	0.0213	3.35012e+003	3.32054e+003	74.6 °C
4	Cyt	Unknown	27.7264	0.0213	3.29096e+003	3.32054e+003	74.6 °C
5	Cyt	Unknown	29.0276	0.244	1.52321e+003	1.69605e+003	74.3 °C
5	Cyt	Unknown	28.6621	0.244	1.8689e+003	1.69605e+003	74.3 °C
6	Cyt	Unknown	32.242	1.44	227.138	147.606	74.3 °C
6	Cyt	Unknown	34.2773	1.44	68.0738	147.606	74.0 °C
7	Cyt	Unknown	32.1827	0.443	235.25	198.796	74.3 °C
7	Cyt	Unknown	32.8093	0.443	162.342	198.796	74.6 °C
8	Cyt	Unknown	34.9527	0.423	45.6392	38.8352	74.8 °C
8	Cyt	Unknown	35.5507	0.423	32.0313	38.8352	71.0 °C
9	Cyt	Unknown	31.7582	0.512	302.467	383.393	74.6 °C
9	Cyt	Unknown	31.0343	0.512	464.318	383.393	74.6 °C
10	Cyt	Unknown	24.5530	0.00319	2.1529e+004	2.15003e+004	74.3 °C
10	Cyt	Unknown	24.5593	0.00319	2.14717e+004	2.15003e+004	74.3 °C
11	Cyt	Unknown	32.3132	0.123	217.58	229.594	74.6 °C
11	Cyt	Unknown	32.1391	0.123	241.411	229.594	74.3 °C
12	Cyt	Unknown	35.5796		31.4871		74.0 °C
12	Cyt	Unknown	Undet.				68.8 °C
	Cyt	NTC	Undet.				70.5 °C
	Cyt	NTC	Undet.				70.7 °C

Figura 20c. Riepilogo dei risultati ottenuti dalla Reazione di Real Time PCR per *B.bigemina*. Con la freccia sono indicati i campioni risultati positivi alla PCR tradizionale che hanno confermato la loro positività alla Real Time PCR. Con la punta di freccia sono indicati i campioni positivi alla Real Time PCR che erano risultati negativi all’analisi attraverso PCR tradizionale.

Come è possibile osservare (tabella 9), tutti i bovini risultati positivi alla PCR tradizionale di screening hanno confermato la loro positività alla Real Time PCR (campioni contrassegnati in tabella da frecce), ma ciò che è maggiormente interessante è che tramite Real Time PCR è stato possibile rilevare la positività al patogeno di 4 bovini che erano risultati negativi all’analisi attraverso PCR tradizionale (campioni 85, 7, 9, 11, contrassegnati da punte di freccia). L’analisi delle temperature di melting dei prodotti di amplificazione suggeriva che si trattava di prodotti di amplificazione specifici. La parassitemia in questi quattro bovini si attestava comunque a livelli bassi, inferiori ai 100 copie di DNA/ μ l di sangue totale. L’analisi dei livelli di IgG anti *B.bigemina* tramite ELISA ha confermato nel siero di due di questi bovini la presenza di anticorpi contro il parassita, un terzo bovino è risultato dubbio, mentre il quarto negativo.

Allevamento	Id. Campione	Esito PCR	Esito Real Time PCR SYBR	IgG	Esito PCR 2°prelievo	IgG 2°prelievo	
1	bov. 15	Neg	Neg	Pos			
1	bov. 25	Neg	Neg	Neg			
→	1	bov. 35	Pos	Pos	Pos		
	1	45	Neg	Neg	Pos		
	1	55	Neg	Neg	Pos		
	1	65	Neg	Neg	Pos		
	1	75	Neg	Neg	Pos		
▶	1	85	Neg	Pos	Neg		
	1	95	Neg	Neg	Neg		
	2	1	Neg	Neg	Pos		
→	2	2	Pos	Pos	Pos		
→	2	3	Pos	Pos	Pos	Pos	
→	2	4	Pos	Pos	Neg	Pos	Dubbio
→	2	5	Pos	Pos	Pos	Pos	
	2	6	Neg	Neg	Dubbio		
▶	2	7	Neg	Pos	Pos		
	2	8	Neg	Neg	Dubbio	Neg	Dubbio
▶	2	9	Neg	Pos	Dubbio		
	2	10	Pos	Pos	Pos	Pos	
▶	2	11	Neg	Pos	Pos		
	2	12	Neg	Neg	Pos		

Tabella 9. Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti sugli stessi campioni mediante differenti metodiche, molecolari e sierologiche, per lo screening di *B.bigemina*.

È necessario a questo punto ricordare che *B.bigemina* è in grado di dar luogo a fenomeni di cronicizzazione nell’ospite in cui è possibile registrare la presenza del parassita a livelli estremamente bassi senza tuttavia che il bovino manifesti i segni clinici della malattia.

L'analisi delle immunoglobuline ripetuta sui sieri di alcuni dei bovini dell'allevamento 2 prelevati a distanza di una settimana ha confermato la positività alle IgG dei bovini positivi al primo prelievo. Il bovino 4 di tale allevamento, che alle analisi eseguite sul primo prelievo era risultato positivo sia alla PCR tradizionale sia alla Real Time PCR e negativo alla ricerca delle IgG anti *B.bigemina*, ha confermato nelle analisi eseguite sul secondo prelievo la positività alla PCR, mentre si è rivelato dubbio all'analisi sierologia, mostrando che un'immunizzazione nei confronti del patogeno era in atto nel bovino analizzato.

4.4. Ottimizzazione di Real Time PCR con il metodo TaqMan per il rilevamento dei patogeni *B.bigemina* e *B.bovis*.

La Real Time PCR secondo il metodo TaqMan presenta alcuni vantaggi rispetto alla metodica in SYBR Green che la rendono maggiormente idonea ad applicazioni di tipo diagnostico. Tra essi ricordiamo una maggiore specificità grazie all'impiego di una sonda target-specifica e la possibilità di condurre PCR duplex. Tali considerazioni hanno spinto ad indirizzare lo studio verso l'ottimizzazione di un saggio di qPCR per *B.bovis* e *B.bigemina* basato sul metodo TaqMan (Criado-Fornelio *et al.*, 2009). Per tale scopo sono stati utilizzati i primers e le sonde riportati in Materiali e Metodi.

Gli standard della reazione sono quelli utilizzati nella reazione di Real Time PCR con il metodo SYBR Green. Nell'ottimizzazione del saggio sono state esaminate svariate condizioni, quali diverse concentrazioni di primers e diverse temperature di annealing/extension. Si ritiene che la reazione, condotta in un volume finale di 20 μ l, risultava ottimizzata alle seguenti condizioni: 10 μ l di TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem), ciascun primer alla concentrazione 0.5 μ M, 250 nM di sonda e 3 μ l di DNA stampo. Le condizioni ottimali di reazione erano: uno step di denaturazione iniziale a 95 °C per 15 secondi, seguito da 40 cicli comprendenti ciascuno uno step a 95 °C per 15 secondi, seguito da una fase di annealing/allungamento a 60°C per 1 minuto.

Le curve standard della Real Time PCR per *B.bigemina* e *B.bovis*, mostrate in figura 21 e 22 rispettivamente, presentano coefficienti di correlazione molto prossimi a 0.99 e un valore di pendenza di -3.896 per *B.bigemina* e di -3.414 *B.bovis*, indicando che entrambi i saggi possono essere considerati molto efficienti e riproducibili. La sensibilità, per entrambe le reazioni, era nell'ordine delle 100 copie di DNA target.

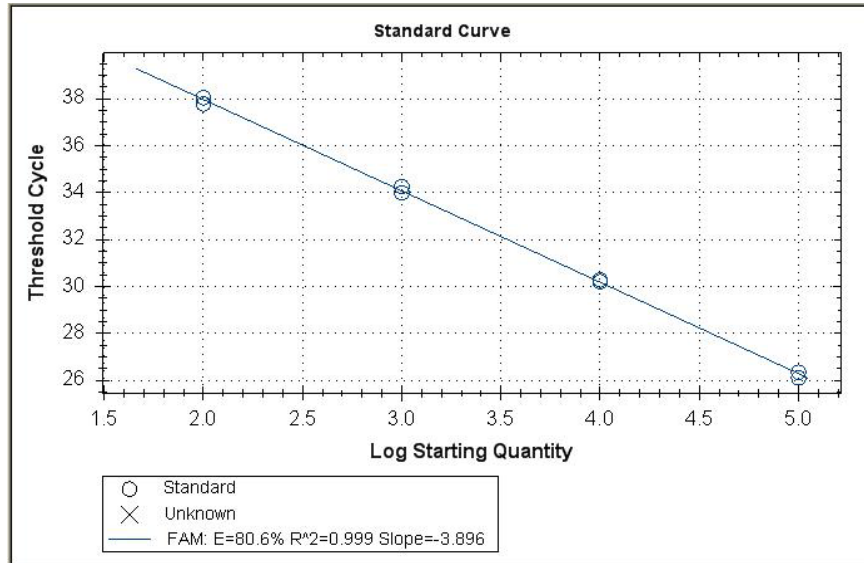


Figura 21. Curva standard per *B.bigemina* ottenuta utilizzando diluizioni seriali del plasmide ricombinante tali da coprire un intervallo da 10^2 a 10^6 copie di DNA/ μ l. La curva presenta coefficienti di correlazione pari a 0.999 e un valore di pendenza di -3.896.

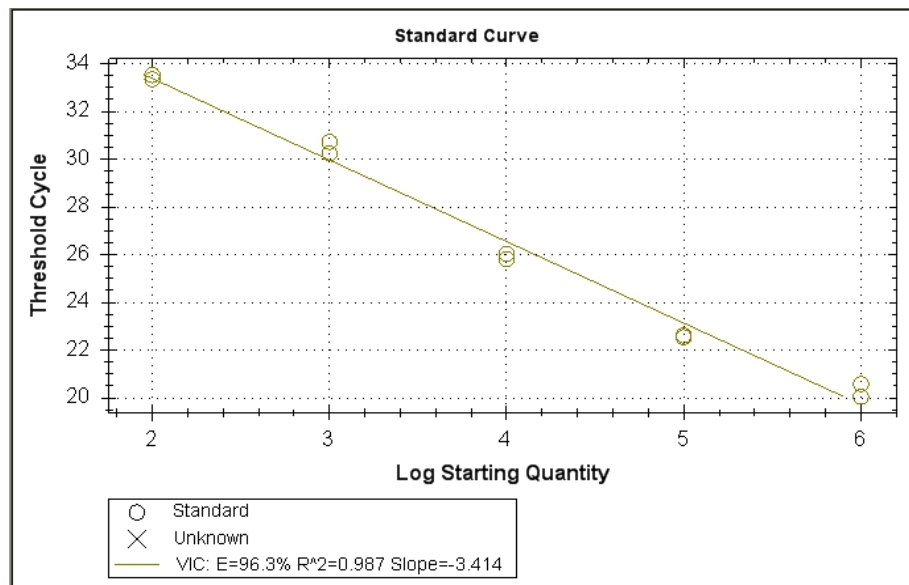


Figura 22. Curva standard per *B.bovis* ottenuta utilizzando diluizioni seriali del plasmide ricombinante tali da coprire un intervallo da 10^2 a 10^6 copie di DNA/ μ l. La curva presenta coefficienti di correlazione pari a 0.987 e un valore di pendenza di -3.414.

La reazione è stata dunque utilizzata per monitorare il livello di parassitemia nei nostri campioni e in particolare, in Figura 23a e 23b, sono riportati i risultati ottenuti dall’analisi condotta nei due allevamenti della provincia di Palermo sui quali era stato in precedenza eseguito il monitoraggio mediante Real Time PCR secondo il metodo SYBR Green.

Il saggio eseguito con il metodo TaqMan presentava una minore fluorescenza di fondo rispetto a quello condotto con il metodo SYBR Green, consentendo una più specifica e certa individuazioni dei campioni positivi, particolarmente importante nelle applicazioni diagnostiche. La reazione ha confermato i risultati ottenuti dall’analisi mediante SYBR Green qPCR dal momento che tutti i campioni positivi alla qPCR mediante metodo SYBR si sono confermati positivi alla metodica di qPCR mediante metodo TaqMan. Tuttavia il campione 6, che, presentando valori di fluorescenza molto vicina al rumore di fondo, era risultato negativo all’analisi mediante SYBR Green qPCR, nel saggio di TaqMan qPCR appare chiaramente positivo. La metodica mediante metodo TaqMan mostra dunque una maggiore sensibilità rispetto alla Real Time PCR eseguita mediante metodo SYBR Green.

Sample	Threshold Cycle (C(t))	C(t) Mean	C(t) Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
	26.10	26.22	0.167	1.000E+05	5.000	1.00E+05	0.00E+00
	26.34	26.22	0.167	1.000E+05	5.000	1.00E+05	0.00E+00
	30.27	30.24	0.051	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00
	30.20	30.24	0.051	1.000E+04	4.000	1.00E+04	0.00E+00
	33.99	34.12	0.187	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00
	34.25	34.12	0.187	1.000E+03	3.000	1.00E+03	0.00E+00
	38.05	37.91	0.193	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00
	37.77	37.91	0.193	1.000E+02	2.000	1.00E+02	0.00E+00
bov8	29.45	29.31	0.211	1.530E+04	4.185	1.68E+04	2.09E+03
bov8	29.16	29.31	0.211	1.826E+04	4.261	1.68E+04	2.09E+03
bov39	28.33	28.22	0.151	2.975E+04	4.473	3.18E+04	2.84E+03
bov39	28.12	28.22	0.151	3.376E+04	4.528	3.18E+04	2.84E+03
33521	32.67	32.13	0.766	2.286E+03	3.359	3.31E+03	1.45E+03
33521	31.59	32.13	0.766	4.338E+03	3.637	3.31E+03	1.45E+03
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
15	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
15	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
25	39.28	39.28	0.000	4.591E+01	1.662	4.59E+01	0.00E+00
25	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
35	31.36	31.50	0.193	4.960E+03	3.695	4.59E+03	5.22E+02
35	31.63	31.50	0.193	4.221E+03	3.625	4.59E+03	5.22E+02
45	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
45	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
55	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
55	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
65	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
65	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
75	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
75	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
85	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
85	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
95	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
95	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
105	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
105	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00

Figura 23b. Riepilogo dei risultati ottenuti dalla Reazione di Real Time PCR per *B.bigemina* eseguita con il metodo TaqMan

Fluor	Content	Sample	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev
FAM	Unkn-27	2865 bov1	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-27	2865 bov1	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-29	2	32.43	32.57	0.198	2.632E+03	3.420	2.43E+03	2.84E+02
FAM	Unkn-29	2	32.71	32.57	0.198	2.230E+03	3.348	2.43E+03	2.84E+02
FAM	Unkn-31	3	33.30	33.22	0.117	1.575E+03	3.197	1.66E+03	1.14E+02
FAM	Unkn-31	3	33.14	33.22	0.117	1.737E+03	3.240	1.66E+03	1.14E+02
FAM	Unkn-33	4	34.08	33.99	0.138	9.916E+02	2.996	1.05E+03	8.57E+01
FAM	Unkn-33	4	33.89	33.99	0.138	1.113E+03	3.046	1.05E+03	8.57E+01
FAM	Unkn-35	5	35.64	35.40	0.340	3.943E+02	2.996	4.59E+02	9.17E+01
FAM	Unkn-35	5	35.16	35.40	0.340	5.240E+02	2.719	4.59E+02	9.17E+01
FAM	Unkn-37	6	36.53	37.45	1.311	2.340E+02	2.369	1.56E+02	1.10E+02
FAM	Unkn-37	6	38.38	37.45	1.311	7.823E+01	1.893	1.56E+02	1.10E+02
FAM	Unkn-39	7	37.33	37.70	0.519	1.457E+02	2.164	1.20E+02	3.63E+01
FAM	Unkn-39	7	38.06	37.70	0.519	9.446E+01	1.975	1.20E+02	3.63E+01
FAM	Unkn-41	8	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-41	8	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-43	9	37.33	37.44	0.154	1.458E+02	2.164	1.37E+02	1.25E+01
FAM	Unkn-43	9	37.55	37.44	0.154	1.261E+02	2.108	1.37E+02	1.25E+01
FAM	Unkn-45	10	30.51	30.44	0.100	8.222E+03	3.915	8.59E+03	5.06E+02
FAM	Unkn-45	10	30.36	30.44	0.100	8.937E+03	3.951	8.59E+03	5.06E+02
FAM	Unkn-47	11	36.76	36.99	0.322	2.041E+02	2.310	1.80E+02	3.41E+01
FAM	Unkn-47	11	37.21	36.99	0.322	1.559E+02	2.193	1.80E+02	3.41E+01
FAM	Unkn-49	12	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-49	12	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn		N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn		N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn		N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn		N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-51	1080 bov10	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-51	1080 bov10	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-53	1080 bov11	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-53	1080 bov11	N/A	0.00	0.000	N/A	N/A	0.00E+00	0.00E+00
FAM	Unkn-55	1826.5	32.17	32.05	0.181	3.056E+03	3.487	3.32E+03	3.55E+02
FAM	Unkn-55	1826.5	31.92	32.05	0.181	3.568E+03	3.552	3.32E+03	3.55E+02
FAM	Unkn-57	1826.8	30.54	30.41	0.178	8.074E+03	3.907	8.72E+03	9.18E+02
FAM	Unkn-57	1826.8	30.28	30.41	0.178	9.372E+03	3.972	8.72E+03	9.18E+02

Figura 23b. Riepilogo dei risultati ottenuti dalla Reazione di Real Time PCR per *B. bigemina* eseguita con il metodo TaqMan

4.5 Studio del polimorfismo dei geni codificanti per alcuni antigeni di superficie.

La seguente sezione riporta i risultati dello studio condotto sulle sequenze codificanti per alcune proteine di superficie di *B.bigemina*.

Parte di questa analisi è stata resa possibile grazie al progetto di sequenziamento dell'intero genoma condotto su un ceppo Australiano di *B.bigemina* dal Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK). Le sequenze grezze di DNA, risultato diretto di tale progetto di sequenziamento, sono state rese disponibili sul sito del Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>).

Di grande aiuto all'analisi condotta sono state anche le sequenze pubblicate in GenBank dagli altri gruppi di ricerca che conducono studi su tale patogeno, così come lo scambio di informazioni con alcuni di essi. In particolare, estremamente produttivi sono stati gli scambi di informazioni con il gruppo del Prof. Juan Mosqueda, (Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico), e con quello del Prof. Carlos E. Suarez (Washington State University, Pullman, USA).

Le analisi di seguito descritte hanno riguardato, in particolare, le sequenze codificanti per le proteine di *B.bigemina* AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1), RAP1c (rhoptry-associated protein-1c), GP45 (glycoprotein 45 KDa) e una regione inizialmente identificata come codificante per la proteina SBP-1 (Spherical Body Protein 1).

A partire dal DNA di alcuni dei campioni risultati positivi alle analisi di screening sono state amplificate, clonate e sequenziate le regioni codificanti per tali antigeni di superficie. Le sequenze ottenute sono state confrontate con le sequenze riportate in banca dati relative a ceppi geograficamente distanti, al fine di studiarne differenze e omologie e valutarne il grado di conservazione. Un elevato grado di conservazione è un requisito essenziale per un valido candidato vaccinale, affinché la risposta immunitaria da esso innescata efficaci contro l'infezione da parte di qualsiasi ceppo. Le analisi condotte rivestono una notevole importanza nel campo in quanto poco o nulla era noto per alcuni di tali geni in *B.bigemina* e inoltre costituiscono la premessa importante per comprendere se un dato antigene è potenzialmente un buon candidato vaccinale o se presenta un grado di variabilità tale da renderlo nel complesso non idoneo allo scopo.

4.5.1 Apical Membrane Antigen-1.

Amplificazione del gene AMA-1 di *B. bigemina*.

La regione del genoma di *B. bigemina* corrispondente a quella del gene AMA-1, identificata mediante analisi comparativa di geni degli organismi correlati *Plasmodium falciparum* e *B. bovis* con il genoma di *B. bigemina*, è stata analizzata mediante due differenti software: ORF Finder (disponibile presso <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) e ORF Finder (disponibile presso http://www.bioinformatics.org/sms/orf_find.html) al fine di confermare che si trattasse dell'intera ORF senza codoni di stop in frame.

Al fine di caratterizzare nei ceppi italiani la sequenza del gene AMA-1 e determinare il suo grado di conservazione, a partire dal DNA estratto da alcuni ceppi italiani di *Babesia bigemina* ottenuti da campioni di sangue, è stata amplificata l'intera regione codificante (1788 bp) del gene AMA-1 (Fig.24a), utilizzando una coppia di primers complementari a sequenze poste immediatamente a monte e a valle dell'intera ORF (Mosqueda, 2007).

Nel caso mostrato in Figura 24a corsie 3-4 (campione ITA-4), il prodotto di amplificazione generava una banda di intensità molto bassa e pertanto è stato ripreparato il DNA direttamente dalla frazione eritrocitaria, invece che da sangue totale. L'amplificazione ha dato risultato chiaramente positivo (Figura 24b).

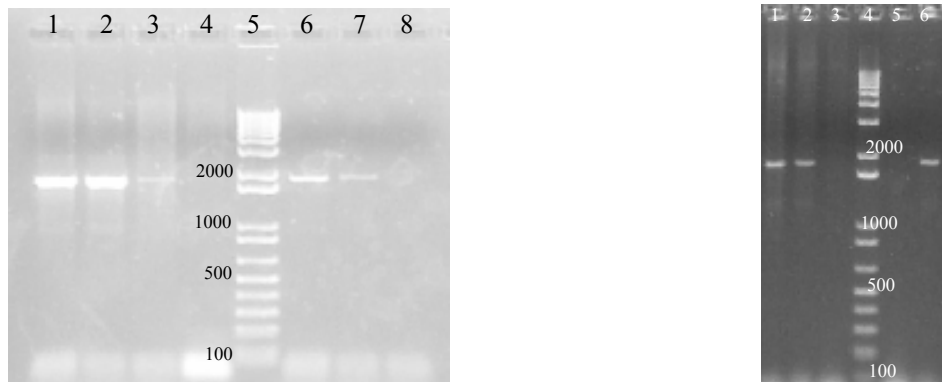


Figura 24 a-b. **a** (sinistra): Profili di migrazione elettroforetica su gel d'agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione AMA-1 ottenuta a partire dai campioni ITA3a (corsia 1); ITA3b (corsia 2); ITA4 (corsie 3-4); Ladder 1 Kb (corsia 5); campione VMRD come controllo positivo (corsia 6-7); controllo negativo (corsia 8). **b** (destra): Profili di migrazione elettroforetica su gel d'agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione AMA-1 ottenuta a partire dal campione ITA-4 in seguito ad estrazione con gli accorgimenti riportati in Materiali e Metodi (corsie 1-2); 5 µl di DNA Ladder 1 Kb (Promega) 0.1µg/µl (corsia 4); controllo negativo (corsia 5), campione VMRD come controllo positivo (corsia 6).

Clonaggio della regione codificante per la proteina AMA-1 e analisi delle sequenze ottenute.

I prodotti di amplificazione ottenuti tramite PCR sono stati purificati, quantizzati e clonati in vettore Topo TA 2.1 con cui sono poi state trasformate cellule di *E.coli* Top10. Parte di tali cellule sono state utilizzate per la conservazione a lungo termine a -80°C , altre sono state utilizzate per l'estrazione di DNA plasmidico. I plasmidi estratti sono stati analizzati mediante amplificazione per PCR con primers AMA-1 (vedi Materiali e Metodi) al fine di individuare quali di essi contenevano l'inserto delle dimensioni attese (Figura 25). Almeno due dei plasmidi positivi provenienti da ciascuno dei clonaggi effettuati sono stati inviati alla ditta MacroGen.Inc per il sequenziamento.

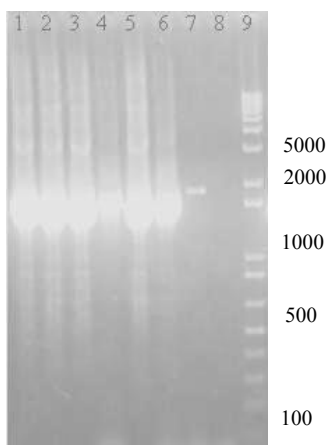


Figura 25. Profili di migrazione elettroforetica su gel d'agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione AMA-1 ottenuta mediante PCR sui plasmidi estratti a partire da sei colonie bianche in seguito a trasformazione di cellule competenti di *E.coli* Top10 con il vettore Topo TA 2.1 in cui era stato clonato il gene AMA-1 proveniente dal campione ITA3a (corsie 1-6); campione VMRD come controllo positivo (corsia 7); controllo negativo (corsia 8) 85 μl di DNA Ladder 1 Kb (Promega) 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (corsia 9).

Le sequenze AMA-1 presenti nei plasmidi ottenuti da un dato clonaggio sono risultate identiche tra loro, così come le sequenze ottenute a partire da campioni provenienti da animali diversi di uno stesso allevamento prelevati contestualmente.

La regione amplificata e clonata corrisponde effettivamente al gene previsto, in quanto risulta costituita da 1788 bp e codifica per una proteina di 595 aminoacidi, molto simile in dimensioni al prodotto di 622 aminoacidi AMA-1 di *Plasmodium falciparum* e a quello di 605 aminoacidi codificato dal gene AMA-1 di *Babesia bovis*. Il peso molecolare stimato risulta essere di 65.9KDa, il punto isoelettrico risulta 6.34, mentre l'analisi dell'indice di instabilità ($39.72 < 40$) ha classificato la proteina come stabile (ProtParam, EXPASY).

Confronto delle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di AMA-1 tra i ceppi Italiani e ceppi stranieri di *B. bigemina*.

Sono state paragonate le sequenze nucleotidiche e aminoacidiche di AMA-1 di alcuni dei ceppi di *B.bigemina* via via pervenuti presso il nostro laboratorio. In particolare

l’analisi è stata condotta su un totale di otto ceppi italiani di varia provenienza ed ha confermato la presenza di un forte grado di identità tra le sequenze. Tutte le sequenze sono state depositate in banca dati (Tabella 10).

Campione	Provenienza	Specie	Descrizione	Numero d’accesso
ITA1	Ragusa	bovino	sangue in EDTA	GQ257738
ITA2	Portici	bovino	sangue in EDTA	GQ257739
ITA3	Ragusa	bovino	sangue in EDTA	GQ257740
ITA4PG	Perugia	bovino	sangue in EDTA	HM543726
ITA5RG	Ragusa	bovino	sangue in EDTA	HM543727
ITA6PA	Palermo	bovino	sangue in EDTA	HM543728
ITA7PA	Palermo	bovino	sangue in EDTA	HM543729
ITA8CT	Catania	bovino	sangue in EDTA	HM543730

Tabella 10: Campioni positivi a *B.bigemina* dei quali sono state depositate in banca dati le sequenze corrispondenti alla regione codificante del gene Ama-1 e relativi numeri di accesso.

Il confronto delle sequenze aminoacidiche (Figura 26a) e nucleotidiche (Figura 26b) ottenute a partire dai ceppi italiani con le sequenze dei ceppi stranieri ha mostrato che le divergenze evolutive tra i ceppi erano molto basse. La percentuale di identità complessiva, di conseguenza, è risultata elevata, pari al 99.0% per le sequenze aminoacidiche e al 99.0% per quelle nucleotidiche.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Australia												
2. VMRD	0.017											
3. Mexico	0.019	0.008										
4. Argentina	0.020	0.010	0.012									
5. Ita1RG	0.024	0.014	0.015	0.017								
6. Ita3RG	0.017	0.002	0.010	0.012	0.015							
7. 78378RGbov	0.019	0.002	0.010	0.012	0.015	0.003						
8. 2865PAbov1	0.019	0.002	0.010	0.008	0.015	0.003	0.003					
9. 3630PAbov3	0.017	0.000	0.008	0.010	0.014	0.002	0.002	0.002				
10. 1826CTc3	0.022	0.005	0.014	0.012	0.019	0.007	0.007	0.003	0.005			
11. Ita2NA	0.019	0.008	0.007	0.012	0.008	0.010	0.010	0.010	0.008	0.014		
12. Ita4PG	0.019	0.002	0.010	0.012	0.015	0.003	0.003	0.003	0.002	0.007	0.010	

Figura 26a. Stima della divergenza evolutiva tra le sequenze di aminoacidi (pairwise alignment).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Australia												
2. VMRD	0.019											
3. Mexico	0.021	0.012										
4. Argentina	0.018	0.011	0.012									
5. Ita1RG	0.020	0.010	0.011	0.010								
6. Ita3RG	0.020	0.010	0.015	0.012	0.015							
7. 78378RGbov23c1	0.020	0.008	0.012	0.011	0.011	0.009						
8. 2865PAbov10c3	0.023	0.010	0.012	0.009	0.010	0.010	0.007					
9. 3630PAbov35	0.019	0.005	0.012	0.009	0.010	0.007	0.005	0.006				
10. 1826CTc3	0.020	0.006	0.011	0.010	0.009	0.011	0.006	0.006	0.004			
11. Ita2NA	0.019	0.009	0.011	0.011	0.008	0.011	0.009	0.011	0.007	0.010		
12. Ita4PG	0.019	0.010	0.012	0.011	0.012	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	

Figura 26b. Stima della divergenza evolutiva tra le sequenze di DNA (pairwise alignment).

L’omologia funzionale della proteina AMA-1 di *B. bigemina* è stata esaminata mediante ricerca di domini funzionali conservati all’interno del database **P-Fam** di famiglie di proteine (Finn, 2008). L’analisi ha supportato pienamente l’omologia funzionale tra le proteine AMA-1 di PfAMA e di *B. bigemina*, includendo la proteina nella famiglia di proteine AMA-1 (Fig. 27).

Significant Pfam-A Matches		
Show or hide all alignments.		
Pfam-A	Description	Entry type
AMA-1	Apical membrane antigen 1	Family

Figura 27. Risultato della ricerca di domini funzionali conservati all’interno del database P-Fam di famiglie di proteine.

Attraverso il software **SignalP** (Fig. 28a e 28b) è stata predetta la presenza, in prossimità del dominio N-terminale della proteina AMA-1 di *B. bigemina*, di un peptide segnale di 30 aminoacidi, che può essere riscontrato anche in PfAMA-1 (24 a.a.), Fig.28c, e BbAMA-1 (39 a.a.), Fig.28d.

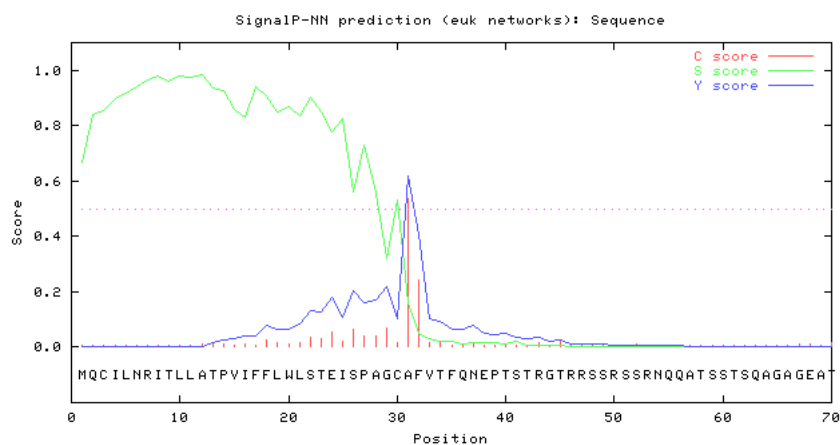


Figura 28a. Predizione del peptide segnale in *B. bigemina* AMA-1 (30-31) attraverso il software Signal peptide (SignalP). S-score: per ciascun aminoacido viene riportato il punteggio associato alla probabilità di far parte del peptide segnale. C-score: punteggio associato alla probabilità che un aminoacido formi il sito di taglio. Y-score: punteggio derivato dal C-score in combinazione con i dati dell’S-score, risulta in una più accurata predizione del sito di taglio.

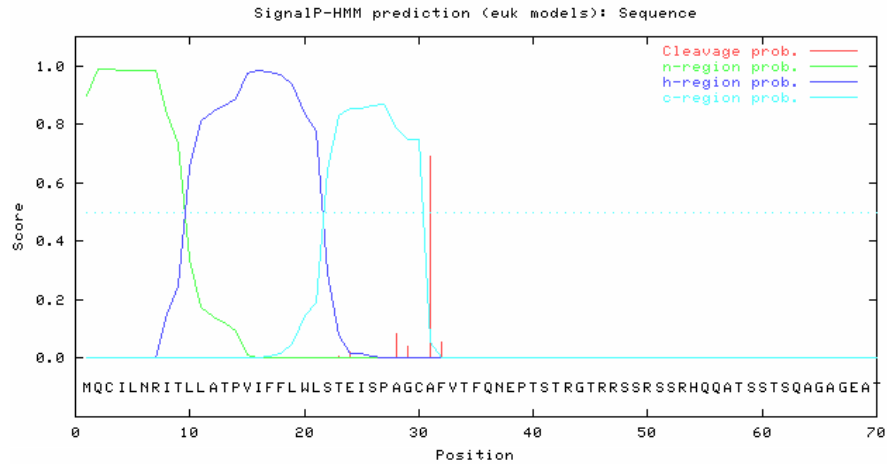


Figura 28b. Predizione del peptide segnale in *B. bigemina* AMA-1 (30-31) attraverso il software Signal peptide (SignalP). Viene riportato il punteggio associato alla probabilità di formazione del sito di taglio (Cleavage prob) insieme ai punteggi calcolati per le regioni N-terminale carica positivamente, centrale idrofobica e C-terminiale polare del peptide segnale (n-region, h-region e c-region, rispettivamente).

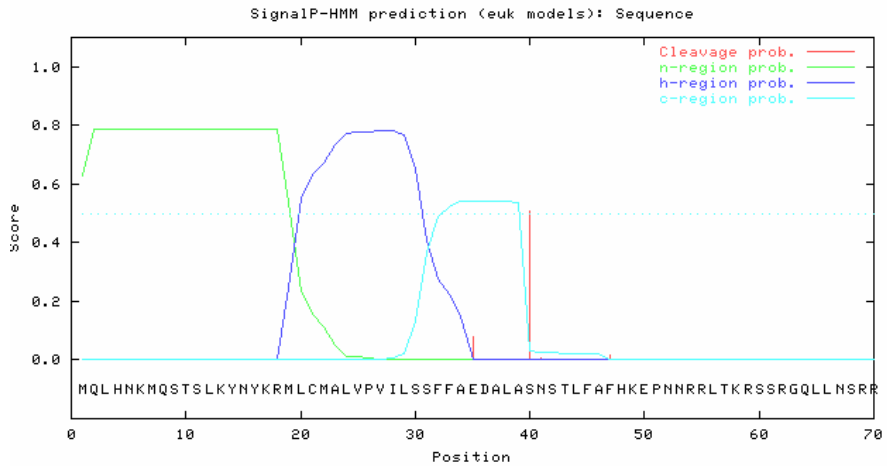


Figura 28c. Signal peptide (SignalP) in *B. bovis* AMA-1 (39-40).

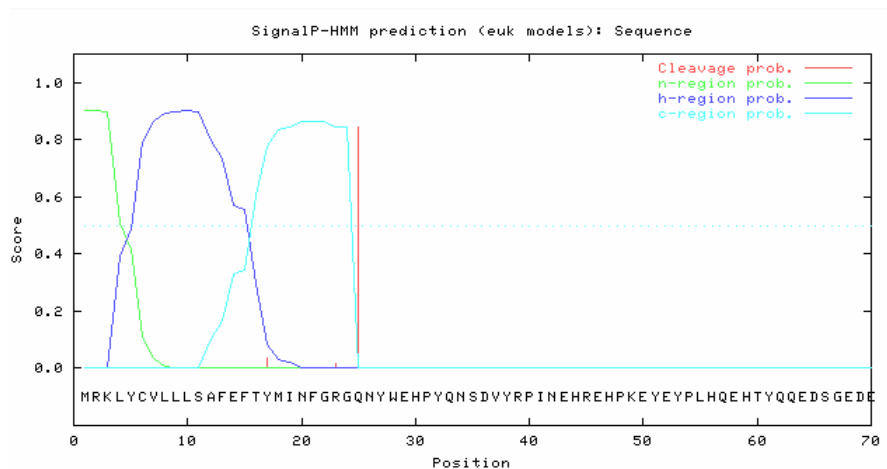


Figura 28d. Signal peptide (SignalP) in *P. falciparum* AMA-1 (24-25).

L’analisi della sequenza aminoacidica della proteina attraverso il software **TMHMM** (Figura 29), ha rivelato la presenza di un’elica trans-membrana (TM) tra gli aminoacidi 513 e 531 in prossimità dell’estremità C-terminale. L’elica divide la porzione N-terminale extracellulare della proteina (aminoacidi 1-512) dalla predetta corta coda citoplasmatica C-terminale (532-595). In modo analogo in *P. falciparum* l’elica TM, presente tra gli aminoacidi 547 e 566, divide la porzione N- terminale extracellulare di 546 aminoacidi dalla coda citoplasmatica C-terminale (567-622). Anche in *B. bovis* la porzione N- terminale extracellulare (aminoacidi 1-522) è separata da un’elica TM (aminoacidi 523-541) dalla coda intracellulare C-terminale (aminoacidi 541-605).

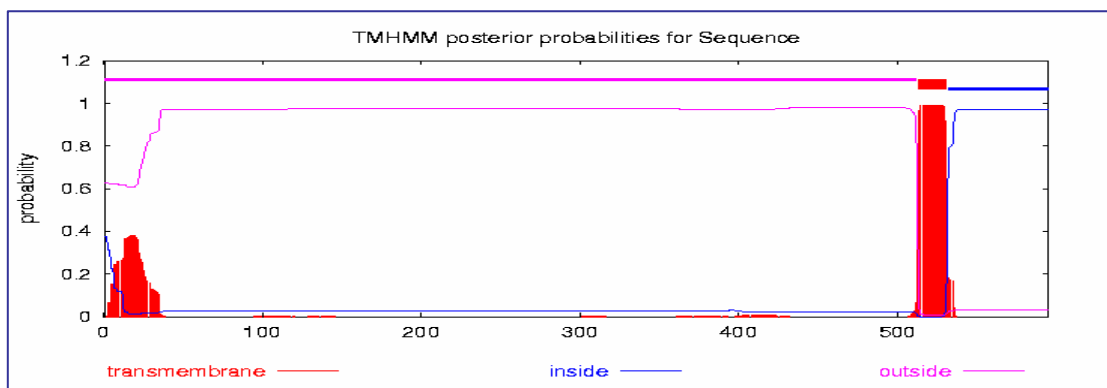


Figura 29: Analisi della sequenza aminoacidica della proteina AMA-1 di *B.bigemina* attraverso il software **TMHMM**. La presenza di un’elica TM tra gli aminoacidi 513 e 531 in prossimità del C-terminale divide la porzione extracellulare della proteina (aminoacidi 1-512) dalla corta coda citoplasmatica C-terminal (532-595).

Uno studio bioinformatico è stato condotto utilizzando il server **DiANNA 1.1** (Ferre and Clote, 2005; Ferre and Clote, 2006), al fine di predire nella proteina AMA-1 di *B.bigemina* la formazione di ipotetici legami disolfuro. I risultati hanno mostrato la presenza di 16 residui di cisteina presumibilmente implicati nella formazione di legami disolfuro. L’allineamento multi-sequenza (**ClustalW2.0.10**) tra le proteine AMA-1 di *B. bigemina*, *B. bovis* e *P. falciparum* ha mostrato (Figura 30) che la maggior parte dei residui di cisteina che formano legami disolfuro in *P. falciparum* AMA-1 è conservata in tutti e tre gli organismi (13 residui su 16).

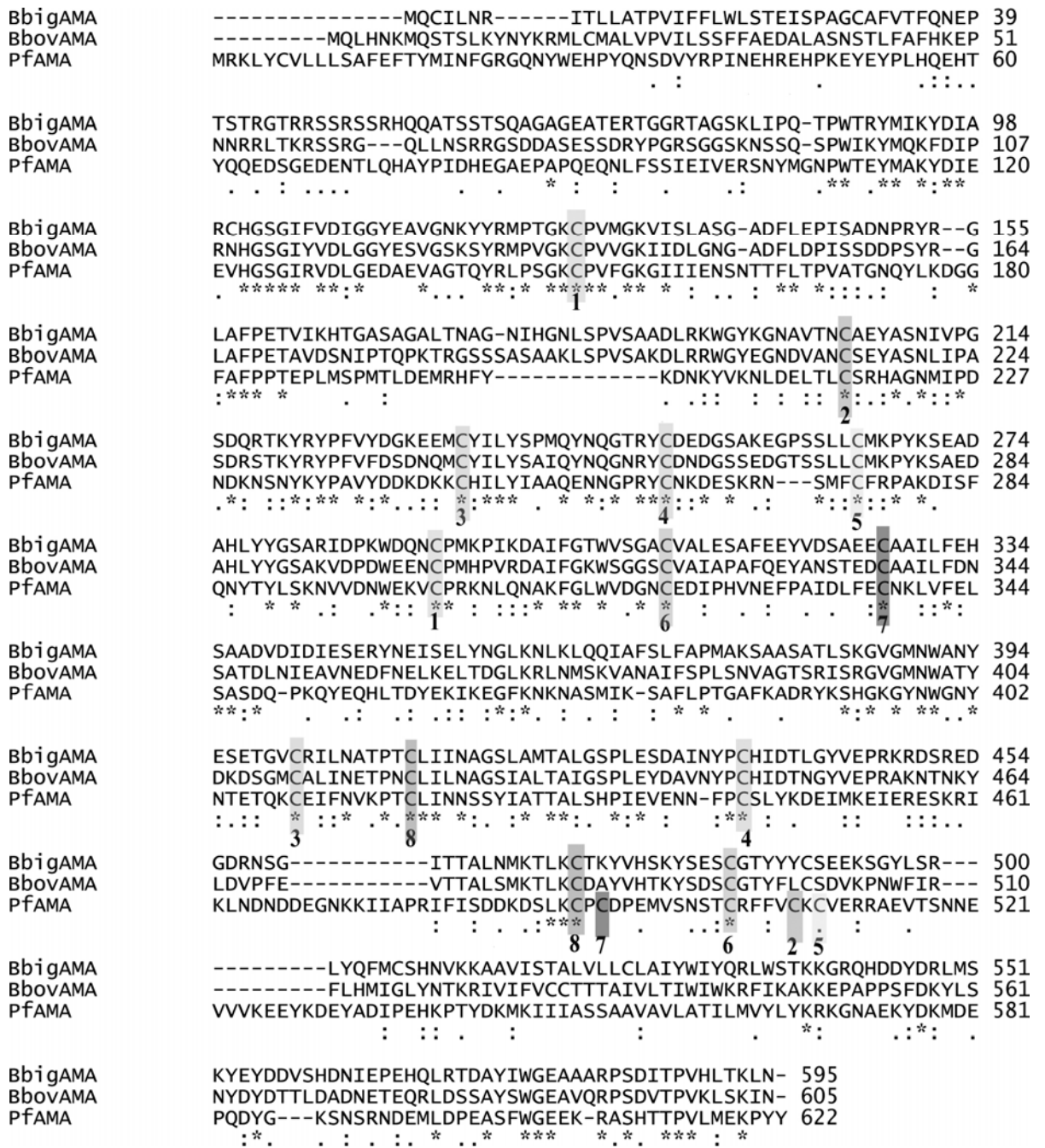


Figura 30: Allineamento multiplo delle sequenze delle proteine AMA-1 di *B. bigemina* (BbigAMA), *B. bovis* (BbovAMA) and *Plasmodium falciparum* (PfAMA). "*" indica che i residui presenti in quella colonna sono identici in tutte le sequenze dell'allineamento. "." indica che sono state osservate sostituzioni conservative, "." indica che sono state osservate sostituzioni semi-conservative. Le coppie di residui di Cisteina che formano legami disolfuro in AMA-1 di *P. falciparum* sono evidenziate e associate mediante numeri.

Questo suggerisce l'ipotesi di un'omologia strutturale tra le proteine AMA-1. In particolare sono cinque le coppie di cisteine che in *B. bigemina* presentano entrambi i residui conservati rispetto a *Plasmodio*, mentre in ciascuna delle restanti tre coppie presenti in *Plasmodio* solo una cisteina per coppia risulta conservata in *B. bigemina*.

L’allineamento tra i ceppi italiani ha mostrato che le 13 cisteine che risultavano conservate rispetto alla sequenza AMA-1 di *P. falciparum* continuano ad essere conservate in tutti i ceppi italiani e stranieri (Figura 31).

VMRD	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
ITA7PA	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Ita4PG	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
ITA5RG	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQDEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Ita3	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
ITA8CT	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
ITA6PA	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Argentina	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRTRSSRHQQATSS	60
Ita1	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPTGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Ita2	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Mexico	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSMEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS	60
Australia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRNQATSS	60
	*****:*****:*****:*****:*****	
VMRD	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
ITA7PA	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Ita4PG	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
ITA5RG	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Ita3	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
ITA8CT	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
ITA6PA	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Argentina	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Ita1	TSEAGAGEATERAGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Ita2	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Mexico	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
Australia	TSQAGAGEATERTGGRAAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY	120
	:*:***:*****:*****:*****:*****	
	1	
VMRD	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
ITA7PA	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Ita4PG	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
ITA5RG	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Ita3	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
ITA8CT	RMPTGKCPDMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
ITA6PA	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Argentina	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLXFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Ita1	RMPTGKCPVMGKVISLASGADLLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Ita2	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Mexico	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGNIH	180
Australia	RMPTGKCPVMGKVINLASGADFLEPISADNPRYRGLAFFETVIKHTGASAGALTNAGSIH	180
	***** .*****:*****:*****:*****:***** .**	
	2	3
VMRD	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
ITA7PA	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Ita4PG	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
ITA5RG	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Ita3	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
ITA8CT	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
ITA6PA	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Argentina	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Ita1	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Ita2	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Mexico	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
Australia	GNLSPVSAADLRKWGYKGNVNTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP	240
	*****:*****:*****:*****:*****	


```

4           5           1
VMRD      MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
ITA7PA    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Ita4PG    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
ITA5RG    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Ita3      MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
ITA8CT    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
ITA6PA    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Argentina MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Ita1      MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Ita2      MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Mexico    MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
Australia MQYNQGTRYCDEDGSAKEG PSSLLCMKPKYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA 300
*****

6           7
VMRD      IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
ITA7PA    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Ita4PG    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
ITA5RG    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Ita3      IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
ITA8CT    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
ITA6PA    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Argentina IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Ita1      IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Ita2      IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Mexico    IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
Australia IFGTWVSGACVALES AFEEYVDSAEECAAILFEHSAADVDIDIESERYNEISELYNGLKN 360
*****

3           8
VMRD      LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
ITA7PA    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Ita4PG    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
ITA5RG    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Ita3      LKLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
ITA8CT    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
ITA6PA    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Argentina LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Ita1      LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Ita2      LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Mexico    LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
Australia LHLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIIINAGSLAM 420
*:*:*****

4           8
VMRD      TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
ITA7PA    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Ita4PG    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
ITA5RG    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Ita3      TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
ITA8CT    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
ITA6PA    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Argentina TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Ita1      TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Ita2      TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Mexico    TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
Australia TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRD SREDGDRNSGITTALNMKTLKCTKYVHSKY 480
*****

6
VMRD      SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
ITA7PA    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Ita4PG    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
ITA5RG    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Ita3      SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
ITA8CT    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
ITA6PA    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Argentina SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Ita1      SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Ita2      SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Mexico    SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
Australia SESCGTYCYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG 540
*****

```

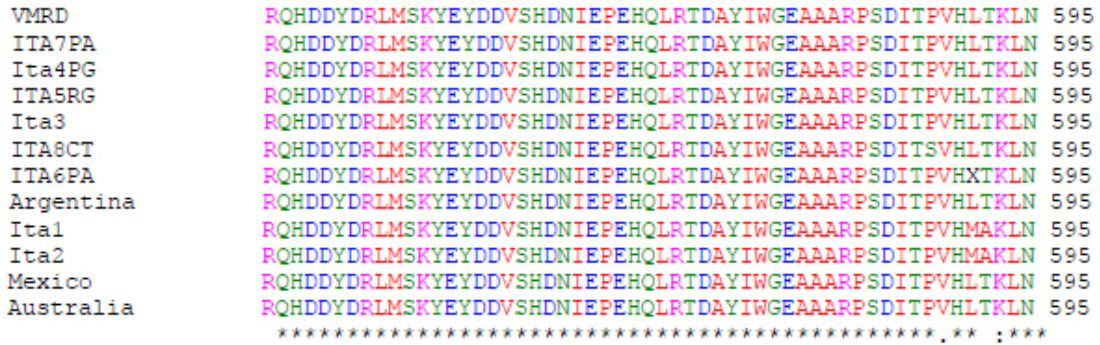


Figura 31: Allineamento multiplo tra le sequenze AMA-1 dei ceppi italiani disponibili e sequenze dei ceppi stranieri. Le cisteine che l’analisi bioinformatica aveva identificato come coinvolte nella formazione di legami disolfuro e che risultavano conservate rispetto alla sequenza AMA-1 di *P. falciparum* continuano ad essere conservate in tutti i ceppi italiani e stranieri. Tali di residui di Cisteina sono evidenziati e accoppiati mediante numeri. In particolare sono cinque le coppie di cisteine che in *B.bigemina* presentano entrambi i residui conservati rispetto a *Plasmodio* (corrispondenti in figura alle cisteine 1, 3, 4, 6 e 8, evidenziate in grigio). Solo una cisteine per ciascuna delle restanti tre coppie presenti in *Plasmodio* risulta conservata in *B.bigemina* (corrispondenti alle cisteine indicate con i numeri 2, 5 e 7 ed evidenziate in azzurro).

Predizione di peptide antigenici

La sequenza di 565 aminoacidi della proteina italiana matura (sequenza *consensus*) è stata analizzata mediante il software **Predicting Antigenic Peptides** al fine di ricercare epitopi per le cellule B (Figura 32). Diciannove peptidi differenti sono stati identificati dal software di cui 14 completamente conservati tra i ceppi italiani e stranieri.

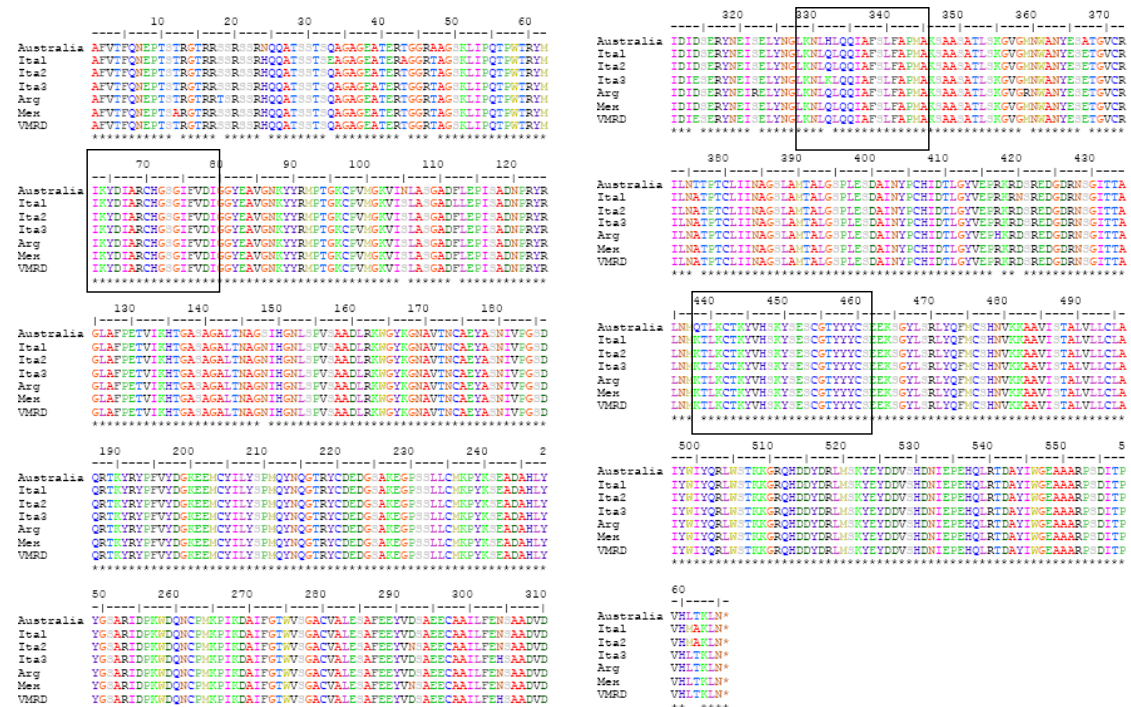


Figura 32. L’analisi della sequenza aminoacidica della proteina italiana matura (sequenza *consensus*) mediante il software Predicting Antigenic Peptides ha mostrato la presenza di 14 epitopi per le cellule B conservati tra i ceppi italiani e australiano. In figura è mostrata la posizione dei tre epitopi di maggiori dimensioni.

Analisi filogenetica

Un’analisi filogenetica è stata condotta sui ceppi analizzati utilizzando la regione codificante del gene AMA-1. L’albero filogenetico (Figura 33) è stato creato attraverso il metodo Neighbor-Joining. L’analisi ha mostrato che le distanze evolutive tra i ceppi erano molto piccole ma non si osservava una correlazione tra distanza geografica e filogenetica.

Phylogram



Figura 33. Albero filogenetico costruito utilizzando le sequenze del gene AMA-1 dei ceppi italiani disponibili e sequenze dei ceppi stranieri (Neighbor-Joining).

La proteina AMA-1: uno sguardo agli altri Apicomplexa

La seguente analisi completa lo studio condotto sulla proteina AMA-1 di *Babesia bigemina* e le sue caratteristiche mediante un confronto fra le proteine AMA-1 presenti in diversi organismi del Phylum Apicomplexa. Tale Phylum comprende un elevato numero di microrganismi, molti dei quali in grado di parassitare l’uomo o alcune specie animali. La loro comune origine filogenetica si riflette nella presenza di proteine chiave necessarie alla loro sopravvivenza. Alcune di tali proteine sono state studiate nei diversi organismi allo scopo di ottenere informazioni utili in vista della possibile messa a punto di un vaccino. Le proteine Apical Membrane Antigen-1 sono presenti in numerosi organismi apicomplexa e sono implicate nell’interazione tra il parassita e la cellula bersaglio. Al fine di ricercare la presenza di regioni conservate sono state analizzate e comparate le sequenze aminoacidiche delle proteine AMA-1 di diversi parassiti (numeri d’accesso riportati in tabella 11) appartenenti al genere *Babesia* (*B. bigemina*, *B. bovis* e *B. divergens*, che infettano i bovini, *B. gibsoni*, agente eziologico della babesiosi nei cani) così come di organismi dei generi *Plasmodium* (*P. falciparum*, agente della malaria nell’uomo, e *P. knowlesi*, patogeno delle scimmie in grado di infettare anche

l’uomo), *Theileria* (*T. annulata* e *T. parva*, entrambi patogeni dei bovini) e dell’organismo *Toxoplasma gondii*, protista parassitario che vive nei gatti e in altri animali a sangue caldo e può causare la toxoplasmosi nell'uomo.

Organismo	Accession number
<i>Babesia bigemina</i>	GQ257738 (ITA1)
<i>Babesia bovis</i>	XM_001610993.1
<i>Babesia gibsoni</i>	FJ804755.1
<i>Babesia divergens</i>	EU486539
<i>Plasmodium falciparum</i>	XM_001347979.1
<i>Plasmodium knowlesi</i>	XM_002259303.1
<i>Theileria annulata</i>	M_949044.1
<i>Theileria parva</i>	XM_761078.1
<i>Toxoplasma gondii</i>	XM_002364710.1

Tabella 11. Numeri d’accesso delle sequenze aminoacidiche della proteina AMA-1 provenienti da diversi Apicomplexa utilizzate per l’analisi descritta nel testo.

L’analisi delle sequenze (mostrata in parte in Figura 34) ha indicato la presenza di numerose regioni altamente conservate tra i diversi organismi analizzati.

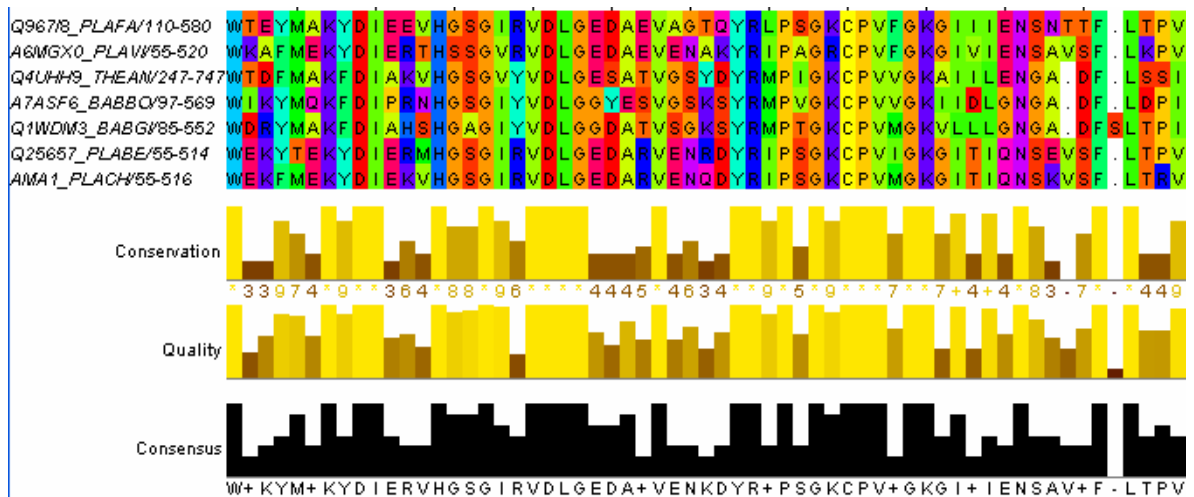


Figura 34. L’analisi delle sequenze aminoacidiche della proteina AMA-1 provenienti da diversi Apicomplexa ha mostrato la presenza di numero regioni altamente conservate tra i diversi organismi.

La distanza evolutiva è stata calcolata sia in termini di aminoacidi (distanza evolutiva media pari allo 0.869, **Figura 35a**), che di nucleotidi (distanza evolutiva media pari allo 0.921, **Figura 35b**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Plasmodiumknowlesi</i>									
2. <i>Plasmodiumfalciparum</i>	0.542								
3. <i>Theileriaannulata</i>	1.099	1.047							
4. <i>Theileriaparva</i>	1.099	1.007	0.051						
5. <i>Babesiagibsoni</i>	0.960	1.027	0.744	0.737					
6. <i>abesiadivergens</i>	1.120	1.047	0.707	0.722	0.460				
7. <i>Babesiabigemina</i>	1.067	1.047	0.693	0.693	0.489	0.405			
8. <i>Babesiabovis</i>	1.078	1.057	0.679	0.693	0.489	0.466	0.438		
9. <i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i>	1.235	1.176	1.176	1.176	1.142	1.272	1.223	1.211	

Figura 35a. Distanza evolutiva tra le sequenze aminoacidiche (pairwise alignment).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Plasmodiumknowlesi</i>									
2. <i>Plasmodiumfalciparum</i>	0.509								
3. <i>Theileriaannulata</i>	1.037	1.011							
4. <i>Theileriaparva</i>	1.069	1.030	0.103						
5. <i>Babesiabovis</i>	1.039	1.039	0.788	0.815					
6. <i>Babesiadivergens</i>	1.191	1.078	0.838	0.852	0.549				
7. <i>Babesiabigemina</i>	1.164	1.219	0.806	0.818	0.558	0.549			
8. <i>Babesiagibsoni</i>	1.008	0.963	0.736	0.738	0.570	0.551	0.612		
9. <i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i>	1.415	1.300	1.205	1.217	1.232	1.335	1.160	1.064	

Figura 35b. Distanza evolutiva tra le sequenze nucleotidiche (pairwise alignment).

È stata condotta un’analisi filogenetica utilizzando la regione codificante del gene AMA-1 dei diversi Apicomplexa considerati. L’albero filogenetico è stato creato attraverso il metodo Neighbor-Joining e il risultato di tale analisi è mostrato in Figura 36. L’analisi filogenetica ha mostrato che le specie appartenenti al genere *Babesia* non sempre si ritrovano nell’albero vicine fra loro, come accadeva invece per le specie degli altri generi considerati.

Phylogram

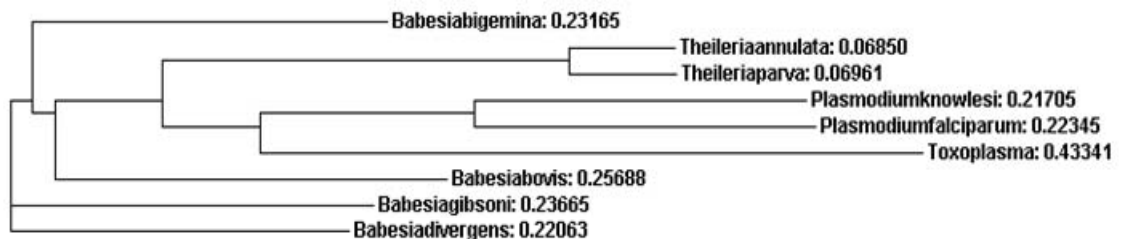


Figura 36. Albero filogenetico costruito utilizzando le sequenze del gene AMA-1 dei diversi Apicomplexa considerati (Neighbor-Joining).

Per quanto riguarda l’analisi della struttura predittiva delle proteine in questione, è stato interessante notare come, ad eccezione delle specie esaminate appartenenti al genere *Theileria*, tutte presentano un peptide segnale di indirizzamento alla membrana. Tutte le specie analizzate inoltre presentano un’elica trans-membrana nella regione C-terminale della proteina che divide la regione extracellulare della proteina dalla corta coda intracellulare. In tabella 12 sono riportate le posizioni di tali strutture per ciascuna delle proteine studiate.

Organismo	SP (Signal P software)	TM (TMHMM software)
<i>Babesia bigemina</i>	30-31	513-531
<i>Babesia bovis</i>	39-40	523-541
<i>Babesia gibsoni</i>	32-33	513-535
<i>Babesia divergens</i>	30-31	524-541
<i>Plasmodium falciparum</i>	24-25	547-566
<i>Plasmodium knowlesi</i>	21-22	485-507
<i>Theileria annulata</i>	assente	693-715
<i>Theileria parva</i>	assente	697-719
<i>Toxoplasma gondii</i>	41-42	485-507

Tabella 12. Posizione in ciascuna sequenza aminoacidica considerata del peptide segnale di indirizzamento alla membrana (SP) e dell’elica transmembrana (TM).

Attraverso il software DiANNA 1.1 è stata predetta la presenza di 16 cisteine potenzialmente implicate nella formazione di legami disolfuro. L’allineamento multiplo delle sequenze ha mostrato che 13 di tali residui, gli stessi identificati nell’analisi comparativa condotta in precedenza, sono conservati nelle sequenze di tutti gli organismi analizzati (Figura 37).

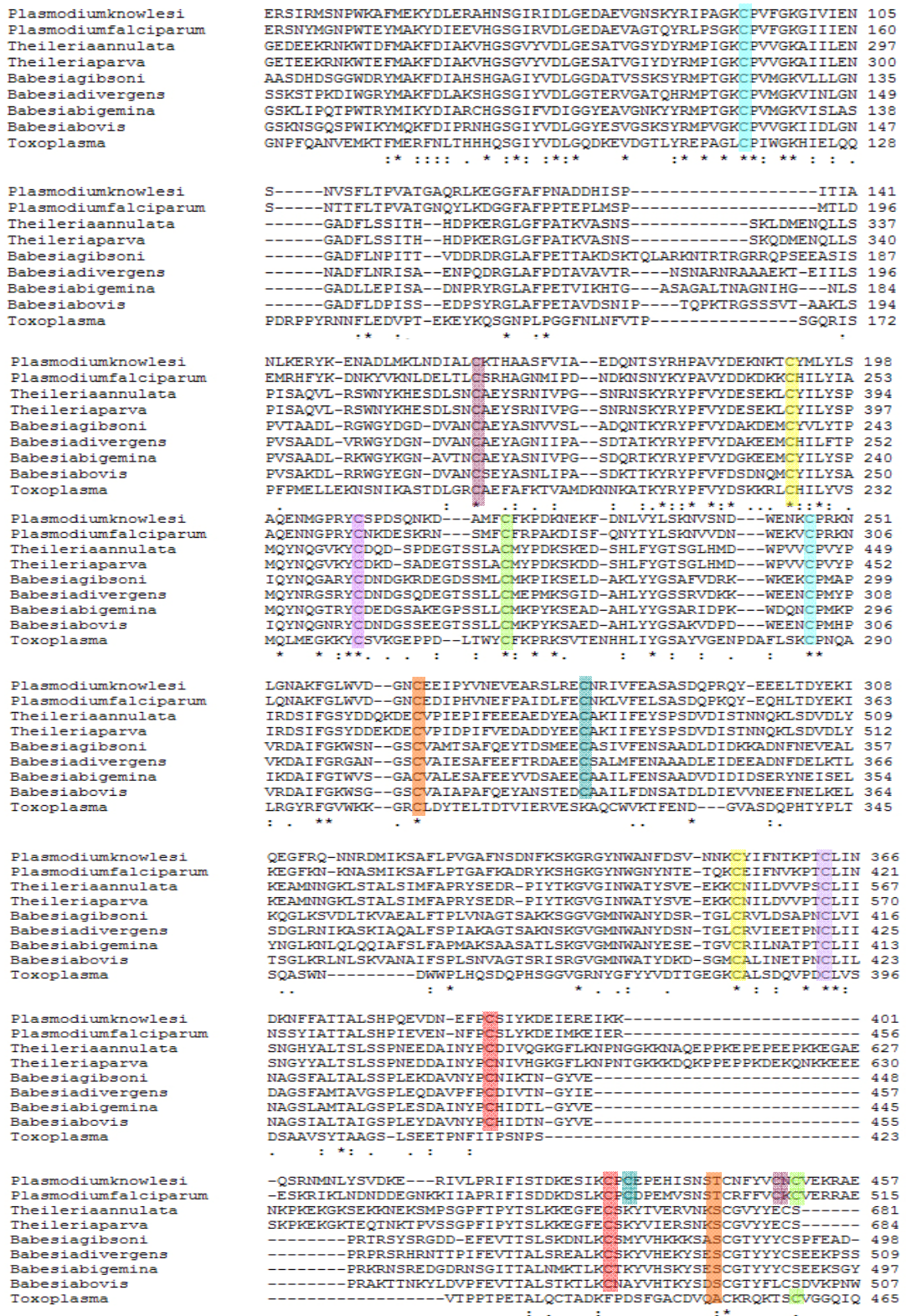


Figura 37. Allineamento multiplo tra le sequenze AMA-1 degli organismi analizzati. La gran parte delle cisteine che l’analisi bioinformatica ha identificato come coinvolte nella formazione di legami disolfuro sono conservate in tutti i gli organismi.

Infine è stata condotta l’analisi della struttura tridimensionale predittiva attraverso il Server CPHmodels 3.0 che permette di predire la struttura delle proteine sulla base della similarità della sequenza rispetto a quella di proteine la cui struttura conformazionale è già nota (protein homology modeling). Tale analisi ha mostrato una notevole similarità di struttura (Figure 38a-h).

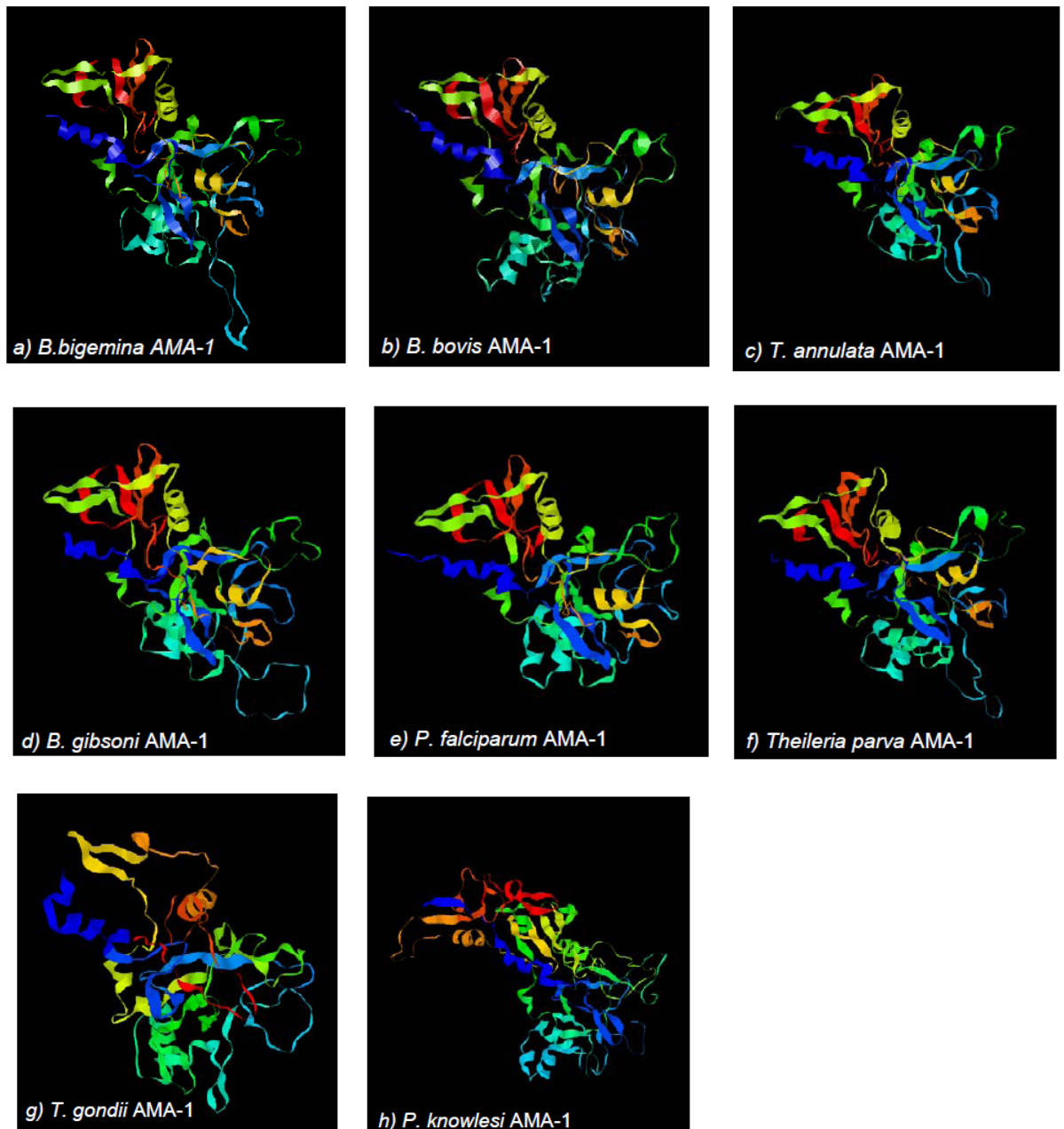


Figure 39a-h. Strutture tridimensionali predittive ottenute attraverso il modello CHP delle proteine AMA-1 dei diversi organismi analizzati.

4.5.2. Putativa Spherical Body Protein 1 (SBP-1)

Clonaggio della regione codificante per la proteina SBP e analisi delle sequenze ottenute.

A partire da un campione italiano di *Babesia bigemina* è stata amplificata, grazie ad una coppia di primers (suggerita dal Prof. Mosqueda, de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico, vedi Materiali e Metodi) che si appaiano a sequenze poste a monte e a valle di una regione di 1.1.Kb identificata inizialmente quale possibile omologo del gene SBP-1 di *B.bovis*.

Il prodotto di amplificazione ottenuto tramite PCR è stato visualizzato su gel d’agarosio 1.2% (Figura 39), purificato, quantizzato e clonato in vettore Topo TA 2.1 con cui sono poi state trasformate cellule Top10 di *E.coli*.

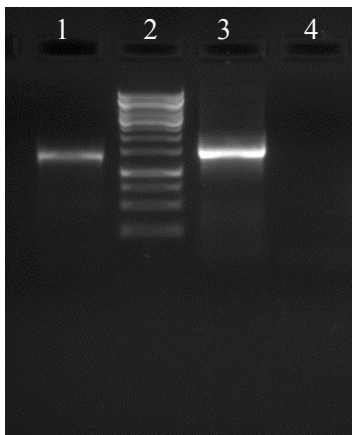


Figura 39. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla putativa regione SBP ottenuta a partire dai campioni ITA1 (corsia 1); marcatore di peso molecolare (corsia 2); campione VMRD come controllo positivo (corsia 3); controllo negativo (corsia 4).

Parte di tali cellule sono state utilizzate per la conservazione a lungo termine a -80°C , altre sono state utilizzate per l’estrazione di DNA plasmidico. I plasmidi estratti sono stati analizzati mediante amplificazione per PCR, al fine di individuare quali di essi contenevano l’inserito delle dimensioni attese (Figura 40). Tre dei plasmidi positivi ottenuti sono dunque stati inviati alla ditta Macrogen.Inc per il sequenziamento.

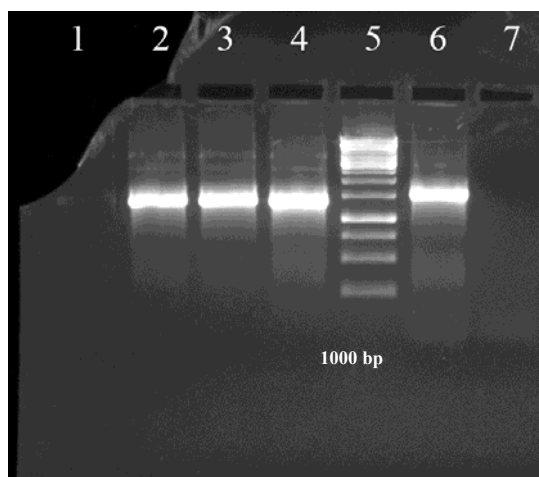
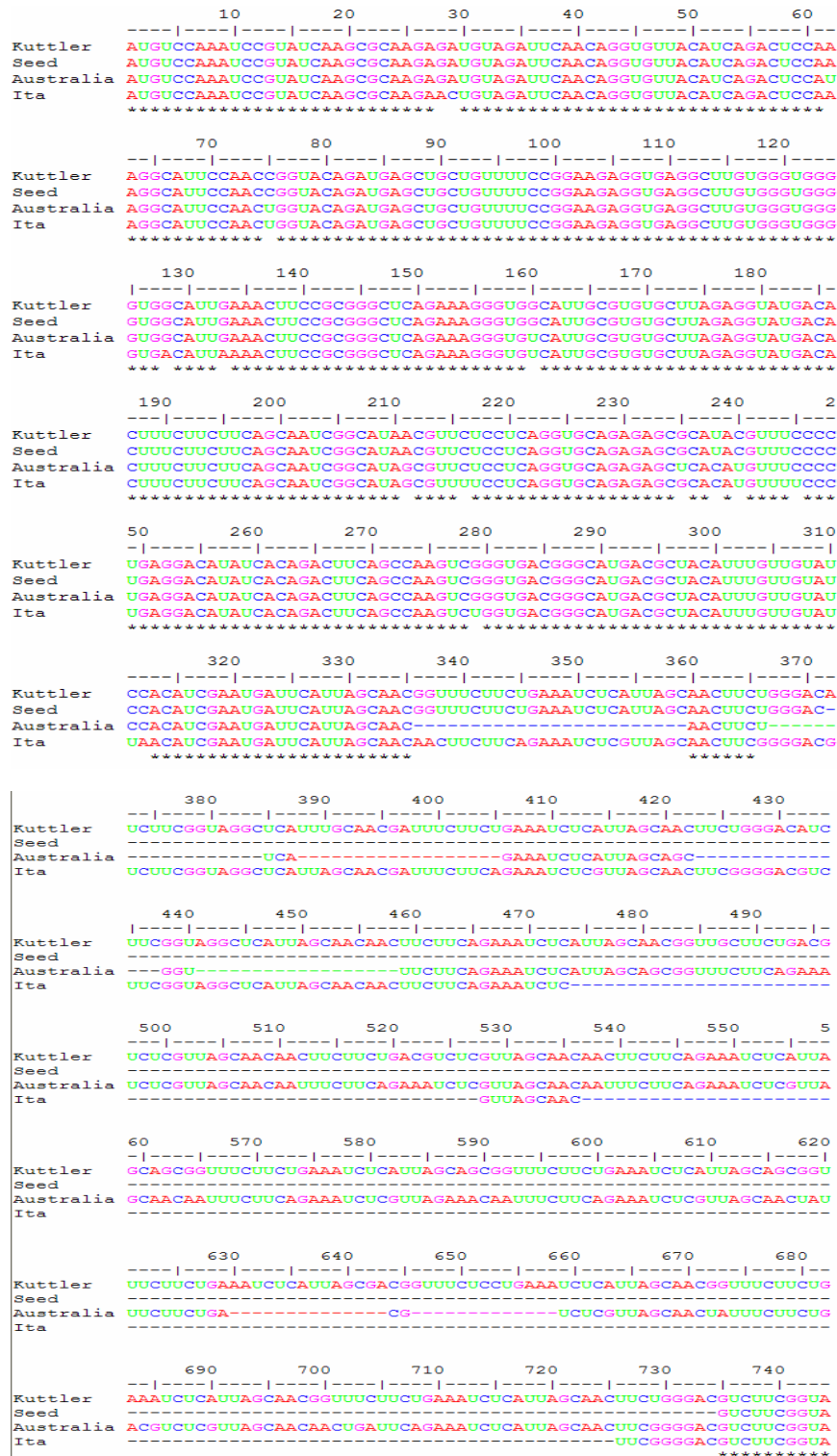


Figura 40. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla putativa regione SBP ottenuta a partire da plasmidi estratti a partire da quattro colonie bianche in seguito a trasformazione di cellule competenti di Top10 di *E.coli* con il vettore Topo TA 2.1 in cui era stato clonato il gene SBP-1 proveniente dal campione ITA1 (corsie 1-4); campione VMRD come controllo positivo (corsia 6); controllo negativo (corsia 7); Ladder (corsia 5).

Confronto delle sequenze nucleotidiche ottenute tra i ceppi Italiani e stranieri di *B. bigemina*.

La sequenza del ceppo italiano è stata confrontata con la sequenza corrispondente del ceppo australiano (Figura 41), che, essendo il suo genoma interamente sequenziato, è stato considerato come ceppo di riferimento, e con quella di due ceppi messicani (Kuttler e Seed, in Figura 41).



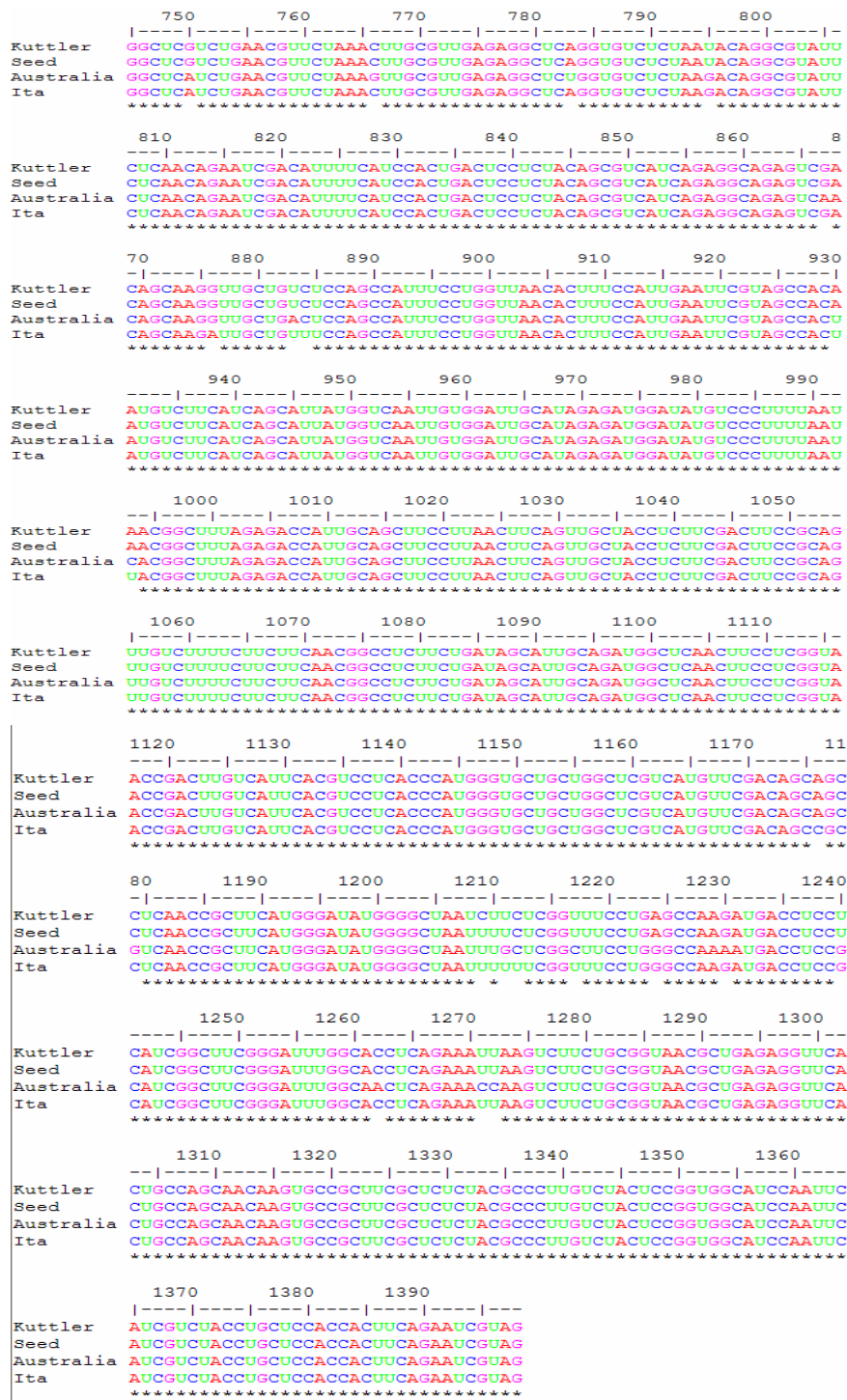


Figura 41. Allineamento delle sequenze nucleotidiche dei ceppi italiani (Ita), australiani (Australia) e messicani (Kuttler e Seed).

Come è possibile osservare dall’allineamento delle sequenze, esse risultano molto conservate ad eccezione di una regione centrale che presenta delezioni di lunghezza variabile tra i ceppi analizzati, caratteristica che, se confermata in un numero più ampio di sequenze, potrebbe rendere tale gene un buon candidato anche come marcatore molecolare per la discriminazione dei ceppi. L’analisi della sequenza aminoacidica della proteina mediante i software SignalP e TMHMM ha rilevato l’assenza sia di un peptide segnale che di un’elica transmembrana. Il peso molecolare stimato risulta essere di 37.8KDa, il punto isoelettrico risulta 4.39, mentre l’analisi dell’indice di instabilità ($46.75 > 40$) ha classificato la proteina come instabile (ProtParam, EXPASY). La sequenza aminoacidica della proteina è stata analizzata mediante il software Predicting Antigenic Peptides al fine di ricercare epitopi per le cellule B. Numerosi peptidi differenti sono stati identificati dal software. Di essi, i tre epitopi di maggiori dimensioni (mostrati in Figura 42) sono risultati conservati tra i ceppi analizzati.

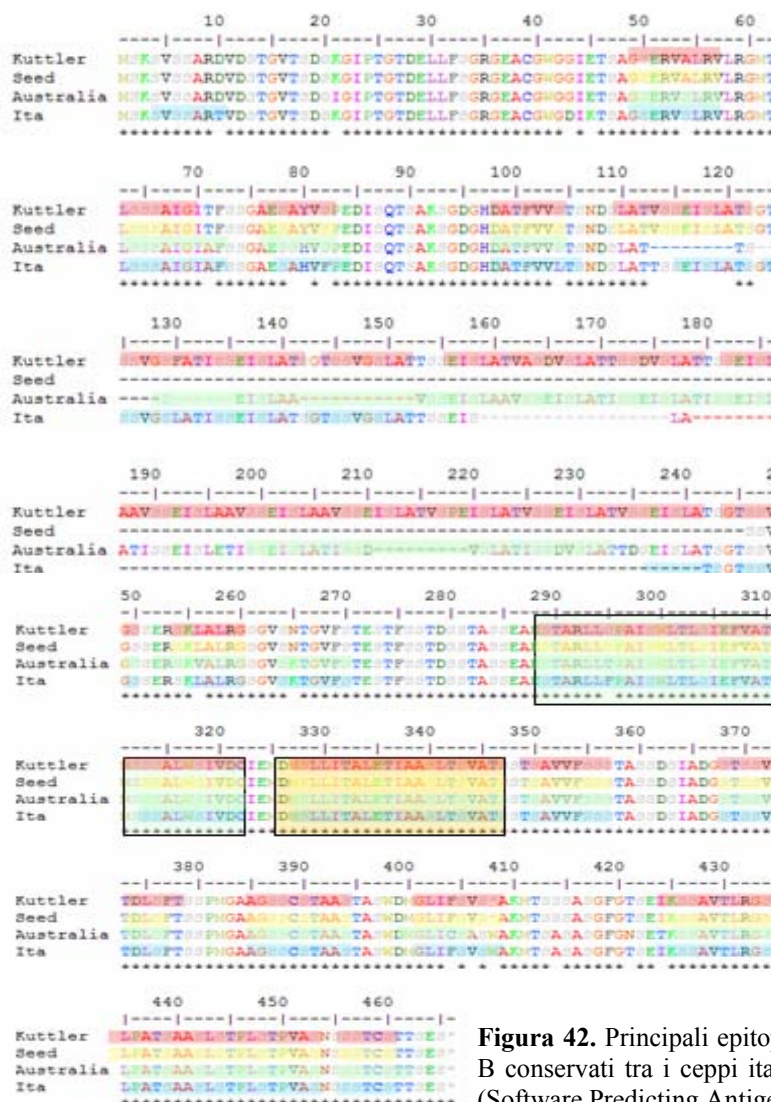


Figura 42. Principali epitopi per le cellule B conservati tra i ceppi italiani e stranieri (Software Predicting Antigenic Peptides).

Tuttavia, il confronto tra le sequenze ottenute dai campioni di *B.bigemina* e quelle corrispondenti alle regioni codificanti le proteine SBP-1 in *B.bovis* presenti in banca dati hanno mostrato bassi livelli di similarità. Tali osservazioni suggerivano che la regione presa in considerazione con buona probabilità non codificava per l'omologo di SBP-1. Anche il confronto con tutte le sequenze depositate in GenBank non ha fornito risultati significativi di similarità, suggerendo che la regione amplificata potrebbe codificare per una proteina non ancora caratterizzata (*unknown protein*), da noi chiamata UP, della quale sarebbe stato interessante valutare le eventuali proprietà immunogene (vedi oltre).

4.5.3. Glycoprotein gp45 (GP45)

Con l’obiettivo di individuare potenziali candidati vaccinali, anche le sequenze del gene gp45 derivanti da ceppi italiani sono state analizzate e confrontate con quelle riportate in banca dati. Questa analisi, oggetto di una presentazione a congresso internazionale, fornisce utili informazioni sulle caratteristiche del gene gp45 nei ceppi italiani del parassita e alcune informazioni predittive relative alla proteina ottenute attraverso strumenti bioinformatici e costituisce il primo studio della sequenza del gene gp45 in da ceppi provenienti dall’Italia. L’intera regione codificante del gene gp45 (1056 bp) è stata amplificata a partire da un ceppo italiano di *Babesia bigemina*. In Figura 43 corsie 1-2 è mostrato il prodotto di amplificazione generato dalla PCR condotta a partire dal genoma del campione ITA1 utilizzando una coppia di primers, Gp45F/Gp45R, (suggerita dal Prof. Juan Mosqueda, de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico, vedi Materiali e Metodi) tale da permettere l’amplificazione dell’intera ORF.

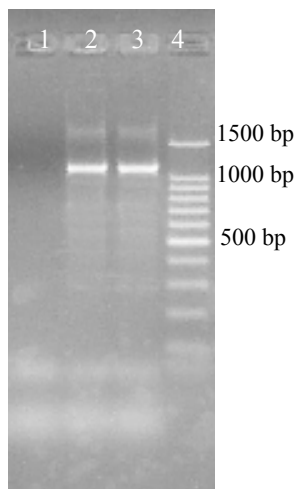


Figura 43. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione GP45 ottenuta a partire dai campioni ITA1 (corsia 3); campione VMRD come controllo positivo (corsia 2); controllo negativo (corsia 1), marcatore di peso molecolare SharpMass100 - DNA Ladder™ 100 bp Euroclone (corsia 4).

Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato purificato, quantizzato e clonato in vettore Topo TA 2.1 con cui sono poi state trasformate cellule Top10 di *E.coli*. Sul DNA plasmidico estratto da singole colonie di cellule batteriche trasformate è stata eseguita la PCR con i primers specifici GP45F/R (vedi Materiali e Metodi) al fine di individuare quali di essi contenevano l’inserito delle dimensioni attese. Il DNA plasmidico estratto da due differenti colonie è stato inviato alla ditta MacroGen.Inc per il sequenziamento. Reverse che si appaiano a sequenze del vettore. Le sequenze gp45 presenti nei plasmidi ottenuti sono risultate identiche tra loro. Il gene risulta costituito da 1059 bp e codifica per una proteina di 352 aminoacidi. Il peso molecolare stimato risulta essere di 39394.3 Il punto isoelettrico risulta 4.99, mentre l’analisi dell’indice di instabilità ($36.26 < 40$)

ha classificato la proteina come stabile (ProtParam, EXPASY). Attraverso il software **SignalP** (Fig.26 a e b) è stata predetta la presenza, in prossimità del dominio N-terminale della proteina GP45 di *B. bigemina*, di un peptide segnale di 21 aminoacidi.

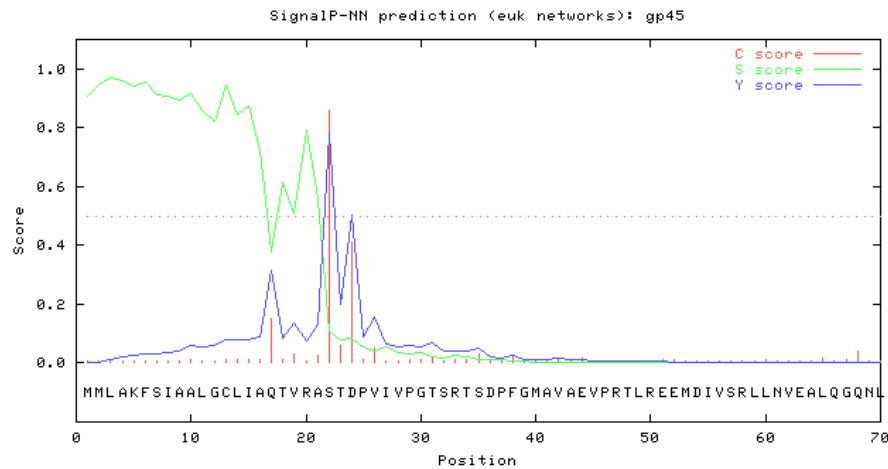


Figura 44a. Predizione del peptide segnale in *B.bigemina* GP-45 attraverso il software Signal peptide (SignalP). S-score: per ciascun aminoacido viene riportato il punteggio associato alla probabilità di far parte del peptide segnale. C-score: punteggio associato alla probabilità che un aminoacido formi il sito di taglio. Y-score: punteggio derivato dal C-score in combinazione con i dati dell’S-score, risulta in una più accurata predizione del sito di taglio.

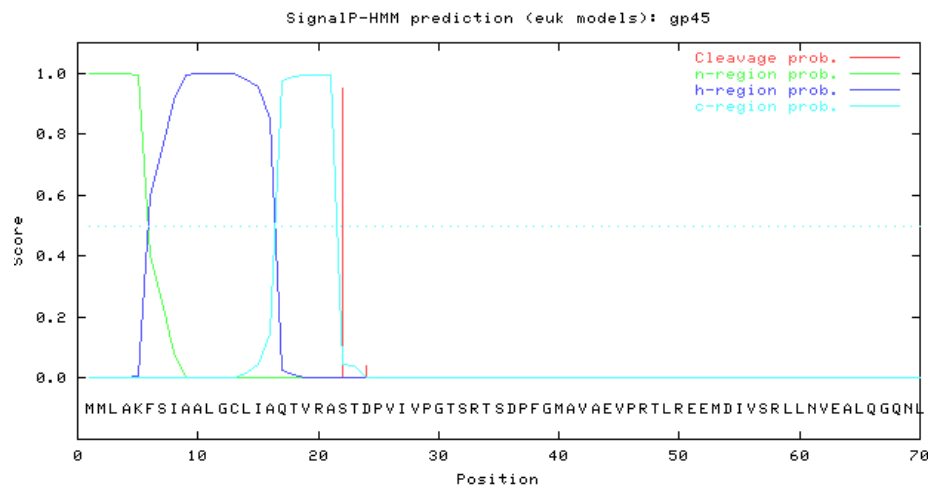


Figura 44b. Signal peptide (SignalP) in *B.bigemina* GP-45.

Viene riportato il punteggio associato alla probabilità di formazione del sito di taglio (Cleavage prob) insieme ai punteggi calcolati per le regioni N-terminale carica positivamente, centrale idrofobica e C-terminale polare del peptide segnale (n-region, h-region e c-region, rispettivamente).

L’analisi della sequenza aminoacidica della proteina attraverso il software **TMHMM** (Figura 45), ha confermato anche nei ceppi italiani l’assenza di un’elica TM.

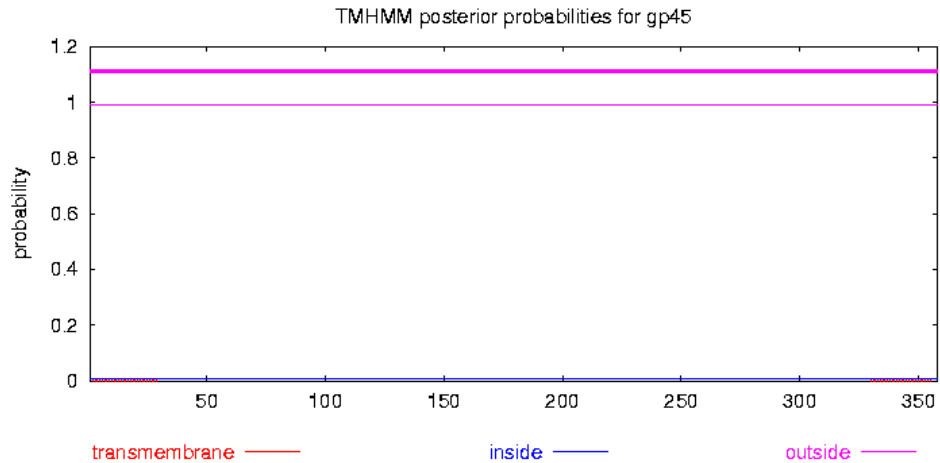


Figura 45: L’analisi della sequenza aminoacidica della proteina GP45 di *B.bigemina* attraverso il software **TMHMM** mostra l’assenza di un’elica TM.

Uno studio bioinformatico è stato condotto utilizzando il server **gpi** (Ferre and Clote, 2005; Ferre and Clote, 2006), al fine di confermare nella proteina GP-45 di *B.bigemina* la presenza di eventuali siti di legame per ancore di GPI. I risultati hanno mostrato la presenza di 1 possibile sito presumibilmente implicato nel legame dell’ancora di GPI in prossimità dell’aminoacido 328, confermando i dati precedentemente riportati (Fisher *et al.*, 2001).

La sequenza del ceppo italiano è stata confrontata con la sequenza corrispondente del ceppo messicano, unica sequenza disponibile in banca dati (AF298630.1). L’analisi comparativa condotta con il ceppo Messicano di *B. bigemina* ha mostrato una percentuale di identità a livello delle sequenze nucleotidiche pari al 73.78 %. Sono state inoltre analizzate e confrontate le sequenze aminoacidiche delle proteine gp45 dei ceppi italiano e messicano. Le sequenze mostravano una percentuale di identità del 64.08%. La Figura 46 mostra l’allineamento di tali sequenze proteiche. La prima parte delle sequenze mostra un elevato grado di identità, mentre un consistente grado di variabilità è osservabile nella regione centrale della proteina. Infine la regione terminale della proteina presenta nuovamente un elevato grado di similarità.



Figura 46. Allineamento delle sequenze aminoacidiche di gp45 del ceppo italiano e del ceppo australiano. L’analisi è stata condotta utilizzando l’algoritmo ClustalW.

4.5.4. Rhoptry Associated Protein 1b (RAP-1b)

Le proteine del rostro della famiglia **rap-1** sono considerate tra i più importanti candidati per lo sviluppo di vaccini contro la babesiosi bovina. L’analisi descritta nel presente studio è stata rivolta al gene *rap1-b*. Al fine di amplificare l’intera regione codificante stata utilizzata una coppia di primers (Rap-1bF/Rap-1bR, vedi Materiali e Metodi), disegnata dal Prof. Carlos E. Suarez, Dipartimento di Microbiologia e Patologia Veterinarie, Washington State University, Pullman, USA. Tale coppia di primers è stata utilizzata per l’amplificazione del gene *rap1b* a partire da due ceppi italiani (ITA1 e ITA6). Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato agli UV in seguito a frazionamento elettroforetico su gel d’agarosio colorato con Etidio bromuro (Figura 47).

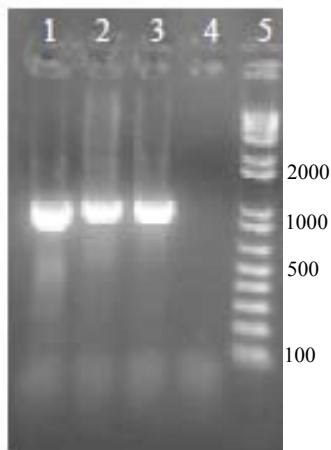


Figura 47. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione Rap-1b ottenuta a partire dai campioni ITA1 (corsia 1); ITA6 (corsia 2); campione VMRD come controllo positivo (corsia 3); controllo negativo (corsia 4), marcatore di peso molecolare Trackit 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (corsia 5).

Il prodotto di amplificazione ottenuto a partire dal DNA del campione ITA1 è stato purificato dalla miscela di reazione, quantizzato e inserito all’interno del vettore Topo2.1. Il vettore è stato utilizzato per trasformare cellule competenti TOP10 di *E.coli*. Sul DNA plasmidico estratto è stata eseguita la PCR con i primers specifici Rap-1bF/Rap1bR. Il DNA plasmidico estratto da due differenti colonie è stato inviato a Macrogen.Inc per il sequenziamento.

Il confronto della sequenza ottenuta con la sequenza presente in banca dati (AY146982, ceppo americano) ha permesso di apprezzare un elevato grado di identità tra le sequenze tanto a livello nucleotico che aminoacidico (Figura 48).

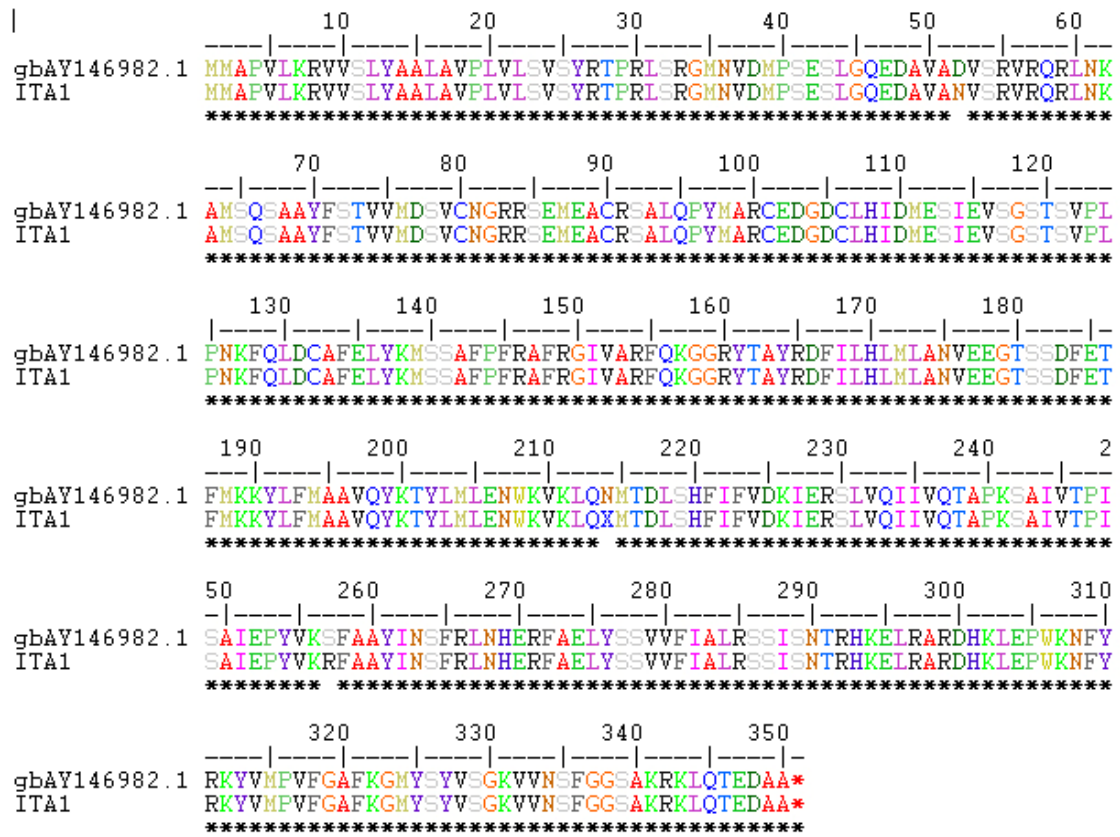


Figura 48. Allineamento multiplo tra la sequenza Rap1b del ceppo italiano ITA1 e la sequenza del ceppo americano.

La percentuale media di identità tra la sequenza del ceppo italiano e quelle dei ceppi stranieri a livello nucleotidico è stata stimata del 99,43%, mentre a livello aminoacidico si avevano una percentuale di identità e di similarità del 99,14% (Matrice di sostituzione: Blosum 62). Attraverso il software **SignalP** (Figure 49a e 49b) è stata confermata la presenza, in prossimità del dominio N-terminale della proteina Rap1b di *B. bigemina*, di un peptide segnale di 23 aminoacidi.

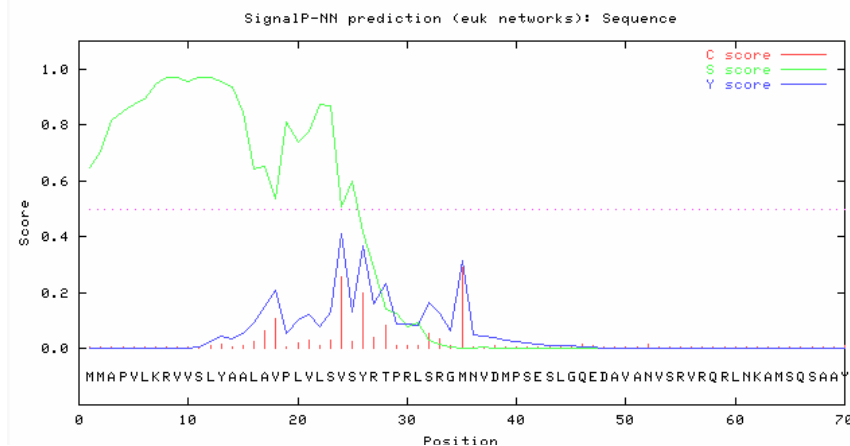


Figura. 49a Signal peptide (SignalP) in *B. bigemina* Rap1b. S-score: per ciascun aminoacido viene riportato il punteggio associato alla probabilità di far parte del peptide segnale. C-score: punteggio associato alla probabilità che un aminoacido formi il sito di taglio. Y-score: punteggio derivato dal C-score in combinazione con i dati dell’S-score, risulta in una più accurata predizione del sito di taglio.

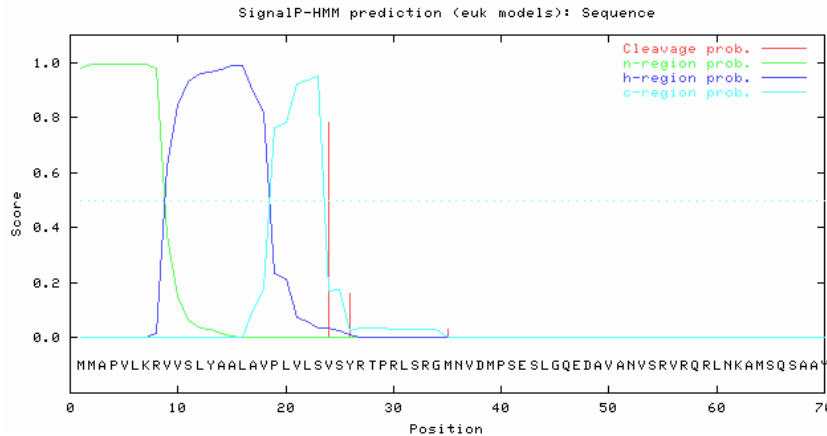


Figura 49b. Signal peptide (SignalP) in *B. bigemina* Rap1b. Viene riportato il punteggio associato alla probabilità di formazione del sito di taglio (Cleavage prob) insieme ai punteggi calcolati per le regioni N-terminale carica positivamente, centrale idrofobica e C-terminale polare del peptide segnale (n-region, h-region e c-region, rispettivamente).

4.6. Produzione proteine ricombinanti in *E. coli* e saggi di immunogenicità

4.6.1 Messa a punto del sistema di sintesi proteica in *E. coli*

Per la produzione di proteine ricombinanti si è deciso di utilizzare il sistema Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology (Invitrogen) che consente il clonaggio direzionale dei prodotti di PCR, l'espressione inducibile della proteina in *E. coli* e l'identificazione specifica attraverso il sistema Lumio. Innanzitutto si è proceduto con la verifica e la messa a punto del sistema utilizzando il plasmide controllo fornito dalla casa produttrice. Il vettore controllo pET160/CAT è stato utilizzato per trasformare cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. A partire da tale coltura cellulare è stato allestito un saggio di espressione pilota (vedi Materiali e Metodi). I lisati proteici ottenuti sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante. Al termine della corsa la proteina è stata visualizzata agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm (Figura 50). Come è possibile osservare, la proteina marcata con il sistema Lumio Tag risulta chiaramente visibile agli UV e il sistema appare altamente specifico, non risultando evidenziate bande secondarie dovute alla presenza delle altre proteine batteriche. Il sistema inducibile appare ben funzionante, dal momento che non si rilevano tracce della proteina nei campioni non indotti. La quantità di proteina prodotta incrementa con il tempo, almeno fino a due ore dall'induzione.

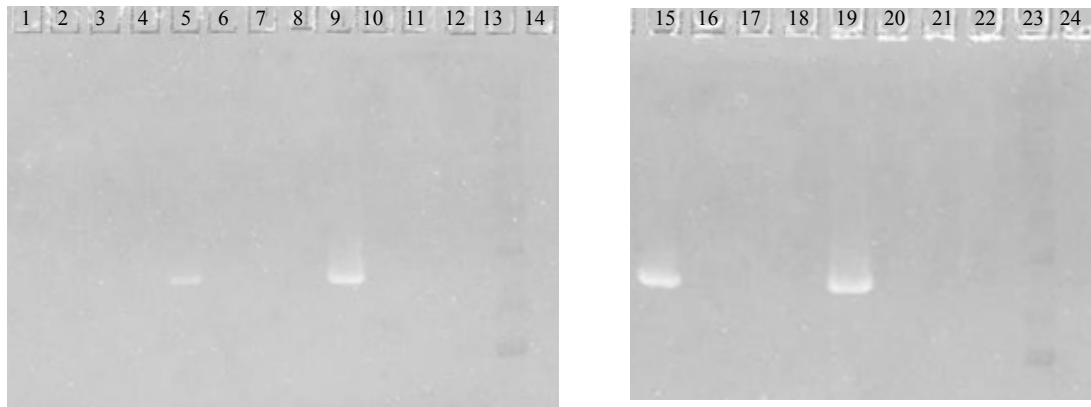


Figura 50. Frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell'estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, la proteina marcata con il sistema Lumio Tag è risultata chiaramente visibile agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm.

Corsia 1: lisato proteico campione indotto T₀

Corsia 3: lisato proteico campione non indotto T₀

Corsia 5: lisato proteico campione indotto T₁ (30' dall'induzione)

Corsia 7: lisato proteico campione non indotto T₁

Corsia 9: lisato proteico campione indotto T₂ (1h dall'induzione)

Corsia 11: lisato proteico campione non indotto T₂

Corsia 13: marcatore di peso molecolare non visibile per fluorescenza.

Corsia 15: lisato proteico campione indotto T₃ (1h30' dall'induzione)

Corsia 17: lisato proteico campione non indotto T₃

Corsia 19: lisato proteico campione indotto T₄ (2h dall'induzione)

Corsia 21: lisato proteico campione non indotto T₄

Corsia 23: marcatore di peso molecolare non visibile per fluorescenza.

4.6.2 Produzione della proteina AMA-1 *E. coli* e studio delle sue proprietà immunogene.

Trasferimento nel vettore d’espressione della sequenza nucleotidica codificante per la proteina AMA-1. Espressione della proteina in *E. coli*

Al fine di consentire l’inserimento del gene codificante per la proteina AMA-1 nel vettore d’espressione è stata condotta sul DNA dei campioni positivi a *B.bigemina* la PCR con i primers Ama160FnoSP e Ama160RevStop (vedi Materiali e Metodi). Il primer forward presenta la specifica sequenza CACC necessaria per l’inserimento direzionale e *in frame* nel vettore ed è complementare alla sequenza del gene immediatamente a valle di quella corrispondente al peptide segnale (nt 1-90), dal momento che tale regione non è presente nella proteina matura. Il primer reverse invece termina con il codone di stop naturale della proteina.

La PCR ha dato il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese (1698 bp), come mostrato in Figura 51.

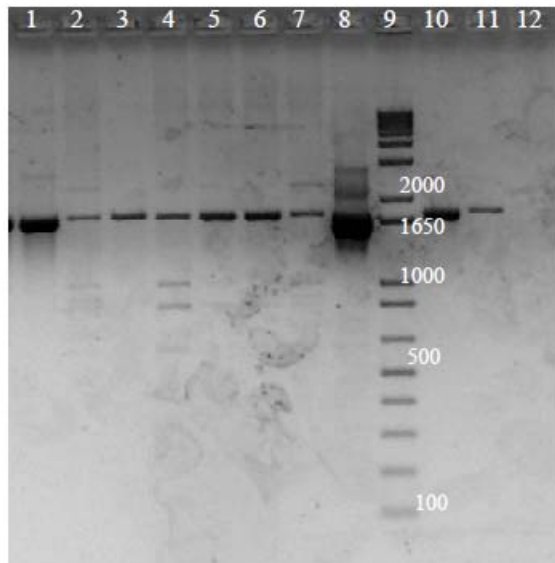


Figura 51. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione Ama1 ottenuta a partire dai campioni positivi a *B.bigemina* da ITA1a ITA8 (corsie da 1 a 8) utilizzando i primers Ama160FnoSP e Ama160RevStop; marcatore di peso molecolare Trackit 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen (corsia 9); campioni VMDR come controlli positivi (corsie 10-11); controllo negativo (corsia 12).

Il prodotto di PCR proveniente dall’amplificazione condotta sul campione ITA6 (corsia 6 in Figura 51) è stato purificato e quantizzato. 6 ng di tale prodotto di amplificazione sono stati utilizzati per l’inserimento nel vettore pET160Gw e 3µl della miscela di reazione sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti Top10 di *E.coli*, come descritto in *Materiali e Metodi*.

Aliquote crescenti di tale sospensione cellulare sono state dunque piastrate su piastre di LB-agar contenenti ampicillina 100 µg/µl. Le piastre sono state poste ad incubare a

37°C overnight. L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata a partire da cellule batteriche trasformate prelevate da una singola colonia, inocolata in 5 ml di terreno LB-BROTH contenente Ampicillina 100 µg/µl e lasciata crescere a 37°C overnight con lieve agitazione. Sul DNA plasmidico estratto è stata eseguita la PCR con i primers specifici Ama160FnoSP- Ama160RevStop. Il DNA plasmidico estratto da quattro differenti colonie è stato inviato a MacroGen.Inc per il sequenziamento utilizzando i primers universali T7 Forward e T7 Reverse e i primers interni AmaIntF e AmaIntR, che si appaiano a sequenze più interne del gene.

L'analisi delle sequenze dei plasmidi ottenuti ha confermato l'inserimento dell'intera sequenza *in frame*. Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. In parallelo, come controllo, il plasmide controllo pET160/CAT è stato utilizzato per trasformare una diversa aliquota di cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*.

Così come indicato dalla casa produttrice e come descritto in materiali e metodi, al termine della trasformazione, 500 µl di ciascuna sospensione cellulare ottenuta sono stati inoculati in 10 ml di terreno LB-BROTH contenente ampicillina 100 µg/µl.

Le sospensioni cellulari sono state poste a incubare a 37°C o.n. con lieve agitazione. Il giorno successivo, dopo averne misurato le O.D. a 600 nm, le sospensioni cellulari sono state diluite in modo da presentare un valore di densità ottica prossimo a 0.06. Le sospensioni cellulari così diluite sono state poste a incubare a 37°C con lieve agitazione. La misurazione delle O.D. a 600 nm è stata ripetuta a intervalli di circa 30 minuti fino a che non è stato raggiunto il valore di circa 0.6, indice di fase intermedia della crescita esponenziale.

Ciascuna coltura è stata allora divisa in due aliquote da 5 ml, delle quali soltanto una è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG alla concentrazione finale 0.75 mM. Le colture sono state lasciate crescere a 37°C con agitazione per circa tre ore. Ogni 30 minuti, dopo aver misurato le O.D. delle sospensioni cellulari (valori riportati in tabella 13), 500 µl di entrambe le colture sono stati prelevati, centrifugati a 13,000 × g per 10 minuti al fine di verificare se l'induzione non consentisse comunque la produzione di un'apprezzabile quantità di proteina ricombinante. Aspirato il supernatante, i pellet sono stati posti a -20°C fino a successivo processamento (vedi oltre).

	0 min	30 min	1h	1h:30'	2 h	2h:30'
AMA Indotto	0,698	1,04	1,16	1,14	1,18	1,152
AMA non indotto	0,698	1,16	1,68	1,8	2	2,146
CAT indotto	0,677	1,2	1,56	1,64	1,86	1,394
CAT non indotto	0,677	1,2	1,7	1,8	2,06	2,16

Tabella 13. Valori delle O.D. misurate a 600 nm a intervalli di trenta minuti a partire dal momento dell'induzione (tempo 0) con IPTG 0.75 mM sia per le colture cellulari indotte (AMA indotto e CAT indotto) sia per quelle non indotte (AMA non indotto e CAT non indotto).

In Figura 52 è riportato l'andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari. Come è possibile osservare, la produzione della proteina AMA-1 in seguito all'induzione sembra risultare altamente tossica per le cellule che, dopo appena mezz'ora dall'induzione, cessano di crescere.

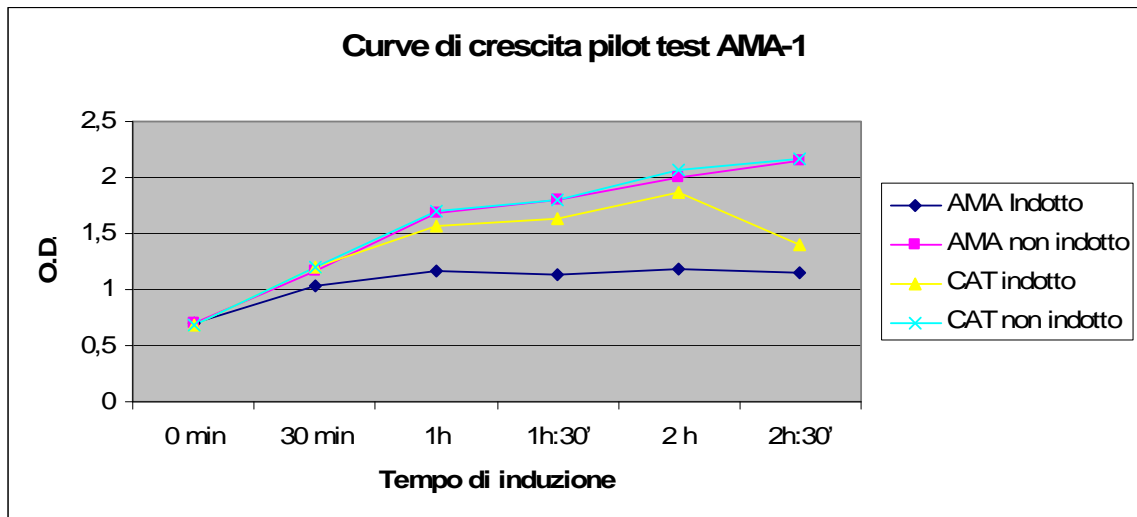


Figura 52. Andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari.

I pellet cellulari raccolti sono stati processati per l'analisi dell'espressione della proteina mediante Lumio™ Green Detection Kit, secondo quanto descritto dalle istruzioni della casa produttrice e i lisati proteici ottenuti sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa il gel è stato visualizzato agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm. Purtroppo, come è possibile osservare in Figura 53, nessuna traccia della proteina ricombinante poteva essere apprezzata. Il saggio è stato ripetuto una seconda volta al fine di verificare se l'andamento di crescita nelle cellule

indotte non fosse dovuto a particolari condizioni legate all’esperienza, ma i risultati di entrambi i saggi sono stati del tutto sovrapponibili.

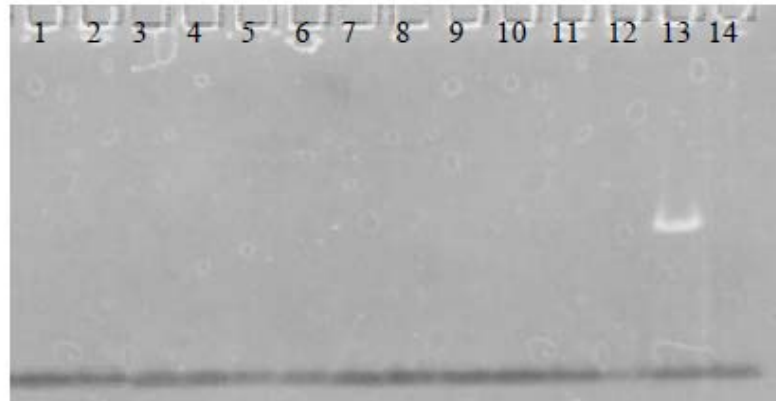


Figura 53. Frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell’estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, il gel è stato visualizzato agli UV alla lunghezza d’onda di 254 nm.

- Corsia 1: lisato proteico AMA indotto T₀
- Corsia 2: lisato proteico AMA non indotto T₀
- Corsia 3: lisato proteico AMA indotto T₁ = 30’ dall’induzione
- Corsia 4: lisato proteico AMA non indotto T₁
- Corsia 5: lisato proteico AMA indotto T₂ = 1h dall’induzione
- Corsia 6: lisato proteico AMA non indotto T₂
- Corsia 7: lisato proteico AMA indotto T₃ = 1h30’ dall’induzione
- Corsia 8: lisato proteico AMA non indotto T₃ = 1h30’ dall’induzione
- Corsia 9: lisato proteico AMA indotto T₄ = 2h dall’induzione
- Corsia 10: lisato proteico AMA non indotto T₄ = 2h dall’induzione
- Corsia 11: lisato proteico AMA indotto T₅ = 2h30’ dall’induzione
- Corsia 12: lisato proteico AMA non indotto T₄ = 2h30’ dall’induzione
- Corsia 13: lisato proteico CAT indotto T₂ = 1h dall’induzione
- Corsia 14: lisato proteico CAT non indotto T₂ = 1h dall’induzione

Trasferimento nel vettore d’espressione della sequenza nucleotidica codificante per la proteina AMA-1 privata della regione corrispondente all’elica transmembrana.

Produzione della proteina in *E. coli*

La trasformazione di cellule di *E.coli* con il vettore contenente la sequenza codificante l’intera proteina AMA-1 di *B.bigemina* non aveva consentito la produzione di un’apprezzabile quantità di proteina, mostrando piuttosto che l’induzione della sua espressione era tossica per il ceppo batterico utilizzato e inoltre l’analisi dei dati riportati in letteratura mostrava frequenti casi di tossicità associati all’espressione di proteine idrofobiche. Pertanto si è pensato di trasferire all’interno del vettore d’espressione la sequenza nucleotica codificante per la proteina AMA-1 privata della regione codificante l’elica transmembrana.

A tal fine è stato disegnato un nuovo primer reverse (AMA160Rev3TM), la cui sequenza è riportata in *Materiali e Metodi*, complementare alla regione immediatamente

a monte della sequenza codificante l’elica e terminante con un codone di stop in modo da interrompere la sintesi proteica una volta all’interno del vettore. Il primer forward è lo stesso utilizzato in precedenza. Con tale coppia di primers è stata condotta la PCR sul DNA dei campioni positivi a *B.bigemina*.

La PCR ha dato il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese, come mostrato in Figura 54.

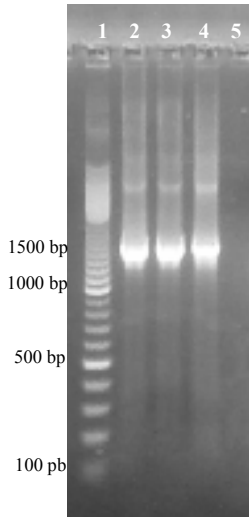


Figura 54. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione Amal ottenuta utilizzando i primers Amal160FnoSP e Amal160Rev3TM a partire dai campioni positivi a *B.bigemina* ITA1 e ITA6 (corsie 2 e 3, rispettivamente); campione VMDR come controllo positivo (corsia 4); controllo negativo (corsia 5); marcatore di peso molecolare DNA Step Ladder Promega bp DNA Step Ladder (corsia 1).

Il prodotto di PCR proveniente dall’amplificazione condotta sul campione ITA6 (corsia 3 in Figura 54) è stato purificato e quantizzato. Sei ng di tale prodotto di amplificazione sono stati utilizzati per l’inserimento nel vettore pET160Gw e 3µl della miscela di reazione sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti Top10 di *E.coli*.

Sul DNA plasmidico estratto è stata eseguita la PCR con i primers specifici Amal160FnoSP-Amal160Rev3TM. Il DNA plasmidico estratto da quattro differenti colonie è stato inviato a una ditta di sequenziamento utilizzando i primers universali T7 Forward e T7. L’analisi delle sequenze dei plasmidi ottenuti ha confermato l’inserimento dell’intera sequenza *in frame*.

Produzione della proteina in *E.coli*

Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. In parallelo, come controllo, il plasmide controllo pET160/CAT è stato utilizzato per trasformare una diversa aliquota di cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. Al termine della reazione le cellule sono state processate come descritto in precedenza. Dopo aver indotto l’espressione della proteina mediante IPTG 0.75 mM, le colture sono state lasciate crescere a 37°C con agitazione per circa tre ore. Ogni 30

minuti sono state misurate le O.D. (valori riportati in tabella 14) di entrambe le colture cellulari e da ognuna di esse sono stati 500 μ l, processati come descritto in precedenza.

	0 min	30 min	1h	1h:30'	2 h	2h:30'
AMA Indotto	0,574	0,811	0,883	0,912	0,941	0,964
AMA non indotto	0,574	0,918	1,117	1,341	1,463	1,527
CAT indotto	0,520	0,79	0,896	1,007	1,096	1,096
CAT non indotto	0,520	0,832	1,037	1,227	1,351	1,351

Tabella 14. Valori delle O.D. misurate a 600 nm a intervalli di trenta minuti a partire dal momento dell'induzione (tempo 0) con IPTG 0.75 mM sia per le colture cellulari indotte (AMA indotto e CAT indotto) sia per quelle non indotte (AMA non indotto e CAT non indotto).

In Figura 55 è riportato l'andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari. Come è possibile osservare, l'assenza nella proteina della regione idrofobica ha abbassato notevolmente la tossicità della proteina, consentendo la crescita della coltura batterica indotta in modo paragonabile a quella controllo.

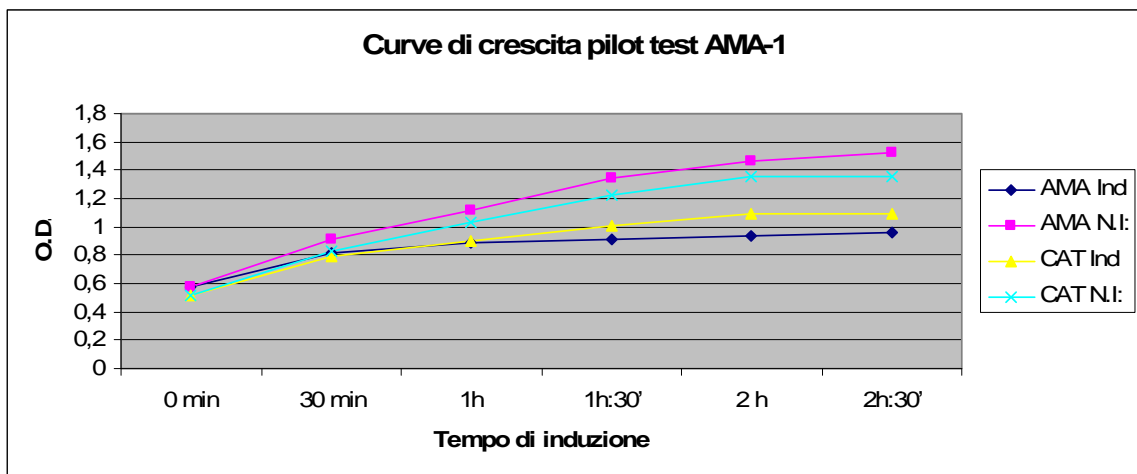


Figura 55. Andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari.

Le aliquote cellulari messe da parte sono state processate per l'analisi dell'espressione della proteina mediante Lumio™ Green Detection Kit, secondo quanto descritto dalle istruzioni della casa produttrice e i lisati proteici ottenuti sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa il gel è stato visualizzato agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm.

Come è possibile osservare in Figura 56, è possibile apprezzare la presenza di proteina ricombinante nei campioni indotti. Il saggio ha inoltre consentito di stabilire che 2h di induzione era il tempo ottimale per l’espressione della proteina.

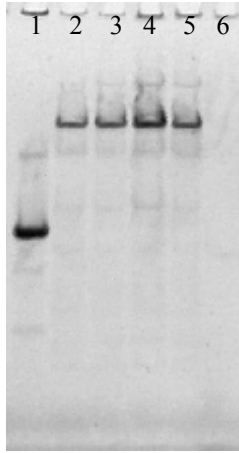


Figura 56. Frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell’estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, la proteina marcata con il sistema Lumio Tag è risultata chiaramente visibile agli UV alla lunghezza d’onda di 254 nm.

Corsia 1: Controllo positivo (CAT indotto T₂ = 1h dall’induzione)
 Corsia 2: lisato proteico AMA indotto 30’ dall’induzione
 Corsia 3: lisato proteico AMA indotto 1h dall’induzione
 Corsia 4: lisato proteico AMA indotto 2h dall’induzione
 Corsia 5: lisato proteico AMA indotto 2h30’ dall’induzione
 Corsia 6: Controllo negativo (AMA non indotto)

Dopo aver individuato mediante il saggio di espressione pilota le condizioni migliori per la sintesi della proteina in *E.coli*, si è proceduto con la produzione della proteina su scala più ampia utilizzando volumi maggiori di coltura batterica (vedi *Materiali e Metodi*). Terminata la fase di crescita sotto l’effetto dell’induttore, tali sospensioni cellulari sono state prelevate e centrifugate a 4000xg per 10 minuti. Aspirato il supernatante, i pellet sono stati posti a -20°C e aliquote di essi sono state lisate e frazionate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa, il gel è stato sottoposto a colorazione con Blue di Comassie. Come è possibile osservare in Figura 57, l’avvio di colture batteriche su ampia scala ha permesso di ottenere buone quantità della proteina.

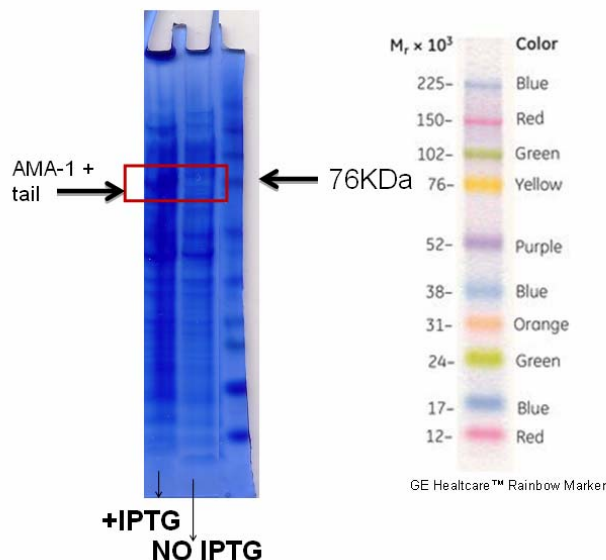


Figura 57. Frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell’estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, il gel è stato sottoposto a colorazione con Blue di Comassie.

Corsia 1: Ama indotto; Corsia 2: AMA non indotto; Corsia 3: Marcatore di peso molecolare.

Purificazione della proteina AMA-1

Il pellet batterico ottenuto dalle colture cellulari è stato diluito con binding buffer e la sospensione cellulare è stata sottoposta a lisi mediante sonicazione (8 cicli da 10 sec ciascuno con pause di 10 sec in ghiaccio). La proteina ricombinante AMA-1 di *B.bigemina* è stata purificata per cromatografia per affinità mediante colonnine di Ni-Sefarosio (His Gravi Trap, GE Healthcare) grazie alle istidine presenti all'estremità N-terminale di tali polipeptidi (vedi Materiali e Metodi). Al termine della purificazione della proteina, un'aliquota di essa è stata visualizzata su gel e un'ulteriore aliquota utilizzata per la quantizzazione al Nanodrop. La concentrazione stimata è risultata 0.40 mg/ml. In particolare da circa 7 grammi di pellet batterico totale sono stati recuperati 1.2 grammi di proteina ricombinante.

Studi sulle proprietà immunogeniche della proteina AMA-1.

- Allestimento di test ELISA anti-AMA-1 tagged

La proteina AMA-1 di *B.bigemina*, una volta purificata, è stata utilizzata per allestire dei saggi ELISA in modo da valutare se nel siero di animali naturalmente infetti fossero rintracciabili anticorpi anti-Ama-1. La proteina ricombinante è stata dunque diluita in buffer carbonato, come descritto in Materiali e Metodi, in modo da ottenere tre diverse concentrazioni proteiche.

- Saggio ELISAA: Tre diverse concentrazioni proteiche – 1, 5 e 50 µg/ml - e sieri diluiti 1:100.

In particolare le concentrazioni di proteina testate nel corso del primo saggio sono state: 1, 5 e 50 µg /ml. Tali soluzioni sono state utilizzate per ricoprire il fondo dei pozzetti di una piastra per ELISA a 96 pozzetti ponendo in ciascun pozzetto 50 µl della soluzione proteica alla concentrazione desiderata. Le piastre sono state lasciate a 4°C per una notte. Il giorno successivo è stata aggiunta una soluzione di PBS (Phosphate Buffered Saline) - Tween 20 Buffer e siero fetale di bovino 10% e la piastra è stata posta a 37°C per 1h al fine di saturare i siti aspecifici dei pozzetti. Sono stati utilizzati sieri provenienti da animali positivi (siero 1), dubbi (siero 2) e negativi (siero 3), precedente testati mediante kit SVANOVIR *B.bigemina* Ab-ELISA (Svanova Biotech AB). I sieri sono stati utilizzati alle diluizioni 1:100 in PBS-Tween 20 Buffer. Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio. Le piastre sono state lasciate 90 minuti a 37 °C. Eseguiti 4 lavaggi con PBS, è stata aggiunta la perossidasi di rafano coniugata con

anticorpi monoclonali anti-IgG di bovino. Il materiale non legato è stato rimosso mediante lavaggi con PBS –Tween 20 prima dell’aggiunta del substrato, in seguito a cui si sviluppa, nei campioni positivi, una colorazione blu dovuta alla conversione del substrato ad opera del coniugato. La reazione è stata interrotta dall’aggiunta della Stop solution. Il risultato viene letto allo spettrofotometro, misurando la densità ottica a 405 nm. I valori delle OD sono riportati in Tabella 15. Al termine della reazione si poteva osservare una differenza nelle O.D. registrate nei campioni positivi rispetto a quella registrata nel campione negativo.

	1 C-	2 POS	3 Dubbio	4 Neg	Bianco
A 1 µg/ml	0.168±0,009	1.55±0.027	1.317± 0.054	0.681±0.014	0,173±0.004
B 5 µg/ml	0.167±0,018	1,443±0.045	1,565±0.083	0.863±0.040	0,172±0.004
C 50 µg/ml	0.151±0,010	1,641±0.072	1,625±0.117	0.98±0.035	0,164±0.001

Tabella 15. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISAA per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina*. In particolare sono state testate 3 diverse concentrazioni di antigene, rispettivamente 1, 5 e 50 µg/ml nelle file A, B e C rispettivamente. I sieri sono stati diluiti 1:100. Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio.

- Saggio ELISAb: Tre diverse concentrazioni proteiche – 1, 0.5 e 0.1 µg/ml - e sieri diluiti 1:100.

Le concentrazioni di proteina testate nel corso del secondo saggio sono state: 1, 0.5 e 0.1 µg/ml, processate come descritto in precedenza e lasciate reagire con sieri provenienti da animali positivi, dubbi e negativi, diluiti 1:100. I risultati sono riportati in tabella 16.

	1 C-	2 POS	3 Dubbio	4 Neg	Bianco
A 1 µg/ml	0.108±0.001	1.431±0.028	1.249±0,018	0.713±0,025	0,112±0,051
B 0.5 µg/ml	0.116±0.003	1.653±0,048	1,286±0,044	0.904±0,008	0,126±0,004
C 01 µg/ml	0.109±0.001	1.541±0,008	1,087±0,006	0.823±0,057	0,134±0,001

Tabella 16. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISAb per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina*. In particolare sono state testate 3 diverse concentrazioni di antigene, rispettivamente 1, 0.5 e 0.1 µg/ml nelle file A, B e C, rispettivamente. I sieri sono stati diluiti 1:100. Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio.

- Saggio ELISAc: Tre diverse concentrazioni proteiche – 1, 0.5 e 0.1 µg/ml - e sieri diluiti 1:200.

Le concentrazioni di proteina testate nel corso del terzo saggio sono state le stesse utilizzate nel secondo saggio, processate come descritto in precedenza e lasciate reagire con sieri diluiti, questa volta, 1:200. I risultati sono riportati in tabella 17.

	1	2	3	4	Bianco
	C-	POS	Dubbio	Neg	
A 1 µg/ml	0.120±0.008	0.768±0.028	0.63±0.04	0.439 ±0,049	0,113±0.001
B 0.5 µg/ml	0.118±0.004	0.878±0.002	0.683±0.03	0.452±0,006	0,113±0.010
C 0.1 µg/ml	0.118±0.001	0.828±0,016	0.621±0,015	0.478 ±0,010	0,134±0.009

Tabella 17. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISAc per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina*. In particolare sono state testate 3 diverse concentrazioni di antigene, rispettivamente 1, 0,5 e 0,1 µg/ml nelle file A, B e C, rispettivamente. I sieri sono stati diluiti 1:200. Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio.

Trattamento della proteina AMA-1 con ACTEV proteasi per rimozione della coda d’istidine

In seguito agli incoraggianti risultati ottenuti dai saggi ELISA di cui sopra, si è proceduto al trattamento della proteina AMA-1 con ACTEV proteasi, che, grazie alla presenza di uno specifico sito di taglio nella sequenza aminoacidica della proteina ricombinante, consente di rimuovere le regioni aminoacidiche presenti all’estremità N-terminale della proteina (Lumio tag, poli-His) che non fanno parte della sequenza naturale della proteina. Ciò consente di impedire che anticorpi di sieri bovini possano reagire contro epitopi eventualmente presenti in questa regione, ma non nella proteina nativa.

Purificazione della proteina AMA-1 in seguito al trattamento con ACTEV proteasi

Dopo il trattamento con ACTEV proteasi, la proteina AMA-1 è stata purificata attraverso cromatografia per affinità mediante colonnine di Ni-Sefarosio (His Gravi Trap, GE Healthcare). Questa volta il passaggio attraverso la colonnina è necessario per allontanare i peptidi contenenti le code d’istidina rimosse dall’enzima, tutte le proteine AMA-1 che l’enzima non ha tagliato e l’enzima stesso, in quanto presenta anch’esso una regione di istidine alla sua estremità N-terminale. Le proteine Ama-1 a cui è stata

efficacemente rimossa la coda di poly-His non si legano infatti alla resina di sefarosio presente all'interno della colonnina, ma attraversano quest'ultima indisturbate. Al termine della purificazione della proteina, un'aliquota di essa è stata visualizzata su gel di poliacrilammide (Figura 58) e un'ulteriore aliquota utilizzata per la quantizzazione al Nanodrop. La concentrazione stimata è risultata 0.32 µg/ml.

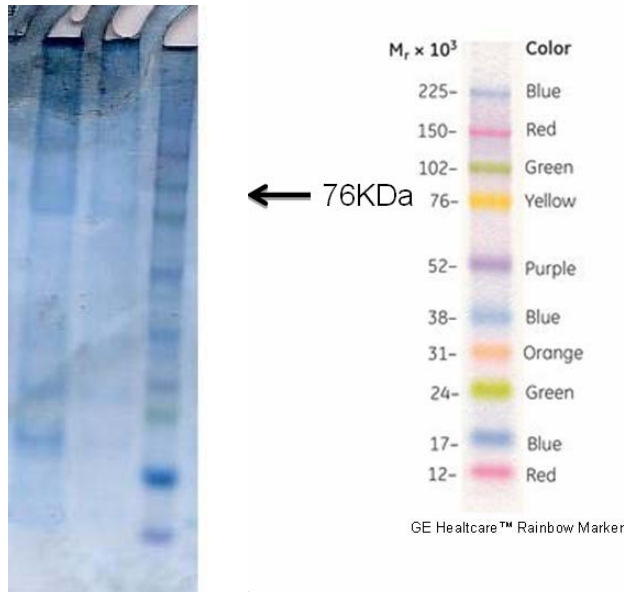


Figura 58. Profili di migrazione elettroforetica su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante della proteina Ama-1 prima del taglio della tag (corsia 1) e dopo il taglio della tag (corsia 2). Corsia 3: Marcatore di peso molecolare. Al termine della corsa, il gel è stato sottoposto a colorazione con Blue di Comassie.

Allestimento test ELISA anti-AMA-1 no tag

- Saggio ELISAA: Tre diverse concentrazioni proteiche – 1, 0.5 e 0.1 µg/ml - e sieri diluiti 1:100.

La proteina AMA-1 di *B.bigemina*, privata della coda di poly-His e purificata, è stata utilizzata per l'allestimento di nuovi test ELISA al fine di valutare se gli anticorpi anti-Ama-1 rilevati nel siero di animali infetti mediante il test ELSA di cui sopra, non fossero rivolti verso le regioni estranee della proteina, bensì verso epitopi della proteina naturalmente presenti. La proteina ricombinante è stata dunque diluita in buffer carbonato, in modo da ottenere tre diverse concentrazioni proteiche.

In particolare le concentrazioni di proteina testate sono state: 1, 0.5 e 0.1 µg/ml. Tali soluzioni sono state utilizzate per ricoprire il fondo dei pozzetti di una piastra per ELISA a 96 pozzetti ponendo in ciascun pozzetto 50 µl della soluzione proteica alla concentrazione desiderata. I sieri utilizzati provengono da animali risultati rispettivamente positivi, dubbi e negativi ad indagini sierologiche eseguite in precedenza mediante kit SVANOVIR *B.bigemina* Ab-ELISA (Svanova Biotech AB). I sieri sono stati utilizzati alle diluizioni 1:100 in PBS-Tween 20 Buffer. Ciascuna determinazione è

stata eseguita in doppio. Il risultato viene letto allo spettrofotometro, misurando la densità ottica a 405 nm. I valori delle OD sono riportati in tabella 18.

	1 C-	2 Pos	3 Dubbio	4 Neg	Bianco
A 1 µg/ml	0.107±0.006	1.392±0.088	0.937±0.049	0.558±0.007	0,105±0.019
B 0.5 µg/ml	0.102±0.001	1.477±0.58	0.647±0.004	0.473±0.064	0,1±0.02
C 0.1 µg/ml	0.091±0.001	1.157±001	0.857±146	0.529±0.001	0,106±0.04

Tabella 18. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISA per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina* dopo la rimozione della coda di istidine e successiva purificazione. In particolare sono state testate 3 diverse concentrazioni di antigene, rispettivamente 1, 0.5 e 0.1 µg/ml nelle file A, B, C, e sieri diluiti 1:100.

Anche stavolta, al termine della reazione, si poteva osservare una differenza nelle OD₄₀₅ registrate nei campioni positivi rispetto a quella registrata nel campione negativo, suggerendo che la risposta anticorpale osservata non era rivolta in maniera aspecifica verso la porzione estranea della proteina.

- Saggio ELISAb: Tre diverse concentrazioni proteiche – 1, 0.5 e 0.1 µg/ml - e sieri diluiti 1:200.

Un secondo saggio è stato condotto utilizzando le medesime concentrazioni di antigene riportate in precedenza lasciate reagire questa volta con sieri diluiti 1:200. I valori di OD ottenuti nel corso di tale saggio sono riportati in tabella 19.

	1 C-	2 Pos	3 Dubbio	4 Neg	Bianco
A 1 µg/ml	0.108±0.002	0.926±0,025	0.454±0.008	0.469±0,051	0,107±0.03
B 0.5 µg/ml	0.115±0.006	0.829±0.006	0.407±0.018	0.329±0.045	0,111±0.017
C 0.1 µg/ml	0.113±0.003	1.028±0.219	0.464±0.091	0.263±0.04	0,109±0.02

Tabella 19. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISA per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina* dopo la rimozione della coda di istidine e successiva purificazione. In particolare sono state testate 3 diverse concentrazioni di antigene, rispettivamente 1, 0.5 e 0.1 µg/ml nelle file A, B, C, e sieri diluiti 1:200.

I risultati ottenuti non mostrano sostanziali differenze nei valori riportati di OD per quanto riguarda sia le concentrazioni di proteina utilizzate sia le diluizioni dei sieri.

- Ulteriori saggi ELISA: diverso numero di lavaggi e differenti tempi di incubazione con il substrato

Ulteriori saggi ELISA sono dunque stati allestiti per migliorare le condizioni del test in cui sono stati variati il numero di lavaggi con PBS-Tween e il tempo di incubazione della piastra con il substrato.

Per quanto riguarda il numero di lavaggi, i risultati migliori sono stati ottenuti eseguendo 4 lavaggi con PBS-Tween per volta.

L’analisi del tempo di incubazione della piastra con il substrato è stata condotta prendendo in considerazione tre diversi tempi: 10 minuti, 20 minuti, 30 minuti. La concentrazione di antigene utilizzata è 1 µg/ml e i sieri sono stati diluiti 1:200.

I risultati, mostrati in tabella 20, indicano che 30 minuti è il miglior tempo di incubazione. Tempi di incubazione superiori a 30 minuti, non riportati in tabella, non apportavano ulteriori miglioramenti alla qualità del test. L’analisi del tempo di incubazione è stata effettuata anche utilizzando l’antigene alle concentrazioni 0.05 µg/ml e 0.01, con risultati equivalenti.

	1 POS	2 Neg	Bianco
A 10 minuti	0.208±0.008	0.135±0,004	0,101±0.003
B 20 minuti	0.378±0.014	0.330±0.018	0,100±0.002
C 30 minuti	0.913±0.048	0.731±0.058	0,100±0.003

Tabella 20. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso del saggio ELISA per la ricerca di anticorpi anti AMA-1 di *B.bigemina*. In particolare sono stati testati 3 diversi tempi di incubazione, 10 minuti, 20 minuti e 30 minuti nelle file A, B e C, rispettivamente. La concentrazione di antigene utilizzata è 1 µg/ml e i sieri sono stati diluiti 1:200.

4.6.3 Produzione della proteina UP in *E. coli* e studio delle sue proprietà immunogene

Trasferimento della sequenza UP nel vettore d’espressione. Produzione della proteina in *E.coli*.

Al fine di consentire l’inserimento della sequenza UP (vedi paragrafo 4.5.2) nel vettore d’espressione è stata condotta sul DNA dei campioni positivi a *B.bigemina* la PCR con i primers SBP1-160F e SBP1-160R (vedi Materiali e Metodi). Il primer forward presenta la specifica sequenza CACC necessaria per l’inserimento direzionale e *in frame* nel vettore, il primer reverse invece termina con il codone di stop naturale della proteina. La PCR ha dato il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese (1.1Kb, Figura 59) e il prodotto di PCR proveniente dall’amplificazione condotta sul campione ITA1 è stato purificato e quantizzato. Sei ng di tale prodotto di amplificazione sono stati utilizzati per l’inserimento nel vettore pET160Gw e 3µl della miscela di reazione sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti Top10 di *E.coli*. Sul DNA plasmidico estratto è stata eseguita la PCR con i primers specifici per verificare la presenza dell’inserito. Il plasmide è stato inviato a MacroGen.Inc per il sequenziamento utilizzando i primers universali T7 Forward e T7 Reverse e l’analisi delle sequenze dei plasmidi ottenuti ha confermato l’inserimento dell’intera sequenza *in frame*.

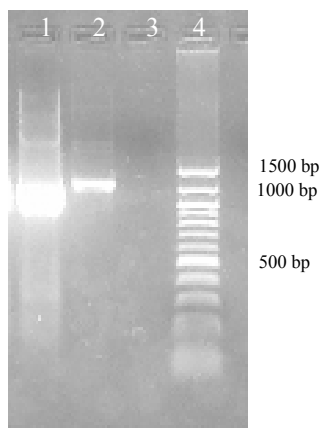


Figura 59. Profili di migrazione elettroforetica su gel d’agarosio 1.2% dei prodotti di amplificazione corrispondenti alla regione UP ottenuta utilizzando i primers SBP1-160F e SBP1-160R SBP-1 a partire dal plasmide pET160Gw per verificare la presenza dell’inserito (corsia 1); controllo positivi (corsia 2); controllo negativo (corsia 3); marcatore di peso molecolare (corsia 4).

Produzione della proteina in *E.coli*

Il plasmide ricombinante ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. In parallelo, come controllo, il plasmide controllo pET160/CAT è stato utilizzato per trasformare una diversa aliquota di cellule BL21 Star™(DE3) di *E. coli*. Al termine della reazione le cellule sono state processate come descritto in precedenza. Dopo aver indotto l’espressione della proteina mediante IPTG 0.75 mM, le

colture sono state lasciate crescere a 37°C con agitazione per circa tre ore, misurando le O.D. ogni 30 minuti (valori riportati in tabella 21). In Figura 60 è riportato l’andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari.

	0 min	30 min	1h	1h:30'	2 h	2h:30'
UP Ind	0,499	0,818	1,062	1,31	1,45	1,44
UP N.I.	0,499	0,844	1,627	2,41	3,00	3,22
CAT Ind	0,425	0,746	1,178	1,61	1,82	1,94
CAT N.I.	0,425	0,766	1,323	1,88	2,45	2,75

Tabella 21. Valori delle O.D. misurate a 600 nm a intervalli di trenta minuti a partire dal momento dell’induzione (tempo 0) con IPTG 0.75 mM sia per le colture cellulari indotte (UP indotto e CAT indotto) sia per quelle non indotte (UP non indotto e CAT non indotto).

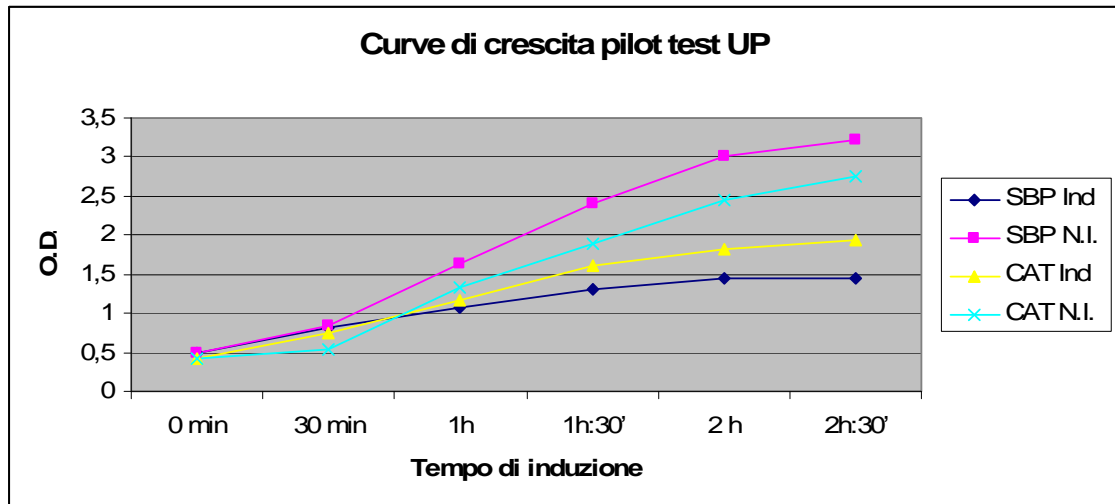


Figura 60. Andamento delle curve di crescita per ciascuna delle sospensioni cellulari.

Ogni trenta minuti 500 µl di entrambe le sospensioni cellulari sono stati prelevati, centrifugati a 13,000 × g per 10 minuti al fine di verificare se l’induzione consentisse la produzione della proteina ricombinante. Aspirato il supernatante, i pellet sono stati posti a – 20°C.

Tali aliquote cellulari sono state in seguito processate per l’analisi dell’espressione della proteina mediante Lumio™ Green Detection Kit, secondo quanto descritto dalle istruzioni della casa produttrice e i lisati proteici ottenuti sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa la proteina di fusione è stata visualizzata agli UV alla lunghezza d’onda di 254 nm.

Come è possibile osservare in Figura 61 a e b, è possibile apprezzare la presenza di proteina ricombinante nei campioni indotti.

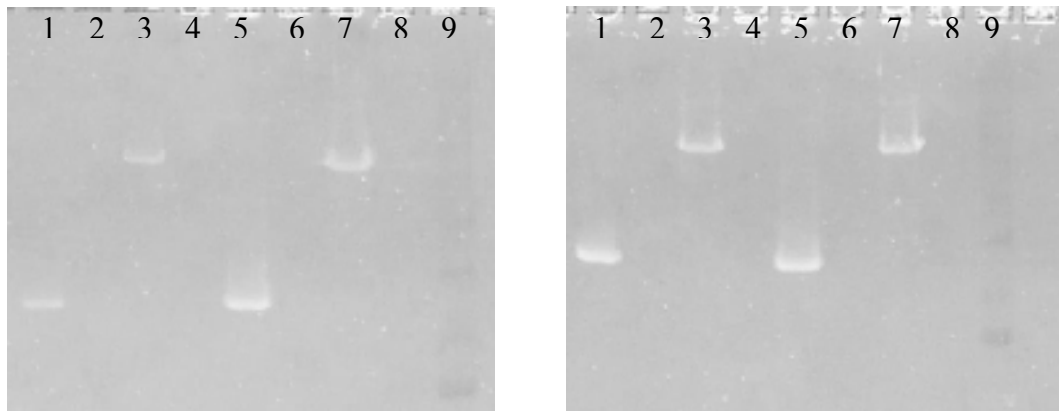


Figura 61 a e b. Pattern elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell’estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, la proteina marcata con il sistema Lumio Tag è risultata chiaramente visibile agli UV alla lunghezza d’onda di 254 nm.

Gel a

- Corsia 1: lisato proteico CAT indotto
30’ dall’induzione (T₁)
- Corsia 2: lisato proteico CAT non indotto T₁
- Corsia 3: lisato proteico UP indotto T₁
- Corsia 4: lisato proteico UP non indotto T₁
- Corsia 5: lisato proteico CAT indotto
1h dall’induzione (T₂)
- Corsia 6: lisato proteico CAT non indotto T₂
- Corsia 7: lisato proteico UP indotto T₂
- Corsia 8: lisato proteico UP non indotto T₂
- Corsia 9: marcatore di peso molecolare

Gel b

- Corsia 1: lisato proteico CAT indotto
2 h dall’induzione (T₃)
- Corsia 2: lisato proteico CAT non indotto T₃
- Corsia 3: lisato proteico UP indotto T₃
- Corsia 4: lisato proteico UP non indotto T₃
- Corsia 5: lisato proteico CAT indotto
2h:30’ dall’induzione (T₄=)
- Corsia 6: lisato proteico CAT non indotto T₄
- Corsia 7: lisato proteico UP indotto T₄
- Corsia 8: lisato proteico UP non indotto T₄
- Corsia 9: marcatore di peso molecolare

Dopo aver individuato mediante il saggio di espressione pilota le condizioni migliori per la sintesi della proteina in *E.coli*, si è proceduto con la produzione della proteina su scala più ampia attraverso diversi cicli di produzione utilizzando volumi maggiori (vedi *Materiali e Metodi*) di coltura batterica. Terminata la crescita sotto l’effetto dell’induttore, tali sospensioni cellulari sono state prelevate, centrifugate a $13,000 \times g$ per 10 minuti al fine di verificare la produzione della proteina ricombinante. Aspirato il supernatante, i pellet sono stati posti a -20°C e in seguito aliquote di essi sono state processate per l’analisi dell’espressione della proteina mediante Lumio™ Green Detection Kit. Tali aliquote sono state frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide denaturante (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Novex Gels, Invitrogen). Al termine della corsa la proteina di fusione è stata visualizzata agli UV alla lunghezza d’onda di 254 nm. Anche le colture

batteriche su ampia scala hanno permesso di ottenere quantità apprezzabili della proteina (Figura 63).

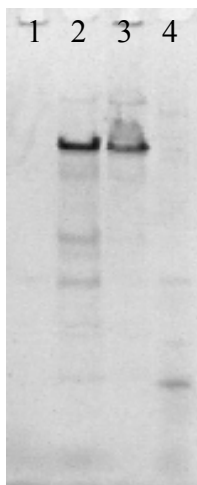


Figura 63. Frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide 4-12 % denaturante dell'estratto proteico totale di cellule batteriche trasformate indotte e non indotte. Al termine della corsa, la proteina marcata con il sistema Lumio Tag è risultata chiaramente visibile agli UV alla lunghezza d'onda di 254 nm.
Corsia 1: Lisato proteico non indotto.
Corsia 2: lisato proteico indotto frazione solubile.
Corsia 3: lisato proteico indotto frazione non solubile.
Corsia 4: Marcatore di peso molecolare non visibile per fluorescenza.

Purificazione della proteina UP

Ottenute quantità discrete di pellet batterico dalle colture cellulari come descritto in precedenza (vedi paragrafo 2.1), esso è stato diluito con binding buffer e la sospensione cellulare è stata sottoposta a lisi mediante sonicazione (8 cicli da 10 sec ciascuno con pause di 10 sec in ghiaccio). La proteina ricombinante ottenuta è stata purificata come descritto in precedenza. Al termine della purificazione della proteina, un'aliquota di essa è stata visualizzata su gel e un'ulteriore aliquota utilizzata per la quantizzazione al Nanodrop. La concentrazione stimata è risultata 400 µg/ml. In particolare si è stimato che da circa 8 grammi di pellet batterico totale sono stati recuperati 1.2 grammi di proteina ricombinante.

Studi sulle proprietà immunogeniche della proteina UP.

La proteina UP-1 di *B.bigemina* purificata è stata testata mediante alcuni saggi ELISA al fine di verificare se essa fosse effettivamente espressa negli animali infetti e se in questi fossero presenti anticorpi contro di essa, indice delle sue proprietà immunogene. La proteina ricombinante è stata dunque diluita in opportuno buffer carbonato, come descritto in Materiali e Metodi, in modo da ottenere tre diverse concentrazioni proteiche. In particolare le concentrazioni di proteina testate sono state: 0.5, 1 e 2 µg/ml. Tali soluzioni sono state utilizzate per

ricoprire il fondo dei pozzetti di una piastra per ELISA a 96 pozzetti ponendo in ciascun pozzetto 50 µl della soluzione proteica alla concentrazione opportuna.

Le piastre sono state lasciate a 4°C per una notte. Il giorno successivo è stata aggiunta una soluzione di PBS (Phosphate Buffered Saline) - Tween 20 Buffer e siero di bovino fetale 10% e la piastra è stata posta a 37°C per 1h al fine di saturare i siti aspecifici dei pozzetti. Sono stati utilizzati sieri provenienti da animali positivi e negativi, precedentemente testati mediante kit SVANOVIR *B.bigemina* Ab-ELISA (Svanova Biotech AB). I sieri sono stati utilizzati alle diluizioni 1:100 (Tabelle 22-T₁ e 22-T₂) e 1:200 (Tabelle 23-T₁ e 23-T₂) in PBS-Tween 20 Buffer. In ciascun saggio, sono state misurate le OD₄₀₅ a due differenti tempi di lettura (8 minuti, tabelle 22-T₁ e 23-T₁, e 15 minuti, tabelle 22-T₂ e 23-T₂). Ciascuna determinazione è stata eseguita in doppio. Al termine della reazione si poteva osservare una distinguibile differenza nelle OD registrate nei campioni positivi rispetto a quelle registrate nei campioni negativi.

T₁ (8 minuti)	1 C-	2 POS	3 Neg	4 Bianco
A 0.5 µg/ml	0.093±0.008	0.328±0.045	0.164±0.018	0.045±0,018
B 1 µg/ml	0.091±0.007	0.228±0,009	0.127±0.005	0.036±0.006
C 2 µg/ml	0.074±0.001	0.215±0.018	0.131±0.008	0.034±0.001
T₂ (15 minuti)	1 C-	2 POS	3 Neg	4 Bianco
A 0.5 µg/ml	0.128±0.004	1.217±0,028	0.580±0.086	0.355±0,001
B 1 µg/ml	0.125±0.004	1.026±0,038	0.514±0.014	0.335±0.006
C 2 µg/ml	0.106±0.001	0.927±0,006	0.505±0.025	0.334±0.002

Tabella 22-T₁ e 22-T₂. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso dei saggi ELISA per la ricerca di anticorpi anti UP di *B.bigemina*. In particolare la tabella riporta le OD misurate utilizzando 3 diverse concentrazioni di antigene (0.5, 1 e 2 µg/ml rispettivamente nelle file A, B e C), diluizione dei sieri pari a 1:100 e due diversi tempi di lettura delle OD dopo l’aggiunta del substrato, (8 minuti, tabella 22-T₁, in alto, e 15 minuti, tabella 22-T₂, in basso). I valori riportati si riferiscono a valori medi di determinazioni eseguite in doppio.

T₁ (8 minuti)	1 C-	2 POS	3 Neg	4 Bianco
A 0.5 µg/ml	0.092±0.011	0.262±0.004	0.136±0.010	0.043±0.002
B 1 µg/ml	0.080±0.006	0.145±0.009	0.105 ±0.018	0.037±0.004
C 2 µg/ml	0.064±0.001	0.147±0.001	0.122±0.078	0.034±0.001
T₂ (15 minuti)	1 C-	2 POS	3 Neg	4 Bianco
A 0.5 µg/ml	0.124±0.005	0.882±0.004	0.425±0.065	0.435±0.001
B 1 µg/ml	0.114±0.004	0.613±0.052	0.274±0.057	0.345±0.016
C 2 µg/ml	0.095±0	0.500±0.008	0.309±0.035	0.047±0.004

Tabella 23-T₁ e 23-T₂. Schema raffigurante le condizioni testate nel corso dei saggi ELISA per la ricerca di anticorpi anti UP di *B.bigemina*. In particolare la tabella riporta le OD misurate utilizzando 3 diverse concentrazioni di antigene (0.5, 1 e 2 µg/ml rispettivamente nelle file A, B e C), diluizione dei sieri pari a 1:200 e due diversi tempi di lettura delle OD dopo l’aggiunta del substrato, (8 minuti, tabella 23-T₁, in alto, e 15 minuti, tabella 23-T₂, in basso). I valori riportati si riferiscono a valori medi di determinazioni eseguite in doppio.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio condotto ha permesso di monitorare la presenza del parassita *B.bigemina* nel territorio italiano e rappresenta un’indagine accurata su alcuni antigeni di superficie di tale patogeno, fornendo utili informazioni sulle caratteristiche dei loro geni a partire da alcuni ceppi Italiani del parassita. I risultati forniscono alcune informazioni predittive in relazione alle proteine analizzate ottenute attraverso strumenti bioinformatici e, per alcune di esse, è stato condotto uno studio delle proprietà immunogeniche. Nell’ottica dell’obiettivo della ricerca di potenziali candidati vaccinali efficaci contro la babesiosi, lo studio di antigeni di superficie noti e la determinazione di nuovi antigeni, costituisce un importante passo avanti.

L’analisi del polimorfismo delle sequenze della proteina **AMA-1** in ceppi italiani di *B.bigemina* ha mostrato come essa condivida numerose caratteristiche comuni con altri membri della famiglia di proteine AMA-1: il peptide segnale, l’elica TM e 13 dei 16 residui di cisteine coinvolti nella formazione dei ponti disolfuro. Tali residui risultano altamente conservati tra gli ortologi di *B.bovis*, *B.bigemina* e *P.falciparum*, avvalorando così l’ipotesi di una omologia strutturale, e dunque funzionale, tra le proteine. L’appartenenza della proteina recentemente identificata alla famiglia AMA-1 è stata fortemente supportata dai risultati ottenuti tramite il software P-fam. Il confronto della sequenza della proteina Ama-1 tra ceppi italiani e stranieri di *B. bigemina* ha confermato un elevato grado di identità tra i ceppi, tanto a livello nucleotidico che amminoacidico, conferendo alla proteina delle buone potenzialità per la sua inclusione in un vaccino. Numerosi sono, per di più, i probabili peptidi antigenici individuati, di cui 12 appaiono conservati tra tutti i ceppi. L’albero filogenetico non ha invece mostrato alcuna correlazione tra la distanza geografica ed evolutiva, suggerendo che AMA non è un buon marcatore per la discriminazione dei ceppi. Parte dei risultati di tale analisi sono stati oggetto di una pubblicazione (Torina *et al.*, 2010).

L’indagine ha fornito un’analisi comparativa tra le proteine AMA-1 di diversi Apicomplexa. Alcune di tali proteine sono state caratterizzate e per alcune di esse è stato dimostrato il ruolo nel processo di invasione degli eritrociti. In

Plasmodium falciparum, ad esempio, la proteina AMA-1 (PfAMA) costituisce uno dei più promettenti candidati antimalarici in via di sviluppo tra quelli che agiscono durante la fase eritrocitaria (Latitha *et al.*, 2008). È stato dimostrato che anticorpi diretti contro PfAMA-1 hanno un ruolo importante nell'immunità protettiva in adulti che vivono in zone endemiche della malaria (Hodder *et al.*, 2001). Per quanto riguarda la proteina AMA-1 di *Toxoplasma gondii* (TgAMA1), studi precedenti hanno mostrato come delezioni a livello della sua regione codificante compromettano in maniera severa la capacità di invasione della cellula ospite ad opera del microrganismo. L'inattivazione di AMA-1 non inficia la secrezione dei micronemi né la fase di attacco iniziale del parassita alla cellula ospite, ma inibisce la secrezione delle roptrie, il cui rilascio è associato ad una attiva penetrazione all'interno della cellula bersaglio (Mital *et al.*, 2005). Nel 2004, è stata identificata (Gaffar *et al.*, 2004) la proteina AMA-1 di *B. bovis* (BbAMA-1) e successivamente anche nel genoma di *B. bigemina* è stata evidenziata una regione con elevata omologia alla proteina AMA-1 presente negli altri Apicomplexa (Mosqueda *et al.*, 2007).

La proteina AMA-1 di *B. gibsoni* è stata identificata come un antigene immunodominante per il sistema immunitario dell'ospite, in grado di indurre una forte risposta anticorpale in cani cronicamente infetti, anche se la risposta anticorpale non si osservava nelle fasi precoci dell'infezione (Zhou *et al.*, 2006).

Studi condotti sulla proteina AMA-1 di *B. divergens* (BdAMA-1) recentemente identificata hanno mostrato che essa lega sul globulo rosso recettori sensibili alla tripsina e alla chimotripsina e che anticorpi rivolti contro BdAMA-1 sono in grado di ridurre l'efficienza di infezione del 50% (Montero *et al.*, 2009). Infine, anche nel genoma di *Theileria annulata* e di *T. parva* è stata identificata una regione con elevata omologia a quella codificante la proteina AMA-1, ma le corrispondenti proteine non sono ancora state caratterizzate.

Le sequenze delle proteine di tali differenti Apicomplexa sono state comparate e la divergenza evolutiva è stata calcolata sia in termini di aminoacidi che di nucleotidi. L'analisi della struttura predittiva delle proteine ha mostrato la presenza di caratteristiche strutturali comuni, quali il peptide segnale di indirizzamento alla membrana plasmatica, l'elica trans-membrana, la presenza di

residui di cisteina conservati potenzialmente implicati nella formazione di legami disolfuro. Persino una similarità nella struttura tridimensionale è stata ipotizzata. Questi risultati indirizzano verso un'omologia funzionale delle proteine analizzate, lasciando ipotizzare un ruolo attivo nel processo di invasione cellulare anche per la proteina AMA-1 di *B.bigemina* recentemente identificata.

È stato inoltre individuato un valido sistema per il clonaggio direzionale dei prodotti di PCR, l'espressione inducibile della proteina in *E.coli*, la sintesi proteica su larga scala nonché l'identificazione specifica e la purificazione della proteina. È stato così possibile procedere con la produzione della proteina AMA-1, prima mediante la messa a punto di uno specifico test pilota al fine di individuare le migliori condizioni di produzione e, successivamente, mediante la sintesi della proteina su larga scala.

Il presente studio riporta inoltre i dati circa l'esecuzione di alcuni saggi ELISA per la ricerca di anticorpi anti-AMA-1 di *B.bigemina* eseguiti utilizzando quale antigene la proteina purificata, prodotta in *E.coli*. Sono state testate diverse concentrazioni di antigene e differenti diluizioni di sieri e, in tutte le diverse condizioni analizzate, una differenza di segnale era presente tra animali positivi e negativi. Tale differenza permette di ipotizzare che anticorpi anti-*B.bigemina* AMA-1 sono presenti nei sieri di animali infetti. Il ritrovamento di un antigene conservato e nello stesso tempo immunogeno, costituisce un risultato molto importante nell'ottica di una ricerca di un possibile candidato vaccinale. La presenza di regioni molto conservate tra le proteine Ama-1 dei diversi Apicomplexa considerati riveste un notevole interesse in quanto la somministrazione di tale antigene potrebbe determinare l'immunizzazione dell'animale verso diversi patogeni contemporaneamente.

L'elevato grado di conservazione della proteina in organismi differenti potrebbe rendere invece non idoneo tale antigene per l'allestimento di un test diagnostico specifico per il rilevamento di *B. bigemina*, anche se non è da escludere la possibilità di individuare condizioni di reazione altamente stringenti tali da aumentarne la specificità. In caso contrario, si potrebbe ipotizzare un utilizzo di tale antigene per un primo veloce screening dei campioni per *Babesia/Theileria* tale da permettere una rapida diagnosi e minori costi di reazione. In caso di esito

negativo, infatti, non si renderebbe necessaria l'escuzione dei saggi sierologici specifici che verrebbero invece eseguiti solo sui sieri di quei campioni risultati positivi al primo screening.

Alla luce di tali possibili interessanti risvolti, un progetto di ricerca corrente è stato redatto e presentato dal CRABaRT al Ministero della Salute Italiano al fine di poter proseguire gli studi con i necessari controlli di specificità e sensibilità. Il progetto è stato recentemente approvato e finanziato per la durata di un anno e permetterà di eseguire i controlli necessari, apportare le dovute migliorie al test e valutare la possibilità di impiegare tale saggio a scopo diagnostico.

L'analisi delle sequenze codificanti la **glicoproteina 45** di *B.bigemina*, il primo studio condotto su una sequenza italiana del gene, ha mostrato che la sequenza di gp45 del ceppo italiano presentava un elevato grado di variabilità quando comparata con quella dei ceppi messicani. Il dominio idrofobico N-terminale della proteina gp45 di *B.bigemina* forma un peptide segnale (SignalP) con un possibile sito di taglio tra gli aminoacidi 21 e 22, che risulta conservato in entrambi i ceppi. L'analisi della sequenza aminoacidica attraverso il software TMHMM ha confermato l'assenza di un dominio transmembrana. Il dominio C-terminale della sequenza italiana contiene un segnale per l'addizione di una molecola di glycosylphosphatidylinositol in prossimità dell'aminoacido 328, confermando i dati in precedenza riportati (Fisher *et al.*, 2001).

I precedenti studi riguardanti la glicoproteina 45 di *B. bigemina* avevano mostrato un certo grado di polimorfismo tra ceppi geograficamente distanti e in particolare tra ceppi del Nord e del Sud America. Ulteriori studi hanno mostrato che il grado di conservazione aumenta in modo significativo se gli isolati sono geograficamente vicini (Mosqueda *et al.*, 2007). Lo studio qui condotto sui ceppi italiani conferma la variabilità delle sequenze codificanti gp45, indicando che essa, nonostante siano state evidenziate alcune proprietà immunogene, non appare nel suo insieme un buon candidato vaccinale in quanto non permetterebbe la messa a punto di un vaccino ampiamente protettivo. Ulteriori studi potrebbero tuttavia chiarire se le proprietà immunogene della glicoproteina non possano in qualche modo migliorare in un vaccino a subunità la risposta ad altri antigeni, meno immunogeni ma più conservati.

Per di più, alcuni studi hanno mostrato come sia possibile superare il limite della variabilità di alcune proteine immunogene ingegnerizzando delle proteine chimera in modo che presentino i residui aminoacidici degli epitopi conservati tra i diversi ceppi. Tali studi sono stati condotti con successo nella ricerca di candidati vaccinali, ad esempio, contro *Streptococcus mutans* (Zhang *et al.*, 2002), *Borrelia* (Earnhart *et al.*, 2007) e *Neisseria meningitidis* (Beernink *et al.*, 2008). Per l'ingegnerizzazione di proteine chimera sono state utilizzate diverse strategie. In alcuni casi, come per il vaccino universale ottenuto contro *Neisseria meningitidis* (Giuliani *et al.*, 2006), due diversi antigeni dello stesso organismo sono stati fusi insieme per incrementare la cross-protezione verso ceppi che presentano variabilità antigenica,

In altri casi, come per il vaccino contro il patogeno *Borrelia*, agente responsabile della malattia di Lyme (Earnhart *et al.*, 2007), una proteina di fusione è stata ottenuta a partire da differenti varianti sierologiche di un unico antigene. Non è possibile, pertanto, escludere nel futuro un simile approccio nei confronti di alcune delle proteine di *Babesia bigemina* che, come gp45, presentano rilevanti proprietà immunogene associate ad elevata variabilità antigenica.

La variabilità mostrata da gp45 tra i ceppi provenienti da differenti parti del mondo potrebbe, infine, rendere tale gene un marcatore utile per la discriminazione dei ceppi. Marcatori genetici polimorfici riguardo a dimensione e sequenza sono disponibili per *Plasmodium falciparum* e sono stati di grande importanza nella conduzione di indagini cliniche ed epidemiologiche nello studio della malaria (Pereira *et al.*, 2002). Un simile approccio per distinguere tra differenti popolazioni di *Babesia bigemina* sarebbe estremamente utile in medicina veterinaria.

L'analisi condotta ha riguardato anche lo studio di sequenze di *B.bigemina* considerate inizialmente omologhe a quelle del gene codificante per la proteina **SBP-1** in *B.bovis*. È stato tuttavia osservato che la regione amplificata presentava bassi livelli di similarità con quella corrispondente al gene SBP-1 di *B.bovis*. Il confronto con tutte le sequenze presenti finora in GenBank non ha mostrato significativi livelli di similarità, suggerendo che la regione analizzata potrebbe codificare per una proteina non ancora caratterizzata e per questo chiamata da noi

UP (*unkown protein*). Tale sequenza ha mostrato un discreto livello di conservazione della sequenza amplificata rispetto a quella corrispondente in ceppi stranieri di *B.bigemina*, e lo studio della sequenza aminoacidica della proteina ha rilevato l'assenza sia di un peptide segnale che di un'elica transmembrana. La sequenza aminoacidica della proteina è stata analizzata al fine di ricercare epitopi per le cellule B e numerosi peptidi differenti sono stati identificati. La regione amplificata è stata inserita nel vettore d'espressione, utilizzato per la trasformazione di cellule competenti di *E.coli* e per la sintesi della proteina in seguito ad induzione con IPTG. La proteina prodotta è stata purificata e utilizzata per l'allestimento di alcuni saggi ELISA al fine di verificare se essa fosse espressa negli animali infetti e se suscitasse in essi la produzione di anticorpi. Tali saggi hanno mostrato che i sieri degli animali positivi reagivano contro la proteina adesa al pozzetto, indicando la presenza in essi di anticorpi rivolti verso tale proteina. Questi dati offrono interessanti spunti di riflessione per la conduzione di studi futuri. Sarebbe infatti estremamente interessante completare la caratterizzazione di tale proteina con lo studio della sua possibile funzione *in vivo*.

Attenzione è stata rivolta anche al gene **rap1-b**, appartenente alla famiglia genica rap-1 che comprende alcuni tra i più importanti candidati per lo sviluppo di vaccini contro la babesiosi bovina. L'analisi delle sequenze ha mostrato un elevato grado di conservazione tra ceppi italiani e stranieri ed ha permesso di ottenere alcune informazioni predittive circa le caratteristiche della proteina. Lo studio delle proprietà immunogene di questa proteina, ulteriore spunto per la conduzione di studi futuri, potrebbe rivestire considerevole interesse.

Infine, essendo divenuta la quantizzazione degli acidi nucleici sempre più rilevante, tanto in campo diagnostico che di ricerca, sono stati ottimizzati dei protocolli in grado di rilevare efficacemente il numero di copie di acido nucleico presente nel campione di partenza, permettendo l'analisi di eventuali variazioni del livello di parassitemia nei diversi stadi di infezione. La babesiosi bovina è endemica nelle aree tropicali e più occasionalmente nelle zone temperate. La precoce diagnosi del patogeno migliora la prognosi. Tuttavia, il metodo di diagnosi classico (microscopia) è poco sensibile e solitamente fallisce la diagnosi negli animali portatori. I vantaggi offerti dall'impiego della Real Time PCR sono:

minori rischi di contaminazione, quantizzazione accurata del DNA del parassita ed elevata sensibilità. Tali vantaggi hanno recentemente indirizzato verso l'utilizzo di tale tecnica ai fini della diagnosi della babesiosi bovina. Nel presente studio è stato inizialmente ottimizzato un saggio di Real Time PCR basato sul metodo SYBR Green. Successivamente, ci si è rivolti all'ottimizzazione anche di un saggio di Real Time PCR secondo il metodo TaqMan. Tale metodica, infatti, basandosi sull'appaiamento di una sonda alla sequenza bersaglio, è in grado di assicurare una maggiore specificità, caratteristica fondamentale in ambito diagnostico. L'utilizzo di un test quantitativo ad alta sensibilità risulta estremamente utile dal momento che è in grado di rilevare, ad esempio, eventuali variazioni del livello di parassitemia nei diversi stadi di infezione o il monitoraggio dell'efficacia di un vaccino.

La babesiosi in Europa è presente da moltissimo tempo (Torina e Caracappa, 2007), ma per ragioni storiche ed economiche, gli unici studi scientificamente rilevanti, sono stati finora condotti soltanto nel Nuovo Continente. I risultati della presente ricerca sono di grande importanza in quanto per la prima volta in Italia, e più estesamente in Europa, si sta provvedendo alla caratterizzazione dei ceppi circolanti dal punto di vista biomolecolare. I dati ottenuti costituiscono una vera e propria primizia nel campo, e consentono una rilettura critica dei dati finora ottenuti con i ceppi circolanti nelle sole Americhe. La determinazione della conservazione di determinati epitopi, oppure della estrema variabilità di altri, consente di indirizzare le analisi verso lo studio di un determinato antigene di superficie piuttosto che di altri. Naturalmente la strada da percorrere verso la produzione e commercializzazione di un vaccino è ancora lunga. Diverse prove di somministrazione *in vivo* degli antigeni potenzialmente identificati sono necessarie per comprendere quali siano le migliori modalità di somministrazione, i tempi e le dosi in grado di assicurare l'efficacia del vaccino e, soprattutto, se gli anticorpi di cui inducono la produzione sono in grado di assicurare la protezione verso l'infezione da parte di ceppi diversi di *B.bigemina*. Lo studio condotto, consentendo la caratterizzazione di proteine del patogeno e l'individuazione di possibili candidati vaccinali, costituisce un rilevante primo passo nella lotta contro il patogeno *B.bigemina*.

La babesiosi bovina è un’infezione trasmessa dalle zecche Ixodidi. È la malattia del bestiame di maggiore impatto economico nel mondo, che causa significativa morbilità e mortalità (Bock et al., 2004). Le specie più diffuse, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, sono rinvenute in gran parte delle zone tropicali e subtropicali del pianeta. In Europa essa può essere considerata come malattia emergente e la sua epidemiologia nel continente necessita di essere attenzionata al fine di evitarne una crescita eccessiva. In Italia, in particolare, uno studio condotto mediante analisi di microscopia e sierologia nelle province del Centro e del Sud, ha stimato che la presenza delle infezioni dei patogeni *B.bovis* e *B.bigemina* sta incrementando (Savini et al., 1995).

L’obiettivo principale di questo progetto di ricerca è stato quello di caratterizzare proteine di *B.bigemina* per individuare tra queste quelle che fossero dotate di un buon livello di conservazione tra i ceppi e presentassero nel contempo buone proprietà antigeniche, al fine di poter ipotizzare un loro possibile impiego in un vaccino a subunità in grado di prevenire i casi clinici ad opera di *B.bigemina*. I vaccini attualmente in uso sono basati su parassiti vivi attenuati e, come descritto in precedenza, presentano un elevato numero di aspetti negativi che accentuano l’importanza di identificare idonei candidati vaccinali tra gli antigeni del parassita. Sebbene vaccini sperimentali a subunità sono stati sviluppati con successo per altri piroplasmidi trasmessi da zecche, quali *Theileria parva* o *B.divergens*, essi non esistono ancora per *B.bigemina*, probabilmente anche a causa della mancata identificazione di adeguati candidati vaccinali. Considerando l’elevato numero di bovini a rischio d’infezione nel mondo e l’elevato impatto sulle istituzioni governative e sugli allevatori causato dalla malattia, è possibile predire che un vaccino a subunità per *B.bigemina* contribuirebbe in modo significativo all’economia dei paesi affetti. Dal momento che gli attuali acaricidi stanno diventando sempre meno efficaci a causa dello sviluppo della resistenza nelle zecche e che i farmaci utilizzati per il trattamento anti-babesiosi potrebbero cadere in disuso a causa delle preoccupazioni sulla tossicità e sulla permanenza di residui nei tessuti/prodotti animali, la disponibilità di vaccini a subunità efficaci per la babesiosi bovina potrebbe essere di grande valore per gli allevatori di bestiame

nelle aree tropicali, subtropicali e, alla luce degli attuali cambiamenti climatici (vedi oltre) nelle regioni a temperatura moderata.

La diffusione del patogeno è naturalmente correlata a quella del vettore, che necessita di temperature da moderate ad elevate per riprodursi. La possibilità di diffusione di tale malattia, così come di molte malattie trasmesse da vettori, sta significativamente aumentando in Europa a causa del cambiamento globale, indicando con questa espressione il complesso dei cambiamenti ambientali che si sta verificando in tutto il mondo come risultato anche di attività umane. Questi fattori includono il riscaldamento globale, l'intensificazione del bestiame, l'estensione dell'irrigazione e un aumento del consumo di prodotti animali.

Essendo la maggior parte delle malattie trasmesse da vettori endemiche delle aree tropicali, questi cambiamenti tendono a favorirne un aumento della trasmissione in quanto ampliano l'area di diffusione del vettore anche in zone più fresche. La probabilità di trasmissione è ulteriormente aumentata dall'incremento della densità della popolazione umana. Pertanto si comprende l'importanza di studi, come quello qui riportato, che consentono di migliorare la comprensione della diffusione della babesiosi bovina causata da *B.bigemina*, lo sviluppo di metodi di controllo efficaci e poco costosi, la caratterizzazione di proteine del patogeno e l'individuazione di possibili candidati vaccinali.

Ringraziamenti

Il lavoro riportato nella presente tesi è stato reso possibile grazie ad una collaborazione tra l’Università degli Studi di Palermo e il Centro di Referenza Nazionale per *Anaplasma*, *Babesia*, *Rickettsia* e *Theileria* dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.

Parte del lavoro riportato nella presente tesi è stata sostenuta dai progetti di Ricerca Corrente finanziati del Ministero della Salute Italiano, IZSSI 02/07 e IZSSI 11/10.

Ringrazio, pertanto, la Dott.ssa Alessandra Torina, responsabile del CRABaRT, nonché co-tutor di questo progetto, per avermi dato la possibilità di condurre tale ricerca.

Un ringraziamento va anche alla Prof.ssa Albanese, per i preziosi consigli, la disponibilità e la pazienza mostrate e al Prof. La Farina, per il sostegno e l’aiuto offerti durante tutto il corso di dottorato. Si ringrazia la Prof.ssa Puglia per l’attenzione prestata alle tematiche analizzate e per i numerosi e preziosi suggerimenti offerti durante l’intero percorso.

Un ultimo grazie va anche alla Dott.ssa Agnone, per il supporto fornito e la disponibilità mostrata.

Bibliografia

- Angus B. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal of Parasitology* 26, 1341-1355.
- Beernink P.T. and Granoff D.M. (2008) Bactericidal Antibody Responses Induced by Meningococcal Recombinant Chimeric Factor H-Binding Protein Vaccines. *INFECTION AND IMMUNITY*, 2008, p. 2568–2575 Vol. 76, No. 6.
- Bock R., Jackson L., de Vos A., Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129 Suppl. S247-69
- Boustani MR, Gelfand JA. (1996). Babesiosis. *Clin Infect Dis*;22:611-5.
- Brown, W. C. and G. H. Palmer. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today* 15:275–281.
- Brown WC, McElwain TF, Ruef BJ et al.(1996). *Babesia bovis* rhoptry associated protein-1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect Immun* 1996; 64: 3341–3350.
- Buling A., Criado-Fornelio A., Asenzo G., Benitez D., Barba-Carretero J.C., Florin-Christensen M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology* 147; 16–25.
- Carcy B., Pre'cigout E., Schetters T., Gorenflot A. (2006). Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Veterinary Parasitology* 138, 33–49.
- Champagne D.E. (1994). The role of salivary vasodilators in blood feeding and parasite transmission. *Parasitol. Today* 10, 400-433.
- Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR 3rd, Herwaldt BL. (2006). Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: *Babesiidae*) from humans and its differentiation from other piroplasms. *Int J Parasitol*;36:779-89.
- Crewther P.E., Matthew M.L., Flegg R.H. and Anders R.F. (1996). Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect. Immun.* 64, 3310-3317.
- Criado-Fornelio A., Buling A., Asenzo G., Benitez D., Florin-Christensen M., gonzales-Oliva A., Henriques G., Silva M., Alongi A., Agnone A., Torina A., Madruga C.R.. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Veterinary Parasitology* Volume 162, pages 200-206.
- Criado-Fornelio A., Martinez-Marcos A., Buling-Serana A. and Barba-Carretero J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in Southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology* 114, 173-194.
- Cringoli G., Iori A., Rinaldi L., Veneziano V., Genchi C. (2005). *Mappe Parassitologiche*. Vol. VI: *Zecche*. Series Editor.
- de Waal D.T. and Combrink M.P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology* Volume 138, Issues 1-2, 31, Pages 88-96.
- Dubendorf JW and Studier FW, (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol.* May 5;219(1):45-59.

- Earnhart, C.G., Buckles E.L., and Marconi R.T. (2007). Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine* 25:466–480. 15. Finne, J., M.
- Escalante A.A., H.M. Grebert, S.C.Chaiyaroj, M. Magris, S. Biswas, B.L. Nahlen, A.A. Lal (2001). Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. *Mol Biochem Parasitol.* 113(2):279-287.
- Esernio-Jenssen D, Scimeca PG, Benach JL, Tenenbaum MJ. (1987). Transplacental/perinatal babesiosis. *J Pediatr*;110:570-2.
- Evenson DA, Perry E, Kloster B, Hurley R, Stroncek DF. (1998) Therapeutic apheresis for babesiosis. *J Clin Apheresis*;13:32-36.
- Ferre F. and Clote P. (2005). DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res*; 33 W230-232.
- Ferre F. and Clote P. (2006). DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res.*
- Figuroa J.V., Chieves L.P., Johnson G.S., Buening G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology* 50, 69-81
- Finn R.D., Tate J., Mistry J., Coghill P.C., Sammut J.S., Hotz H.R., Ceric G., Forslund K., Eddy S.R., Sonnhammer E.L. and Bateman A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 36, D281-D288.
- Fisher T.G., McElwain T.F., And Palmer G.H. (2001). Molecular Basis for Variable Expression of Merozoite Surface Antigen gp45 among American Isolates of *Babesia bigemina*. *INFECTION AND IMMUNITY*, June, p. 3782–3790 Vol. 69, No. 6.
- Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.F., de Vries E., 2004a. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Jul;136(1):25-34.
- Gaffar, F.R., Yatsuda A. P., Franssen F. F., and de Vries E.. 2004b. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 72:2947–2955.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.
- Giuliani, M.M., Adu-Bobie J., Comanducci M., Arico B., Savino S., Santini L., Brunelli B., Bambini S., Biolchi A., Capecchi B., Cartocci E., Ciucchi L., Di Marcello F., Ferlicca F., Galli B., Luzzi E., Massignani V., Serruto D., Veggi D., Contorni M., Morandi M., Bartalesi A., Cinotti V., Mannucci D., Titta F., Ovidi E., Welsch J.A., Granoff D., Rappuoli R., and Pizza M. (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10834–10839.
- Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schetters TP. Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1998;92:489-501.
- Griffin B.A., Stephen R.A., Roger Y.T. (1998). Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells *Science* 10 July: Vol. 281. no. 5374, pp. 269 – 272.
- Hadj-Kaddour K, Carcy B, Vallet A, Randazzo S, Delbecq S, Kleuskens J, Schetters T, Gorenflot A, Precigout E. (2007). Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology.* 2007 Feb;134(Pt 2):187-96.

- Hajnická V, Fuchsberger N, Slovák M, Kocakova P, Labuda M, Nuttall PA. (1998). Tick salivary gland extracts promote virus growth *in vitro*. *Parasitology*. Jun;116 (Pt 6):533-8.
- Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF, Suarez CE, Vidotto O, Rice-Ficht AC. (1995). Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. *Mol Biochem Parasitol*; 69:149-59.
- Hodder, A.N., P.E. Crewther, M.L.S.M. Matthew, G.E. Reidi, R.L. Moritzi, R.J. Simpsoni, and R.F. Anders, (1996). The Disulfide Bond Structure of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen-1. *The Journal Biological Chemistry* 271, No. 46, 29446–29452.
- Hodder, A.N., P.E. Crewther, Anders R.F. (2001) Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen1. *Infect. Immun.* 69: 3286-3294.
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR., Krause PJ., and Persing DH (2000a). Babesiosis. *Clin Microbiol Rev.* July; 13(3): 451–469.
- Homer MJ, Bruinsma ES, Lodes MJ, Moro MH, Telford S 3rd, Krause PJ, Reynolds LD, Mohamath R, Benson DR, Houghton RL, Reed SG, Persing DH (2000b). A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti*. *J Clin Microbiol*;38:362-8.
- Iori A, Gabrielli S, Calderini P, Moretti A, Pietrobelli M, Tampieri MP, Galuppi R, Cancrini G. (2010) Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet Parasitol.* 2010 Jun 24;170(3-4):291-6.
- Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WR, Webster HK. (1993). Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:478–484.
- Karbowiak G, Sinski E. (1996). The finding of *Babesia microti* in bank vole *Clethrionomys glareolus* in the district of the Mazury Lakes (Poland). *Acta Parasitol*;41:50-51.
- Kaufman, W.R. (1989). Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol, Today* 5, 47-56.
- Krause PJ, Spielman A, Telford III SR, Sikand VK, McKay K, Christianson D, Pollack RJ, Brassard P, Magera J, Ryan R, Persing DH (1998). Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Engl J Med*;339:160-5.
- Kumar S., J. Dudley, M. Nei and K.Tamura (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9 299-306.
- Lal A.A., M.A. Hughes, D.A. Oliveira, C. Nelson, P.B. Bloland, A.J. Oloo, W.E. Hawley, A.W. Hightower, B.L. Nahlen, V. Udhayakumar, (1996). Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria. *Infect Immun.* 64(3):1054-1059.
- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, Wilm A., R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins (2007). ClustalW and ClustalX version 2, 2007. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Latitha, P.V.,S. Biswas,C.R. Pillai R.K. Saxena, (2008): Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine candidate, domain I + II of AMA-1 ectodomain, from Indian *P. falciparum* alleles. *Vaccine* 26, 4526-4535.
- LeRoch K.G., Zhou Y., Blair P.L., Grainger M., Moch J.K., Haynes J.D., De La Vega P., Holder A.A., Batalov S., Carucci D.J., and Winzeler E.A. (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 3001, 1503-1508.
- Levine ND (1971). Taxonomy of piroplasms. *Trans Am Microsc Soc*;90:2-33.

Levine, ND. (1988). The protozoan phylum apicomplexa. Vol. 2. Boca Raton, Fla: CRC Press.

Lodes MJ, Houghton RL, Bruinsma ES, Mohamath R, Reynolds LD, Benson DR, Krause PJ, Reed SG, Persing DH. (2000). Serological expression cloning of novel immunoreactive antigens of *Babesia microti*. *Infect Immun*; 68:2783-90.

Manilla G. (1998). Fauna d'Italia Vol. XXXVI Acari-Ixodida. Ed Calderini, Bologna, Italy.

McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, McGuire TC. (1991) Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol.*;47(2):213-22.

McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E. (2000) Transmission of tickborne agents by blood transfusions: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion*;40:274-84.

Mital J., Meissner M., Soldati D., and Ward G.E. (2005). Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 16, 4341–4349.

Montero E., Rodriguez M., Oksov Y., and Lobo C.A. (2009). *Babesia divergens* Apical Membrane Antigen 1 and Its Interaction with the Human Red Blood Cell. *Infection and Immunity*, p. 4783–4793.

Mosqueda J., Ramos J., Falcon A., Agnone A., Torina A., Figueroa J, Alvarez A., Bautista R., Cantò G. (2007). Identification and molecular characterization of an antigen of *Babesia bigemina* with homology to the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of Apicomplexa. VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Book of proceedings. 234.

Musoke A, Rowlands J, Nene V, Nyanjui J, Katende J, Spooner P, Mwaura S, Odongo D, Nkonge C, Mbogo S, Bishop R, Morzaria S. (2005). Subunit vaccine based on the p67 major surface protein of *Theileria parva* sporozoites reduces severity of infection derived from field tick challenge. *Vaccine*. 2005 Apr 27;23(23):3084-95.

New DL, Quinn JB, Qureshi MZ, Sigler SJ. (1997) Vertically transmitted babesiosis. *J Pediatr* 1997;131:163-4.

Palmer GH and McElwain TF. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet Parasitol*. 1995 Mar;57(1-3):233-53.

Pereira FJT., Cordeiro JA., Hoffmann EHE., Ferreira MU. (2002). Genetic diversity and differentiation in natural *Plasmodium falciparum* populations inferred by molecular typing of the merozoite surface proteins 1 and 2. *Rev. Sociedade Brasileira de Med. Trop*. 35, 527-530.

Persing DH, Conrad PA. (1995). Babesiosis: new insights from phylogenetic analysis. *Infect Agents Dis* 1995;4:182–195.

Pruthi RK, Marshall WF, Wiltsie JC, Persing DH. (1995). Human babesiosis. *Mayo Clin Proc* 1995;70:853–862.

Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW, Garnett ME, Eberhard ML, Wilson M, Spach DH, Dickerson JW, Telford III SR, Steingart KR, Pollock R, Persing DH, Kobayashi JM, Juranek DD, Conrad PA (1993). Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? *Ann Intern Med*;119:284–290.

Rodriguez SD, Palmer GH, McElwain TF et al.(1996). CD4+ T helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein-1. *Infect Immun*; 64: 2079–2087.

Savini G, Conte A, Semproni G, Scaramozzino P. (1995). Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports. *Parassitologia*. Sep;41 Suppl 1:95-100.

Shih C.M., Chao L.L., Yu C.P. (2002). Chemotactic migration of the Lyme disease spiroargase (Borrelia burgdorferi) to salivary gland extracts of vector ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(5), 616-21.

Silvie O., Franetich J.F., Charrin S., -mueller M.S., Siau A., Bodescot M., Rubinstein E., Hannoun L., Charoenvit Y., Kocken C.H et al., (2004). A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. *J. Biol. Chem.* 279, 9490-94-96.

Smith T and Kilbourne FL. (1893). Investigation into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington, DC: US Department of Agriculture.

Smith RD, James MA, Ristic M, Aikawa M, Vega y Murguia CA. (1981). Bovine babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble Babesia bovis antigen. *Science*; 212:335–338.

Spring M.D., Cummings J.F., Ockenhouse C.F., Dutta S., Raidler R., Angov E., et al. (2009). Phase 1/2a Study of the Malaria Vaccine Candidates Apicam Membrane Antigen-1 (AMA-1) administered in Adjuvant System AS01B or AS02A. *Vaccine Trial Vol. 4 Issue 4* e5254.

Suarez E.C., Palmer H.G., Florin-Christensen M, Hines A.S., Hotzel I., McElwain F.T. (2003). Organization, transcription and expression of rhoptry associated protein genes in the Babesia bigemina rap-1 locus. *Molecular & Biochemical Parasitology* 127, 101-112.

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1515.

Tebele N, Skilton RA, Katende J, Wells CW, Nene V, McElwain T, Morzaria SP, Musoke AJ. (2000). Cloning, characterization, and expression of a 200-kilodalton diagnostic antigen of Babesia bigemina. *J Clin Microbiol.* Jun;38(6):2240-7.

Telford III SR, Gorenflot A, Bresseur P, Spielman A. (1993). Babesial infections in humans and wildlife. In: Kreier JP, editor. *Parasitic protozoa*, Vol. 5. San Diego, CA: Academic Press, pp. 1-47.

Torina A. and Caracappa S., (2007). Babesiosis in Italy: an overview. *Parassitologia* 49 (Suppl.1): 23-28.

Torina A., Agnone A., Sireci G., Mosqueda J.J., Blanda V., Albanese I., La Farina M., Cerrone A., Cusumano F., Caracappa S. (2009). Characterization of the Apical Membrane Antigen 1 in two Italian Strains of *Babesia bigemina* Presentato alla decima Conferenza biennale STVM (Society for Tropical Veterinary Medicine), Lübeck (Germania), 28 giugno-3 luglio 2009.

Torina A., Agnone A., Sireci G., Mosqueda J.J., Blanda V., Albanese I., La Farina M., Cerrone A., Cusumano F., Caracappa S. (2010). Characterization of the Apical Membrane Antigen 1 in two Italian Strains of *Babesia bigemina*. *Transboundary and Emerging Diseases (Formerly Journal of Veterinary Medicine Series A)* 57 (2010) 52–56.

Ushe C.T., Palmer H.G., Sotomayor L., Figuero V.J., Buening M.G., Perryman E.L., And McElwain F.T. (1994). Antibody Response to a *Babesia bigemina* Rhoptry-Associated Protein 1 Surface-Exposed and Neutralization-Sensitive Epitope in Immune Cattle. *INFECTION AND IMMUNITY*, Dec. p. 5698-5701.

Xia, X. (2000). Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic publishers, Boston. 276.

Xia, X. and Z. Xie, (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92, 371-373.

Yokoyama N., Okamura M., Igarashi I. (2006). Erythrocyte invasion by Babesia parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology* Volume 138, Issues 1-2, 31 May 2006, Pages 22-32.

Zhang, P., Jespersgaard C., Lamberty-Mallory L., Katz J., Huang Y., Hajishengallis G., and Michalek S. M.. (2002). Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two

virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection. *Infect. Immun.* 70:6779–6787.

Zhou J., Yang J., Zhang G., Nishikawa Y., Fujisaki K., Xuan X. (2006). *Babesia gibsoni*: An apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in the infected dogs. *Experimental Parasitology* 114: 329–333.