

# RECENTI ACQUISIZIONI IN TEMA DI PROFILASSI VACCINALE DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA

**BARBARA DI MARTINO\***, Dottoranda di ricerca in Discipline Anatomicopatologiche Veterinarie

**CRISTINA DI FRANCESCO\*\***, Medico Veterinario

**FULVIO MARSILIO\*\***, Ricercatore

Dipartimento di Strutture, Funzioni e Patologie degli Animali e Biotecnologie

\* Sezione di Patologia Generale e di Anatomia Patologica Veterinaria

\*\* Sezione di Microbiologia, Malattie Infettive e Parassitarie

Università degli Studi di Teramo - 64020 - Loc. Piano d'Accio (Teramo)

## Riassunto

Tra i retrovirus felini FIV è quello che maggiormente ha polarizzato l'attenzione dei ricercatori, in quanto dal "modello felino" si spera di ottenere contributi significativi soprattutto nel campo della profilassi dell'immunodeficienza dell'uomo sostenuta da HIV. L'allestimento di vaccini nei confronti dei lentivirus ha permesso di capire molti dei meccanismi immunologici alla base della protezione, ma non si è ancora in possesso di un prodotto efficace. Scopo del lavoro è quello di passare in rassegna le più recenti acquisizioni in materia di profilassi vaccinale dell'infezione da FIV.

## Summary

*Among the feline retroviruses, the researchers focused their attention on FIV because they hoped to achieve some significant elements, especially in the field of the HIV prophylaxis. The assessment of the vaccines against the lentiviruses allowed to understand many immunological mechanisms, necessary to the protection; nevertheless, an effective vaccine is not ready yet. This paper is aimed to review the latest knowledges about vaccinal FIV prophylaxis.*

## INTRODUZIONE

Per molti anni si è creduto che l'informazione genetica potesse fluire soltanto dal DNA all'RNA e questa asserzione divenne nota come *dogma centrale* della biologia. Invece, non molti anni fa, il dogma è stato sovvertito dalla scoperta di un gruppo di entità biologiche chiamate *retrovirus* provviste di un corredo genetico costituito da RNA<sup>1</sup>. I retrovirus contengono un enzima chiamato *transcriptasi inversa* che utilizza l'RNA come stampo per produrre il DNA, il quale integrandosi nel genoma della cellula ospite, costituisce la base per la replicazione virale.

La famiglia *Retroviridae* include diversi generi, tra cui il genere *Lentivirus*, al quale appartengono patogeni diversi, non oncogeni, responsabili di gravi infezioni negli animali e nell'uomo (Tab. 1).

**Tabella 1**  
Il genere *lentivirus*

VIRUS	OSPITE
Virus dell'Immunodeficienza Acquisita (HIV 1 e 2)	Uomo
Virus dell'Immunodeficienza delle Scimmie (SIV)	Scimmie
Virus dell'Immunodeficienza del Gatto (FIV)	Felini
Virus del Visna/Maedi (VMV)	Ovini
Virus dell'Artrite/Encefalite (CAEV)	Caprini
Virus dell'Anemia Infettiva Equina (EIAV)	Equini
Virus dell'Immunodeficienza Bovina (BIV)	Bovini

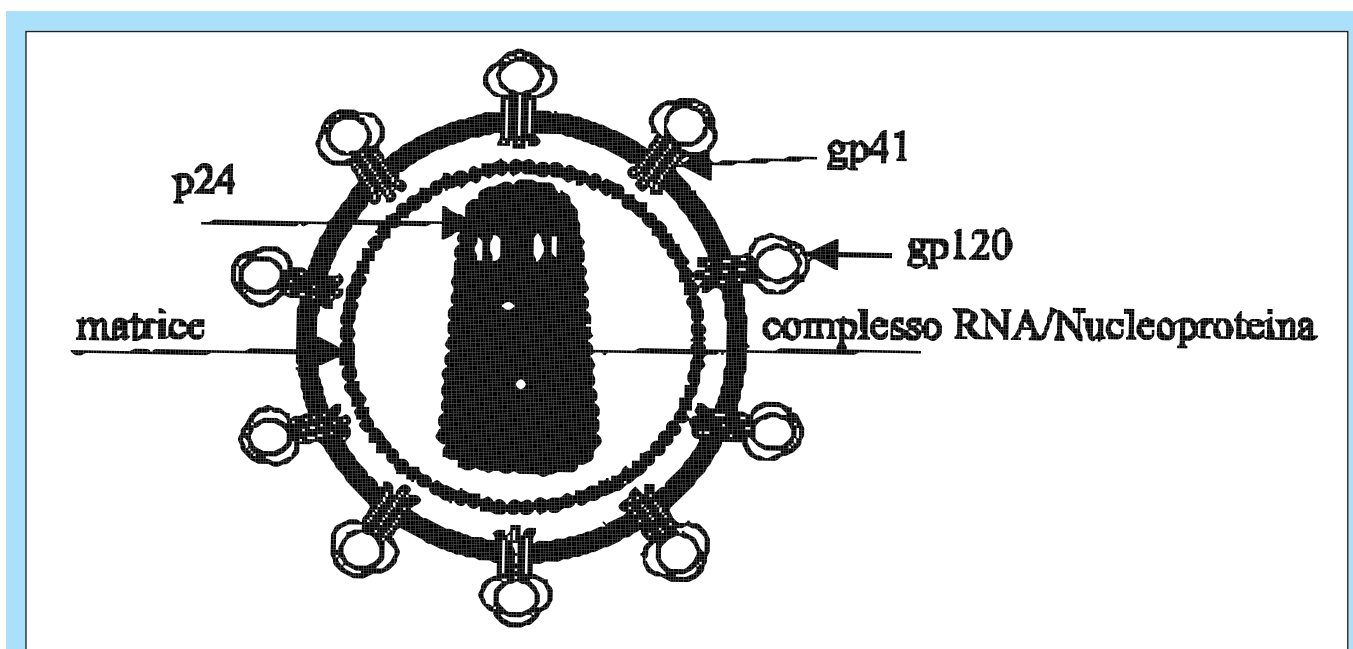


FIGURA 1 - Rappresentazione schematica di un lentivirus.

Le caratteristiche morfologiche di questi virus sono comuni alla famiglia di appartenenza. Tuttavia esistono differenze per quel che riguarda la patogenesi e la sintomatologia clinica con l'eccezione di FIV che nel gatto è in grado di sostenere un'infezione dal punto di vista patogenetico e sintomatologico analoga a quella indotta da HIV nell'uomo. Infatti, tra i retrovirus capaci di infettare il gatto, FIV è quello che ha polarizzato maggiormente l'attenzione dei ricercatori nell'ultimo decennio, in quanto dal "modello felino" si spera di ottenere contributi significativi soprattutto nel campo della profilassi dell'infezione sostenuta da HIV.

I *lentivirus* sono virus caratterizzati da una struttura complessa. Le particelle virali appaiono sferiche con un diametro approssimativo di 80-100 nm e sono provviste di un *envelope* formato da due strati di natura lipidica tra i quali si interpongono le glicoproteine strutturali che danno origine a proiezioni esterne a forma di pomello costituenti i *peplomeri*. Al di sotto dell'*envelope*, in stretto contatto con la sua parete interna, è presente un guscio proteico denominato *matrice* o *membrana interna* che avvolge il *capside* (Fig. 1).

L'acido nucleico dei retrovirus è costituito da un singolo filamento di RNA lineare a polarità positiva, presente in due molecole identiche fra loro. Ancora non è chiaro quali siano le funzioni del dimero e che tipi di legami stabilizzino le due molecole. Negli ultimi anni la maggior parte delle ricerche è stata polarizzata sullo studio di regioni palindromiche localizzate nella sequenza *leader 5'* di numerosi retrovirus e caratterizzate dalla presenza di una serie di strutture definite *stem-loop* (a coppia allungata). Una di queste (denominata *SL1*), contenente un palindromo terminale, sembrerebbe comportarsi da elemento essenziale per iniziare il processo di dimerizzazione; la complementarità in basi tra le due molecole permetterebbe l'interazione e quindi la formazione del dimero. Tuttavia molti ricercatori sostengono che l'auto-complementarità tra i palindromi sia insufficiente a garantire la stabilità del dimero, per cui una delle più recenti teorie sostiene che all'interno degli *stem-loop* si abbiano ulteriori interazioni denominate *kissing-hairpin*<sup>2</sup>.

Le proteine strutturali si suddividono in profonde (proteine *gag*) e superficiali (proteine *env*) e sono codificate rispettivamente dai geni *gag* ed *env*. Oltre ai due gruppi menzionati, sono presenti nel virione le proteine *pol* rappresentate dalla *DNA-polimerasi RNA-dipendente* o *transcriptasi inversa*, *integrasi* e *proteasi* che vengono codificate dall'omonimo gene *pol*. Come altri *lentivirus*, FIV presenta una notevole variabilità genetica a causa di sostituzioni che intervengono nel gene *env*, responsabile della codifica della glicoproteina *gp160*, un eterodimero formato da due subunità unite in più punti da legami non covalenti: la *gp120* e la *gp41*. La *gp120*, anche chiamata *subunità SU*, è una proteina idrofila, altamente glicosilata posta sulla superficie esterna del virione, contenente il sito di adsorbimento al recettore cellulare e gli antigeni tipo-specifici che vengono riconosciuti dagli anticorpi virus-neutralizzanti; la *gp41*, anche chiamata *subunità TM*, è idrofobica, contiene 4 siti di glicosilazione ed è posta nello spessore dell'*envelope*.

È ormai dimostrato che la *gp120* risulta costituita da cinque domini altamente variabili (V1, V2, V3, V4 e V5) interposti tra sequenze aminoacidiche (C1, C2, C3 e C4) la cui composizione rimane abbastanza conservata; i domini ipervariabili si distribuiscono nello spazio formando tipiche strutture a coppia (*loop*) a volte chiuse alla loro estremità da un ponte disolfuro<sup>3</sup> (Fig. 2).

Gli anticorpi neutralizzanti verso i *lentivirus* sono rivolti nei confronti dell'intera glicoproteina dell'*envelope*, anche se gli epitopi immunodominanti si trovano nel dominio V3<sup>4</sup>.

Gli insuccessi finora ottenuti nel campo della profilassi immunizzante sono fondamentalmente legati all'abilità di FIV di modificare rapidamente il proprio disegno antigenico di superficie sfuggendo all'azione del sistema immunitario e attuando quindi l'*escape immunologico*; quali siano i meccanismi che gli conferiscono questa proprietà non sono ancora del tutto chiari. Una delle teorie maggiormente accreditate è quella che attribuisce tale capacità alla mancata "accuratezza" della *transcriptasi inversa* durante il montaggio del DNA; in questa fase verrebbero apportate una serie

di modificazioni esprimibili con sostituzioni, delezioni o inserzioni di una o più coppie di basi, che sarebbero quindi responsabili della variabilità che caratterizza i *lentivirus*<sup>5</sup>.

Un'altra teoria è quella sostenuta da Coffin<sup>6</sup>, che ha ipotizzato che il lungo periodo definito come fase clinicamente silente che caratterizza non solo l'infezione da FIV nel gatto, ma anche quella da HIV nell'uomo, non è un periodo di inattività virale, bensì una fase di attiva replicazione. Questo modello parte dal presupposto che nei soggetti infetti si vengono a formare due distinte popolazioni cellulari: una popolazione di cellule sane ed una di cellule infette. Quest'ultima include due ulteriori gruppi: cellule che ancora non hanno prodotto il virus (*DNA-positivo, RNA-negativo*) e cellule che lo stanno producendo (*DNA-positivo, RNA-positivo*). Ad un certo punto le cellule che danno origine a nuovi virioni muoiono (o per azione diretta o per meccanismi immuno-mediati o per apoptosi), e vengono immediatamente sostituite da cellule DNA-positive RNA-negative, le quali a loro volta vengono rimpiazzate da cellule sane; in pratica si tratta di un sistema molto semplice che vede sempre un equilibrio tra le cellule che muoiono e cellule sane in attiva replicazione. Questa fase in realtà sarebbe uno stadio caratterizzato sia da notevole replicazione virale che cellulare. Inoltre il continuo *turnover* porterebbe allo sviluppo di numerose mutazioni genetiche che sarebbero responsabili della variabilità antigenica tipica dei *lentivirus*.

## I VACCINI

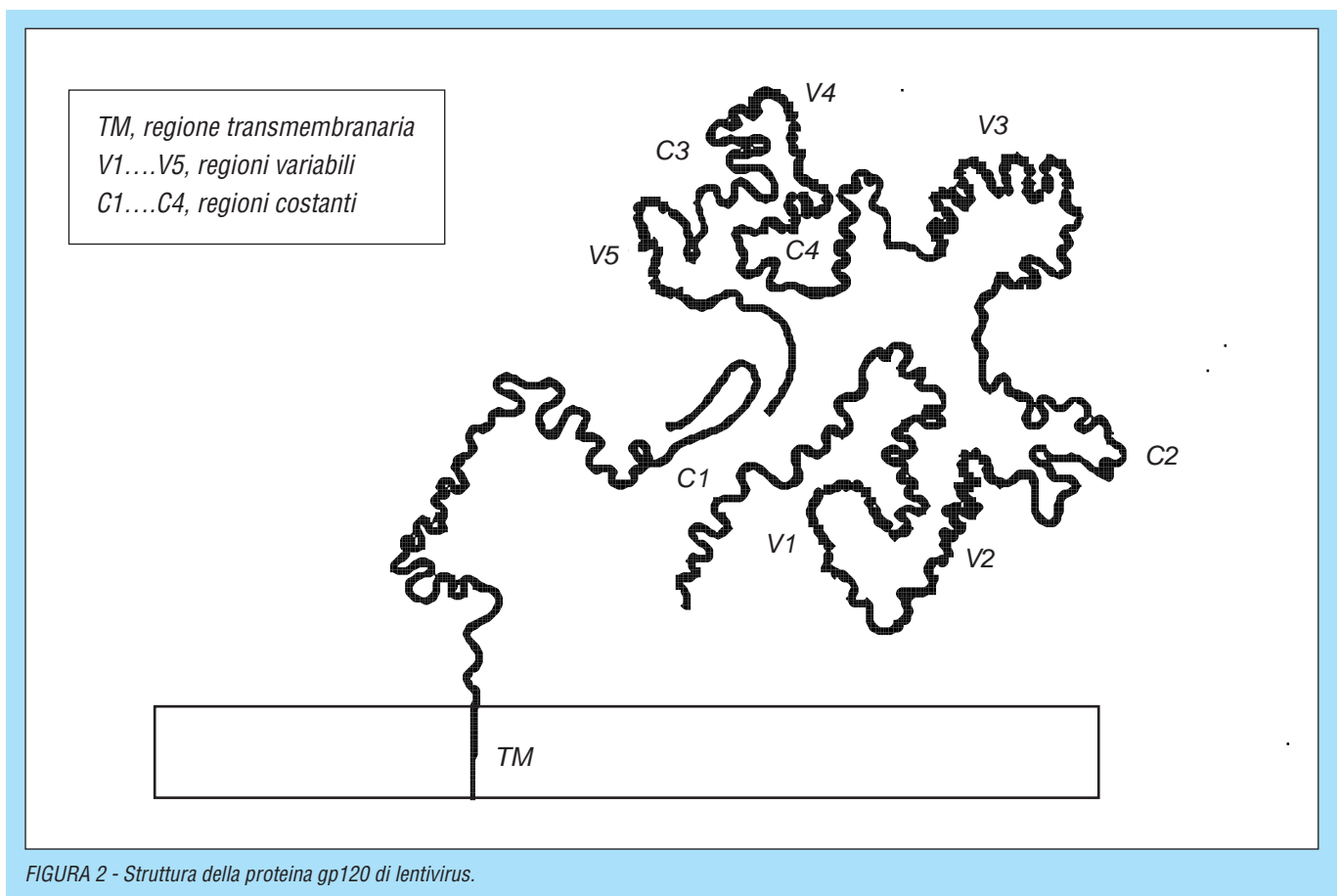
Il vaccino ideale per la lotta contro le lentivirosi dovrebbe

presentare i seguenti requisiti: essere protettivo nei confronti di tutti i sierotipi ostacolando l'attuazione di un *escape* immunologico, impedire l'integrazione del genoma virale in quello cellulare ed infine assicurare l'instaurarsi di una barriera immunologica a livello mucosale.

I tentativi di vaccinazione effettuati finora sono risultati inefficaci, anche se di recente sono state avviate sperimentazioni basate sull'allestimento dei vaccini a DNA, i quali a differenza della maggior parte degli altri vaccini che normalmente inducono una risposta di tipo anticorpale, stimolano l'attività dei linfociti T-citotossici (CTL)<sup>7</sup>. Ciononostante le tecniche vaccinali tradizionali hanno dato un grande contributo per la comprensione delle numerose proprietà di questo gruppo virale e tuttora vengono impiegate sia al fine di conoscere i meccanismi immunitari indispensabili per indurre protezione, sia per valutarne l'efficacia *in vivo*.

## Vaccini interi spenti

La maggior parte degli studi sperimentali condotti su FIV, si è basata sull'allestimento di vaccini interi spenti. Il primo successo fu ottenuto da Yamamoto *et al.*<sup>8</sup>, i quali utilizzarono come antigeni immunogeni sia il virus intero inattivato, sia le cellule infettate dal virus. I risultati ottenuti furono sorprendenti, in quanto nella prova *challenge* risultò protetto il 90% dei gatti infettati con il virus omologo coltivato *in vitro*. Nel 1993 Yamamoto *et al.*<sup>9</sup> ripeterono l'esperimento utilizzando nella prova *challenge* sia il virus omologo che il sierotipo eterologo FIV Dixon (FIV<sub>DIX</sub>) (sottotipo A; 9% di differenza nella sequenza aminoacidica di *env*). Entrambi i



vaccini, precedentemente menzionati, stimolarono una forte risposta immunitaria, tanto da indurre un'ottima protezione nei confronti di entrambi i sierotipi; nel siero dei gatti vaccinati era presente un alto titolo anticorpale costituito da anticorpi anti-*core*, anti-*env* e anticorpi *virus-neutralizzanti*. Nel corso di tale studio, la durata della protezione non era stata testata, inoltre la risposta anticorpale tendeva a declinare dopo circa sei mesi dall'induzione dell'effetto *booster*; ciononostante al momento del richiamo (non seguito da una nuova prova *challenge*) si osservava in tutti i gatti una buona risposta anticorpale.

Questi primi successi avrebbero potuto rappresentare l'inizio di una ricerca ben orientata anche per l'allestimento di un prodotto vaccinale efficace nei confronti di HIV-1; ma le prove sperimentali condotte successivamente, non hanno fornito risultati altrettanto incoraggianti. Ad esempio nello studio condotto da Hosie *et al.*<sup>10</sup>, durante il quale è stata utilizzata nella prova *challenge* un'altra variante eterologa rappresentata da FIV/Glasgow-8 (FIV<sub>GL-8</sub>) (11% di differenza nella sequenza aminoacidica di *env*), la protezione indotta dal vaccino intero allestito con FIV Petaluma (FIV<sub>PET</sub>) non è risultata efficace nei confronti di sierotipi antigenicamente distinti. Precedentemente a queste ricerche comunque condotte utilizzando tecniche vaccinali convenzionali, Hosie *et al.*<sup>11</sup> avevano avviato una serie di studi che prevedevano l'allestimento di diversi tipi di preparazioni vaccinali, tra le quali anche il vaccino intero purificato incorporato in un adiuvante di nuova generazione costituito dal Complesso immunostimolante (ISCOM). Alla prova *challenge*, eseguita

inoculando basse dosi del virus omologo, tutti i gatti, a distanza di due o tre settimane diventavano viremici; sebbene nel siero dei gatti vaccinati fosse presente un alto titolo di anticorpi rivolto contro le proteine del *core* (*p24*), gli anticorpi anti-gp120 o gli anticorpi *virus-neutralizzanti* erano quasi del tutto assenti. Questo risultato, era conseguente al trattamento di purificazione che aveva determinato una parziale denaturazione delle proteine di superficie. Al contrario, i gatti immunizzati con il vaccino intero inattivato, allestito con cellule infette presentavano un alto titolo di anticorpi anti-gp120 e di anticorpi neutralizzanti. Il risultato ottenuto, mise in evidenza l'importanza delle proteine dell'*envelope* e dell'immunità umorale, come uno dei meccanismi che partecipa attivamente a proteggere l'organismo nei confronti dell'infezione.

Tuttavia, da quanto detto, non si può affermare che l'immunità umorale sia l'elemento fondamentale per ottenere protezione. Infatti, Matteucci *et al.*<sup>12</sup> hanno osservato che nei gatti vaccinati con cellule infettate inattivate e poi sottoposti alla prova *challenge*, eseguita utilizzando il virus omologo proveniente direttamente da un donatore infetto, la protezione è raggiungibile, anche in assenza di anticorpi *virus-neutralizzanti*. In questo caso, i gatti sono stati vaccinati con il sierotipo FIV-M2 e per creare delle condizioni che si avvicinasero a quelle di un'infezione reale, la prova *challenge* è stata eseguita utilizzando il sangue di un soggetto infetto. Considerando l'origine del virus *challenge* e l'assenza di protezione nei soggetti utilizzati per il controllo, sembrerebbe che in questo caso, l'attività neutralizzante mediata dal-

l'immunità umorale, non abbia avuto un ruolo essenziale per il raggiungimento della protezione.

Quest'ultima, valutata nel corso di uno studio più recente<sup>13</sup>, sembra dipendere anche dal tipo di infezione: se alla prova *challenge* vengono inoculate cellule infette, l'effetto protettivo ha una maggiore persistenza, se invece, viene inoculato il virus libero, l'efficacia in termini di durata, si riduce notevolmente. Non è chiaro se ciò sia dovuto al fatto che quando è associato alle cellule, FIV viene più facilmente bloccato che nella forma extracellulare, oppure che il meccanismo responsabile del controllo immunologico dei due tipi di *challenge* è distinto.

### Vaccini vivi attenuati

Una possibile causa del fallimento dei vaccini spenti verso varianti eterologhe, potrebbe essere attribuibile alla "forma" degli immunogeni, probabilmente non sufficientemente potenti per indurre una risposta immunitaria efficace anche nei confronti di ceppi eterologhi<sup>14</sup>. Partendo da questo presupposto alcuni ricercatori hanno eseguito delle sperimentazioni basate sull'uso di vaccini vivi attenuati. Sebbene la possibile virulenza residua possa limitarne l'uso soprattutto nell'uomo, i vaccini attenuati (che tuttora prevedono di sfruttare come modello sperimentale SIV) hanno permesso di ottenere numerose informazioni riguardanti i meccanismi immunitari coinvolti<sup>15</sup>. Nello studio condotto da Pistello *et al.*<sup>14</sup>, un gruppo di gatti SPF (*Specific Pathogen Free*) è stato vaccinato con il sierotipo FIV<sub>PET</sub>, dopo parziale attenuazione attraverso ripetuti passaggi su linee cellulari di origine felina; alla prova *challenge* i gatti sono stati infettati con il sierotipo FIV-M2, noto per la sua alta virulenza. I risultati ottenuti sono stati in parte deludenti, in quanto la protezione nei confronti del ceppo eterologo non è stata raggiunta; tuttavia al termine della sperimentazione durata circa tre anni, nel sangue dei gatti è stata accertata la presenza di una bassa carica virale associata ad un progressivo aumento dei linfociti CD4+. Tale comportamento suggerisce che a distanza di tempo, il vaccino vivo attenuato è in grado di conferire protezione nei confronti di ceppi altamente virulenti, anche se i fattori responsabili di questo effetto sono ancora poco chiari.

### Vaccini a subunità e ricombinanti

Per l'allestimento dei vaccini ricombinanti o costituiti da subunità, sono state utilizzate le proteine del capsido, le proteine transmembrinarie e soprattutto le glicoproteine di superficie.

Nel corso di alcune sperimentazioni<sup>16,17,18,19</sup> è stato ripetutamente dimostrato l'insufficiente effetto protettivo conseguente all'immunizzazione con i vaccini a subunità, tuttavia le stesse hanno permesso di chiarire e valutare alcuni aspetti che precedentemente non erano stati presi in considerazione.

Nello studio condotto da Lombardi *et al.*<sup>17</sup> è stato valutato se la subunità V3 fosse in grado di conferire protezione nei gatti infettati sperimentalmente: nonostante gli alti livelli di anticorpi neutralizzanti, i soggetti vaccinati ed in seguito sottoposti alla prova *challenge* con il virus omologo, risulta-

vano indifesi nei confronti dell'infezione. Questi risultati, concordano perfettamente con quelli ottenuti nel corso di altre ricerche<sup>18</sup>. È ipotizzabile che il mancato successo dei vaccini a subunità e ricombinanti, sia da ricercare nelle seguenti motivazioni: (i) è stato più volte dimostrato, sia *in vitro* che *in vivo*, che in presenza di anticorpi *virus-neutralizzanti* viene favorita la selezione di mutanti virali resistenti alla neutralizzazione, così, la mancata protezione, conseguente all'immunizzazione di gatti SPF con la subunità V3, potrebbe essere fondamentalmente attribuibile allo sviluppo di mutanti in grado di esplicare un *escape* immunologico; ciò sarebbe stato confermato anche dalle analisi eseguite per mezzo della PCR<sup>17</sup>; (ii) un altro aspetto da valutare è rappresentato dalla effettiva immunogenicità del dominio V3. Inoltre l'uso di peptidi sintetici, ha permesso di verificare la presenza nella regione V3 di siti immunodominanti capaci di conservare una certa stabilità nella loro sequenza aminoacidica. Altri epitopi sono stati identificati nel dominio V4 (da Gli-467 a Asn-481), V5 (da Cis-534 a Gli-568) e V6 (da Pro-593 a Lis-610)<sup>20</sup>. Tuttavia, è bene considerare che l'analisi dell'attività neutralizzante di questi epitopi, è stata sempre eseguita attraverso test di "inibizione la formazione di sincizi su linee cellulari Crandell Feline Kidney (CrFK)"<sup>21</sup>. Al contrario non è stata dimostrata attività neutralizzante quando le stesse analisi sono avvenute su substrati cellulari costituiti dai linfociti T di origine felina, usando comunque un sierotipo omologo. È stato ipotizzato che l'adattamento del virus a replicare su un substrato cellulare che può essere diverso (CrFK) o simile (FL4) a quello naturale, alteri la sensibilità dei ceppi che normalmente vengono utilizzati per indurre infezione sperimentale nei gatti precedentemente vaccinati; da ciò deriverebbe la capacità degli anticorpi a neutralizzare il virus precedentemente sottoposto ad attenuazione<sup>19</sup>. Nell'infezione dell'uomo sostenuta da HIV è stato descritto un fenomeno simile: gli anticorpi che neutralizzano diversi sierotipi di HIV adattati su linee cellulari costituite da linfociti T umani, risultano inefficaci ad eliminare il virus "selvaggio"<sup>22</sup>.

La differenza fondamentale tra il vaccino a subunità ed il vaccino intero è che quest'ultimo contiene un complesso di antigeni virali e cellulari che vengono presentati al sistema immunitario dell'ospite come uno schieramento multivalente; è quindi possibile che l'inoculazione di una frazione glicoproteica, sottoposta a trattamento di purificazione, nonostante l'aggiunta dell'adiuvante, sia insufficiente a stimolare tutti i meccanismi coinvolti nella difesa dell'ospite<sup>16</sup>.

I vaccini a subunità e ricombinanti, nonostante i deludenti risultati, hanno sicuramente contribuito alla comprensione di aspetti che precedentemente erano stati trascurati, tra i quali si ricordano: l'insufficiente immunogenicità della glicoproteina di superficie, la capacità di modificare rapidamente il disegno antigenico di membrana ed infine, il ruolo dell'immunità di tipo celluloso-mediata come uno dei meccanismi responsabili della protezione nei confronti dei *lentivirus*.

### Vaccini a DNA

È in corso di sperimentazione una nuova tecnica vaccinale che prevede l'inoculazione di DNA costituito dai geni che codificano per le sequenze aminoacidiche maggiormente immunogene. La caratteristica principale dei vaccini a

DNA è quella di indurre una forte risposta immunitaria sia di tipo cellulo-mediata che umorale, mentre l'innocuità viene garantita dalla delezione di quei geni che durante l'infezione naturale conferiscono proprietà patogene al virus.

Nuove osservazioni hanno sollecitato gran parte dei ricercatori ad attribuire un ruolo di notevole importanza all'immunità cellulo-mediata<sup>23</sup>; sembra infatti, che i CTL giochino un ruolo fondamentale nel controllo della malattia, per cui soprattutto per quanto riguarda HIV-1 sono state avviate sperimentazioni sia *in vitro* che *in vivo* al fine di valutare quali tra i geni strutturali e regolatori possiedono la capacità di indurre una forte risposta di tipo cellulo-mediata<sup>24</sup>. Inoltre, non essendo stato ancora possibile stabilire chiaramente la funzione ed il valore di entrambi i sistemi nella protezione verso i *lentivirus*, l'avvento di una tecnica immunizzante in grado di stimolare il completo *range* delle difese dell'ospite, è stata interpretata da molti, a prescindere dai meccanismi alla base, come risolutiva allo scopo di ottenere un vaccino efficace. La vaccinazione a DNA, data l'innocuità, può essere anche testata sull'uomo; infatti, le più recenti sperimentazioni si basano sulla somministrazione del vaccino in soggetti infetti *non progressor*<sup>25</sup>, lo scopo è quello di monitorare il titolo anticorpale ed i livelli di CTL rivolti verso le proteine codificate dai geni iniettati.

Le sperimentazioni finora condotte su FIV, si sono preposte di valutare le proprietà immunogene dei geni che codificano per la glicoproteina gp120 (SU) e per le proteine del nucleocapside (NC). Partendo dall'ipotesi secondo cui la risposta cellulo-mediata potrebbe essere responsabile

della protezione nei confronti dei *lentivirus*, Cuisinier *et al.*<sup>26</sup>, hanno inoculato in gatti SPF un vaccino a DNA costituito dai geni che codificano per le proteine NC. I risultati hanno mostrato che il vaccino in questione è inefficace a proteggere i gatti in seguito ad infezione sperimentale e ciò è probabilmente attribuibile sia alla scarsa immunogenicità delle proteine codificate dal genoma, sia alla scarsa capacità replicativa del vaccino stesso. Recentemente una migliore induzione di tipo cellulo-mediata è stata ottenuta attraverso l'integrazione del vaccino a DNA con i geni che codificano per l'interferone- $\gamma$ <sup>7</sup>.

## CONCLUSIONI

Esistono diversi ostacoli che limitano gli interventi immunizzanti ed uno dei maggiori è sicuramente rappresentato dall'abilità di FIV e di tutti i *lentivirus* di modificare rapidamente il proprio disegno antigenico. Nell'ambito di ciascuna specie virale esiste un numero relativamente modesto di sierotipi, ma durante il ciclo replicativo oltre alla produzione di particelle virali antigenicamente uguali, vengono prodotte numerose varianti. I nuovi antigeni non vengono riconosciuti immediatamente dalle cellule immunocompetenti specifiche per i precedenti disegni antigenici e questo meccanismo si protrae per tutta la vita del soggetto.

Secondo Eigen<sup>27</sup> una visione più ampia e dinamica delle popolazioni virali consentirebbe di comprendere a fondo la

natura e di mettere a punto nuove strategie di lotta contro virus resistenti come quelli responsabili di immunodeficienza. Secondo la teoria di Eigen la sostituzione della specie con il concetto di *quasispecie* offre la possibilità di chiarire meglio il comportamento di questo gruppo virale. Sotto il profilo biologico, la *quasispecie* è il vero bersaglio della selezione; tutti i suoi membri contribuiscono a perpetuare la popolazione virale. Si tratta di un gruppo che si automantiene, costituito da sequenze che si riproducono in modo imperfetto, ma che riescono a conservare nel tempo un'identità collettiva. Holterman *et al.*<sup>28</sup> hanno utilizzato il concetto della *quasispecie* per costruire un genoma virale costituito dai diversi geni mutati di una popolazione di SIV presente nel siero di una scimmia. Questo genoma potrà essere così utilizzato per lo sviluppo di vaccini a DNA. Un'altra proprietà dei *lentivirus* è data dall'integrazione nel genoma della cellula ospite permanendo in questa sede sotto forma di *provirus* al riparo dai meccanismi effettori del sistema immunitario per un lungo periodo di tempo. Infine, si ricorda l'altro grande ostacolo che tuttora rende difficoltoso ottenere un prodotto immunizzante efficace, rappresentato dalla mancanza di chiarezza sui meccanismi effettori dell'immunità che agiscono in seguito al contatto con il virus.

Il mezzo più comune per liberare un individuo infettato da un virus è stimolare, attivare o sostenere il suo sistema immunitario, come fa un vaccino. La consapevolezza della flessibilità dei *lentivirus* indica che si devono sperimentare altre strategie per migliorare i vaccini, quali:

- trovare nella *quasispecie* virale caratteri immunologici stabili, contro i quali dovrebbero essere diretti anticorpi monoclonali e linfociti citotossici altamente specifici;
- produrre una risposta immunitaria capace di agire contro un ampio spettro di mutanti, che altrimenti permetterebbe al virus di compiere un *escape* immunologico;
- individuare questi mutanti in una fase precoce dell'infezione e agire su di essi in modo da metterli fuori uso prima che possano dare origine ad una progenie;
- impedire l'integrazione del genoma virale in quello cellulare ed assicurare l'instaurarsi di una barriera immunologica a livello mucosale.

## Parole chiave

*Profilassi, vaccini, lentivirus, FIV.*

## Key words

*Prophylaxis, vaccines, lentivirus, FIV.*

## Bibliografia

- Gallo R.C. Il primo retrovirus umano. *Le Scienze*, 222: 22-33, 1987.
- Greatorex J., Lever A. Retroviral RNA dimer linkage. *J. Gen. Virol.*, 79: 2877-2882, 1998.
- Luciw P.A. Human Immunodeficiency Viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds). *Fundamental Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia (USA), 845-916, 1996.
- De Ronde A., Stam J.G., Boers P., Langedijk H., Meloen R., Hesselink W., Keldermans L.C.E.J., Vliet A., Verschoor E.J., Horzinek M.C., Egberink H.F. (1994): Antibody response in cats to the envelope proteins of feline immunodeficiency virus: identification of an immunodominant neutralization domain. *Virology*, 198: 257-264, 1994.
- Harper D.R. *Molecular virology*. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1994.
- Coffin J.M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation pathogenesis and therapy. *Science*, 267: 483-489, 1995.
- Flynn J.N., Hosie M.J., Rigby M.A., Makay N., Cannon C.A., Dunsford T., Neil J.C., Jarrett O. Factors influencing cellular immune response to feline immunodeficiency virus induced by DNA vaccination. *Vaccine*, 18: 1118-1132, 2000.
- Yamamoto J.K., Okuda T., Ackley C.D. Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. *AIDS Res. Human Retroviruses*, 7: 911-922, 1991.
- Yamamoto J.K., Hohdatsu T., Olmsted R.A., Pu R., Louie H., Zochlinsky H.A., Acevedo V., Johnson H.M., Soulds G.A., Gardner M.B. Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of FIV. *J. Virol.*, 67: 601-605, 1993.
- Hosie M.J., Osborne R., Yamamoto J.K., Neil J.C., Jarrett O. Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccine. *J. Virol.*, 69: 1253-1255, 1995.
- Hosie M.J., Osborne R., Reid G., Neil J.C., Jarrett O. Enhancement after feline immunodeficiency virus vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 35: 191-197, 1992.
- Matteucci D., Pistello P., Mazzetti P., Gianneccchini S., Del Mauro D., Zaccaro L., Bandecchi P., Tozzini F., Bendinelli M. Vaccination protects against in vivo-grown feline immunodeficiency virus even in the absence of detectable neutralizing antibodies. *J. Virol.*, 70: 617-622, 1996.
- Matteucci D., Pistello M., Mazzetti P., Gianneccchini S., Del Mauro D., Lonetti I., Zaccaro L., Pollera C., Specter S., Bendinelli M. Studies of AIDS vaccination using an ex vivo feline immunodeficiency virus model: protection conferred by a fixed-cell vaccine against cell-free and cell-associated challenge differs in duration and is not easily boosted. *J. Virol.*, 71: 8368-8376, 1997.
- Pistello M., Matteucci D., Cammarota G., Mazzetti P., Gianneccchini S., Del Mauro D., Macchi S., Bendinelli M., Zaccaro L. Kinetics of replication of a partially attenuated virus and of the challenge virus during a three-year intersubtype feline immunodeficiency virus superinfection experiment in cats. *J. Virol.*, 73: 1518-1527, 1999.
- Hulskotte E., Geretti A.M., Osterhaus A. D.M.E. Toward an HIV-1 vaccine: lessons from studies in macaque models. *Vaccine*, 16: 904-914, 1998.
- Hosie M.J., Dunsford T.H., De Ronde A., Willett B.J., Cannon C.A., Neil J.C., Jarrett O. Suppression of virus burden by immunization with FIV Env protein. *Vaccine*, 14: 405-411, 1996.
- Lombardi S., Garzelli C., Pistello M., Massi C., Matteucci D., Baldinotti F., Cammarota G., Da Prato L., Bandecchi P., Tozzini F., Bendinelli M. A neutralizing antibody-inducing peptide of the V3 domain of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein does not induce protective immunity. *J. Virol.*, 68: 8374-8379, 1994.
- Siebelink K.H.J., Tijhaar E., Huisman R.C., Huisman W., De Ronde A., Darby I.A., Francis M.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J. Virol.*, 69: 3704-3711, 1995.
- Huisman W., Karlas J.A., Siebelink K.H.J., Huisman R.C., De Ronde A., Francis M.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Feline Immunodeficiency Virus subunit vaccines that induce virus neutralising antibodies but no protection against challenge infection. *Vaccine*, 16: 181-187, 1998.
- Lombardi S., Garzelli C., La Rosa C., Zaccaro L., Specter S., Malvaldi G., Tozzini F., Esposito F., Bendinelli M. Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the Feline Immunodeficiency Virus envelope. *J. Virol.*, 67: 4742-4749, 1993.
- Baldinotti F., Matteucci D., Mazzetti P., Giannelli C., Bandecchi P., Tozzini F., Bendinelli M. Serum neutralization of Feline Immunodeficiency Virus is markedly dependent on passage history of the virus and host system. *J. Virol.*, 68: 4572-4579, 1994.
- Sullivan N., Sun Y., Li J., Hofmann, Sodroski W. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.*, 16: 181-187, 1995.
- Beatty J.A., Willett B.J., Gault E.A., Jarrett O. A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J. Virol.*, 70: 6199-6206, 1996.
- Vinner L., Nielsen H.V., Bryder K., Corbet S., Nielsen C., Fomsgaard A. Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine*, 17: 2166-2175, 1999.
- Calarota S., Bratt G., Norlund S., Hinkula J., Leandersson A-C., Sandstrom E. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *The Lancet*, 351: 1320-1325, 1998.
- Cuisiner A.M., Meyer A., Chatrenet B., Verdier A.S., Aubert A. Attempt to modify the immune response developed against FIV gp120 protein by preliminary FIV DNA injection. *Vaccine*, 17: 415-425, 1999.
- Eigen M. (1993): La quasispecie virale. *Le Scienze*, 301: 26-36.
- Holterman L., Dubbes R., Haaijman J., Heeny J. A strategy for cloning infectious molecular clones of retroviruses from serum or plasma. *J. Virol. Meth.*, 84: 37-48, 2000.