Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 525-534

LUIGI BONIZZI * – GIORGIO POLI **

Vaccini: dall'empirismo all'ingegneria genetica ***

Le origini dell'immunologia

Il concetto che un individuo, dopo aver superato una malattia, possa divenire resistente alla stessa sembra essere presente nella storia dell'uomo fin da quando sono state descritte le prime malattie epidemiche.

Nel V secolo a.C., lo storico greco Tucidide descrisse nella *Storia della guerra del Peloponneso* una epidemia che decimò la popolazione di Atene. L'accurata descrizione dei sintomi e della modalità di diffusione fa ritenere che si trattasse di una malattia virale, forse simile al vaiolo o alla varicella (nella forma più grave che può colpire l'adulto). Ma molto interessante è un particolare rilievo fatto da Tucidide: i malati venivano curati da persone che avevano già contratto e superato la malattia, in quanto nessuna di queste veniva colpita una seconda volta dal morbo.

Chiaramente, quindi, gli ateniesi, e verosimilmente altre antiche popolazioni, capirono che si poteva acquistare uno stato di resistenza specifica verso sostanze tossiche e agenti morbosi, dopo esposizione agli stessi. Molto tempo prima dell'epoca di Tucidide, gli antichi cinesi si proteggevano dal vaiolo facendo inalare ai bambini la polvere di croste di pazienti in fase di guarigione. Parimenti, Mitridate Eupatore, re del Ponto (111-63 a.C.), si era reso refrattario a certi veleni, assumendone, fin da ragazzo, dosi sempre crescenti. Che il trattamento fosse efficace lo dimostrò il fatto che quando lo stesso Mitridate tentò di suicidarsi con il veleno, non vi riuscì; di qui il termine «mitridatismo», che sta ad indicare la tolleranza acquisita con l'uso continuato e progressivo dei veleni. Similmente, certe tribù indiane e i cacciatori di vipere si premunivano contro i morsi dei serpenti con la volontaria introduzione dei veleni di questi animali.

* Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova.
** Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano.
*** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

Tuttavia, le prime esperienze scientifiche nel campo della vaccinologia sono conseguenti ai progressi della microbiologia: tra il 1875 e il 1895 viene scoperta la maggior parte dei microrganismi patogeni, responsabili delle principali malattie, e di conseguenza vengono evidenziati i fenomeni di resistenza, specificamente indotta negli animali dai microrganismi stessi.

È merito di Louis Pasteur l'avere interpretato il meccanismo della vaccinazione jenneriana: nel 1881 osservò infatti che l'agente del colera dei polli, se coltivato in laboratorio, invece che nell'ospite naturale, perdeva parte della sua virulenza (capacità di causare la malattia). Questo processo di riduzione della virulenza è detto attenuazione. Pasteur poi inoculò colture attenuate in polli sani e notò che non solo non morivano, ma addirittura divenivano resistenti alle successive infezioni con microrganismi virulenti.

La possibilità di rendere non patogeno un microrganismo, mantenendone nel contempo la capacità a conferire una protezione immunitaria, venne ulteriormente sfruttata da Pasteur per allestire altri vaccini: contro il carbonchio ematico, riducendo la virulenza dei bacilli facendoli crescere a 42°C invece che a 37°C; contro la rabbia, attenuando il virus mediante passaggi sierali in un ospite non recettivo, di specie diversa (Pasteur impiegò il coniglio).

L'immunologia diviene scienza

Si deve comunque attendere la metà del XX secolo perché le conoscenze su ruolo e funzioni del sistema immunitario siano tali da affrancare l'immunologia alla microbiologia. L'immunologia moderna è il risultato di un approccio multidisciplinare allo studio delle difese dell'organismo, che coinvolge l'immunologia cellulare e l'immunochimica. A questo risultato si è giunti grazie allo studio dei ricercatori che hanno stabilito alcuni concetti essenziali sulla risposta umorale e cellulare. Tutto ciò ha portato alla conoscenza dei meccanismi biologici mediante i quali in un soggetto può essere indotta la resistenza, o meglio, l'immunità nei confronti di un microrganismo patogeno, nasce quindi la moderna vaccinologia.

La vaccinazione prevede l'inoculazione, per via parenterale o per via orale, in un soggetto sano, di una preparazione antigenica, costituita dal *microrganismo* (es., virus, batterio o protozoo) verso cui si vuole proteggerlo, o da *frazioni glicoproteiche* del microrganismo stesso o da sue *tossine*. Il prodotto somministrato, denominato «*vaccino*», induce nell'ospite una reazione immunitaria specifica, di tipo prevalentemente umorale o cellulo-mediato (a seconda delle caratteristiche del vaccino e della via di somministrazione) che lo proteggerà, in futuro, dall'aggressione del patogeno verso cui è stato vaccinato.

Le tecniche convenzionali per la produzione di vaccini presentano molti inconvenienti, sia che si allestisca un vaccino vivo attenuato, oppure un vaccino spento, e precisamente: la possibile presenza di virus contaminanti nelle colture cellulari impiegate per coltivare il patogeno; il rischio di avere nel prodotto finale del

virus virulento residuo; la presenza nel vaccino di elevate quantità di acidi nucleici che possono poi causare eventi indesiderati nel soggetto sottoposto a vaccinazione; il pericolo legato alla produzione di elevate quantità di vaccini che prevedono la moltiplicazione di agenti a elevata patogenicità (es., virus della rabbia, della poliomielite, della febbre gialla, ecc.).

Tutti questi inconvenienti possono essere evitati facendo produrre ad un batterio la proteina virale o batterica che caratterizza il patogeno in questione.

Mediante le tecniche dell'ingegneria genetica sono stati prodotti diversi tipi di vaccini ricombinanti; la maggior parte di questi vaccini è stata allestita clonando in una cellula procariota o eucariota il gene del microrganismo che codifica per la principale proteina immunogena, cioè la proteina che induce nell'ospite la produzione di anticorpi protettivi in elevate quantità. Tali vaccini sono costituiti, pertanto, da specifiche sub-unità di una proteina del microrganismo patogeno (per questo definiti «vaccini a sub-unità»); nei vaccini virali si tratta in genere di una proteina del guscio proteico (capside) o della membrana limitante esterna (*envelope*), mentre nei vaccini batterici si tratta di proteine di adesione (es., antigeni delle fimbrie, F-1 …) o di specifiche tossine modificate (anatossine).

Dopo selezione del gene che codifica per la prescelta sub-unità proteica del microrganismo patogeno, il gene viene inserito in un idoneo vettore (clonaggio), per il suo successivo trasferimento ed espressione in un microrganismo, che produrrà in grande quantità la proteina immunogena che verrà purificata e utilizzata come vaccino. La produzione di questi tipi di prodotto nel batterio *Escherichia coli* non sempre dà origine a vaccini pienamente efficaci e questo perché i procarioti non sono in grado di realizzare quelle modificazioni *post-traduzionali* delle proteine (es., glicosilazione o altro) che avvengono invece nelle cellule eucariote; in effetti la glicosilazione è spesso indispensabile affinché le proteine siano immunologicamente attive, cioè siano il più possibile simili alle proteine native presenti, ad esempio, nel capside o nell'*envelope* dei virus, proteine che vengono glicosilate durante la replicazione del virus nelle cellule infette dell'ospite. Per questo motivo vengono spesso impiegate cellule eucariote (lieviti, cellule di insetti, cellule di mammifero) quali ospiti di espressione in modo da avere il corretto *pattern* di glicosilazione e altre modificazioni della proteina da usare quale vaccino.

Vaccino contro l'epatite B dell'uomo: il primo vaccino «ricombinante» autorizzato

L'epatite B è una malattia che rappresenta un grosso problema sanitario, non solo a motivo della sua diffusione e gravità ma anche perché nasconde una minaccia ancora più terribile: il virus che causa l'epatite B (HBV), oltre a causare la cirrosi epatica, è anche un agente cancerogeno (il cancro del fegato è secondo solo al cancro polmonare causato dal fumo). Nei Paesi più poveri, ove l'assistenza sanitaria è assente o scarsa, centinaia di milioni di persone sono portatrici croniche di questo virus e quindi hanno un rischio elevato di sviluppare un carcinoma epatico.

Inoltre, sebbene molti portatori cronici appaiano in buona salute, possono ugualmente trasmettere il virus dell'epatite B a coloro con cui vengono in stretto contatto attraverso sangue infetto o altre secrezioni organiche, quali liquido seminale, saliva, sudore, secrezioni vaginali e lacrime, perpetuando così il mantenimento dell'infezione nella popolazione umana: attualmente il numero dei portatori cronici è stimato oltre i 300 milioni.

Il virus HBV è un virus a DNA con *envelope*, il cui virione contiene due antigeni associati al guscio proteico interno (*core*) e definiti *Hbc* ed *Hbe* e un antigene di superficie (presente sull'*envelope*) e per questo denominato *HBsAg* (*Hepatitis B surface Antigen*). L'antigene di superficie, anche detto «antigene Australia» (Au), in quanto rinvenuto inizialmente in un aborigeno australiano, induce nel corso dell'infezione la formazione di anticorpi protettivi in quanto non solo costituisce il guscio esterno del virus maturo (virione), ma è anche libero nel sangue sotto forma di strutture sferiche e filamentose.

L'antigene di superficie (*HBsAg*) rappresenta quindi la molecola di scelta per allestire un vaccino e in effetti, prima dell'avvento della tecnologia del DNA ricombinante, l'unico tipo di vaccino disponibile era costituito da una sospensione di particelle di *HBsAg* (forme sferiche e filamentose) ottenute per ultracentrifugazione dal sangue di un portatore sano. Per evitare la trasmissione di eventuali agenti infettivi presenti nel plasma del donatore, la preparazione vaccinale viene sottoposta preventivamente ad inattivazione termica o chimica.

Applicando invece le tecniche dell'ingegneria genetica, il gene virale che codifica per l'*HBsAg* è stato clonato in un vettore e quindi trasferito ed espresso in un lievito, *Saccharomyces cerevisiae*. L'antigene prodotto da tale lievito (cellula eucariota) presenta tutte le caratteristiche della proteina *HBsAg* nativa (glicosilazione, più altre modificazioni *post-traduzionali*); tale antigene dopo una purificazione spinta, che prevede l'impiego di ultracentrifugazione, cromatografia e precipitazioni frazionate (purezza>98%), viene adsorbito su idrossido di alluminio, che funziona da adjuvante ed è quindi pronto ad essere impiegato come vaccino.

Le prove, prima condotte sull'animale da laboratorio poi sull'uomo, hanno dimostrato che si tratta di un vaccino del tutto sicuro e molto efficace e quindi applicabile su larga scala per la prevenzione, a livello di popolazione, di una malattia così grave e diffusa.

È comunque opportuno ricordare che oltre ai vaccini da sub-unità (produzione di una singola proteina immunogena in un microrganismo o in una cellula ospite ingegnerizzata) sono stati allestiti altri tipi di vaccini: l'esempio più interessante è rappresentato dal vaccino antipertosse, studiato e sviluppato in Italia presso la Società Sclavo di Siena da Rino Rappuoli. Più precisamente è stato ottenuto, mediante la tecnica del DNA ricombinante, un ceppo di *Bordetella pertussis* (il batterio responsabile della pertosse) capace di produrre una tossina della pertosse antigenicamente del tutto identica, a quella del ceppo patogeno, ma assolutamente priva di tossicità. La tossina mutata, prodotta in laboratorio dal batterio ricombinante, coltivato su larga scala, viene purificata e impiegata come vaccino.

VACCINI RICOMBINANTI PER GLI ANIMALI

Anche nel settore veterinario, numerosi ricercatori si stanno occupando attivamente della produzione di vaccini mediante la tecnica del DNA ricombinante.

VACCINI COSTITUITI DA PROTEINE IMMUNOGENE PRODOTTE IN LABORATORIO DA MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (GMO)

Come già detto, con la clonazione dei geni è possibile «commissionare» la produzione di proteine a batteri, fornendo loro l'adatto messaggio genetico; questa tecnica può essere agevolmente applicata anche alla produzione di vaccini, soprattutto virali.

Più precisamente, è possibile identificare la struttura antigenica più importante dell'agente infettivo, cioè quegli epitopi che evocano nell'ospite una risposta anticorpale di tipo protettivo. Si procede, quindi, all'identificazione del gene virale che codifica per tale antigene strutturale e lo si isola; in alternativa, è possibile analizzare la sequenza aminoacidica di tale antigene proteico e quindi sintetizzare il relativo RNAm e, successivamente, la rispettiva copia del gene (cDNA). Il gene, comunque ottenuto, viene inserito in un plasmide e quindi trasferito a un batterio che, durante la sua replicazione in laboratorio, produrrà grandi quantità del prodotto richiesto e cioè la proteina virale, antigenicamente più efficace, che verrà usata come vaccino. Le fasi del processo descritto si concludono con la purificazione del prodotto desiderato.

Il primo tentativo, coronato da successo, relativamente al clonaggio di un gene in un batterio per produrre un antigene virale, è stato condotto con il *virus dell'afta epizootica*. Si rammenta che questo stesso virus è stato anche il primo modello per produrre «vaccini sintetici» e pertanto erano già note le proteine del capside virale (VP1 = *viral protein* 1), che veicolano gli epitopi più importanti, cioè il bersaglio naturale degli anticorpi neutralizzanti. Più precisamente, il gene virale codificante per VP1, cioè l'RNA, è stato isolato e retrotrascritto (mediante la trascrittasi inversa) in una copia di DNA (cDNA, cioè DNA copia); questo è poi stato inserito in un plasmide ed introdotto in *Escherichia coli*. Il batterio, così programmato, è stato in grado di produrre elevate quantità della proteina virale VP1, che, dopo purificazione, è stata incorporata, con un idoneo adjuvante, in un vaccino.

Per quanto riguarda il vaccino contro la *rabbia*, sono allo studio degli analoghi della glicoproteina dell'*envelope* del virus, prodotti da *E. coli* ricombinante: la superficie esterna del virus della rabbia è costituita da una glicoproteina di circa 60.000 D di peso molecolare, che contiene i più importanti epitopi del virus. È stato già possibile costruire plasmidi, contenenti il gene che codifica per l'intera molecola glicoproteica che caratterizza, dal punto di vista immunogenico, il virus in oggetto.

I primi vaccini di interesse veterinario prodotti con le tecniche dell'ingegneria genetica e già commercializzati per gli animali da reddito sono quelli costituiti dal-

l'antigene adesivo F5 (ex-K99) e F4 (ex-K88) dei ceppi di *E. coli enterotossigeni* rispettivamente per il vitello e per il suino. In effetti, tali antigeni, che si identificano con i pili di superficie dei batteri patogeni e che consentono loro di aderire alla mucosa del piccolo intestino e causare la patologia, sono codificati da geni plasmidici; tali geni sono stati, perciò, facilmente trasferiti in ceppi batterici non virulenti, che sono diventati così produttori di antigene *in vitro*. Inoltre, tali ceppi possono essere somministrati agli animali neonati nei quali stimolano la risposta mucosale locale anti-F5 o -F4, senza però causare la manifestazione morbosa.

Altri vaccini allo studio riguardano la piroplasmosi e la diarrea neonatale da rotavirus per specie animali diverse (bovini, suini, ovini).

Il primo vaccino virale di interesse veterinario, già in commercio per gli animali da compagnia, è quello prodotto contro il *virus della leucemia felina* (FeLV). In questo caso, è stato clonato e inserito in *E. coli* il gene che codifica per la principale proteina dell'*envelope* virale, la gp70, che è responsabile dell'induzione della risposta anticorpale protettiva nel gatto. Alcuni ricercatori hanno invece preferito produrre solo una porzione della gp70, la gp50, eliminando cioè la componente p15, che pare avere, in esperimenti *in vitro*, un certo ruolo immunosoppressivo.

Uno dei sistemi biotecnologici più recenti, che si basa sempre sul processo ora descritto, sfrutta invece quale vettore un *baculovirus*. Questo virus, ospite esclusivo di invertebrati e insetti, dopo ingegnerizzazione con il gene che codifica la proteina vaccinale di interesse, viene coltivato su linee cellulari di cellule di insetto e consente di ottenere grandi quantità di proteina glicosilata. Il vantaggio maggiore è dovuto alla sicurezza del prodotto, sia per l'operatore della produzione, sia per il soggetto vaccinato, in quanto, come detto, il baculovirus è patogeno solo per gli insetti.

Vaccini costituiti da ceppi virali omologhi vivi, attenuati mediante ingegnerizzazione

L'innovazione tecnologica più significativa nell'allestimento dei vaccini è stata realizzata mediante tecniche di ingegneria genetica condotte, inizialmente, sul *Porcine Herpesvirus* (PHV-1), agente causale della *malattia di Aujeszky del suino*. Sono stati cioè allestiti dei ceppi virali con delezioni specifiche del genoma, così da rendere il ceppo sia avirulento (privo del gene della timidino-chinasi TK), sia privato di una proteina non essenziale (privo del gene della proteina strutturale: gE, precedentemente indicata come gI[1]), si ottiene così un «marker *immunologico negativo*» (*gE–*), rappresentato dall'assenza, nel ceppo vaccinale, di una proteina presente invece nei ceppi selvaggi. In questo modo *è possibile, mediante prove sierologiche*

[1] Recentemente è stata approvata la nuova nomenclatura per le proteine (e i relativi geni) degli herpesvirus. Più precisamente, la glicoproteina gI viene ora denominata gE; la gII diviene gB; la gIII è gC; la gp50 è gD; la gp63 è gI; la gX è gG; la gH rimane gH. Quindi, attualmente, i vaccini gI$^-$ per la malattia di Aujeszky devono essere chiamati gE$^-$.

specifiche, distinguere la risposta anticorpale dei suini vaccinati da quella dei soggetti infetti con un ceppo di campo.

La tecnica impiegata per differenziare gli animali vaccinati con un ceppo virale deleto (a *marker* immunologico negativo) è la cosiddetta «*ELISA competitive*». In questa metodica l'antigene che costituisce il *marker* negativo (gE) viene incubato con il siero in esame di un animale vaccinato e, dopo opportuna incubazione, viene aggiunto un anticorpo monoclonale, marcato enzimaticamente, anti-proteina deleta; dopo l'aggiunta del substrato cromogeno, si ha lo sviluppo della reazione colorimetrica.

In assenza di anticorpi anti-proteina deleta nel siero in esame, non si ha competizione, per cui la densità ottica, direttamente proporzionale all'intensità di colore, è relativa al solo anticorpo monoclonale specifico, e ha un valore del 100%: in questo caso si può ritenere che l'animale vaccinato non sia mai venuto a contatto con il virus selvaggio.

Se nel siero in esame sono presenti anticorpi anti-proteina deleta, questi competono con l'anticorpo monoclonale marcato e, conseguentemente, la densità ottica ha valori inferiori al 100%: si deve quindi dedurre che il soggetto si è infettato con un ceppo di campo.

Un approccio analogo è stato seguito per l'allestimento di un vaccino deleto per la protezione dei *bovini* nei confronti della *rinotracheite infettiva (IBR)*. Per tale finalità, è stato utilizzato il ceppo mutante A dell'herpesvirus bovino (BHV-1), deleto per il gene che codifica per la glicoproteina *marker* E (gpE^-). Tale ceppo si è dimostrato del tutto avirulento e incapace di dare latenza (cioè di integrarsi nel genoma dell'ospite a livello dei tessuti nervosi), rimanendo però altamente immunogeno. Questo vaccino rappresenta quindi un prodotto a *marker* immunologico negativo (gpE^-) e tale delezione può essere indotta in altri ceppi virali utilizzabili nelle campagne di eradicazione delle virosi del bovino.

Anche nel *pollo* e nel *tacchino* sono stati allestiti vaccini con *herpesvirus a* «*marker immunologici negativi*».

La preoccupazione maggiore nell'impiego di virus modificati geneticamente è rappresentata dalla possibilità che tali microrganismi possano ricombinarsi con i ceppi virulenti di campo o con altri virus vivi attenuati già presenti nell'animale sottoposto a vaccinazione. Tale preoccupazione è ovviamente giustificabile, soprattutto se si ricorda che i fenomeni di ricombinazione genetica rappresentano eventi naturali, che i microrganismi attuano per reintegrare informazioni genetiche andate perdute o per modificare le loro caratteristiche e adattarsi meglio all'ambiente in continua evoluzione.

Comunque, sebbene i fenomeni di ricombinazione non possano, teoricamente, venire esclusi, è pur vero che le sequele di una possibile ricombinazione sono ristrette a eventi in cui vengono usati contemporaneamente nello stesso animale due vaccini con delezioni complementari. Tale evento non dovrebbe però realizzarsi, in quanto non si devono usare nello stesso allevamento vaccini con delezioni

di geni complementari, coinvolti nella virulenza, per evitare appunto il problema sopra evidenziato; inoltre, in una popolazione di animali sottoposti a vaccinazione, la diffusione sia del virus selvaggio, sia del virus vaccinale, dovrebbe essere ridotta notevolmente e quindi anche le *chances* di ricombinazione tra i due ceppi sono effettivamente trascurabili.

Ammettendo pure tutte le coincidenze peggiori che possono portare alle ricombinazioni ritenute più nefaste, se si analizzano tutti i possibili eventi a seguito dell'impiego dei ceppi vaccinali attualmente disponibili, e cioè TK^-/gE^-, non ne risultano rischi degni di preoccupazione. In effetti, se un ceppo vaccinale diviene TK^-/gE^+, oppure i TK^+/gE^+, il suino vaccinato verrà considerato infetto e quindi eliminato; se il ceppo vaccinale diviene TK^+/gE^-, manterrà comunque una ridotta virulenza e in una popolazione vaccinata avrà poche *chances* di sopravvivenza (si rammenta che questo ceppo ha le caratteristiche del ceppo vaccinale convenzionale «Bartha»); se è invece il ceppo di campo ad acquisire il carattere gE^-, perde comunque parte della virulenza e la neuroinvasività, per cui avrà scarse *chances* di sopravvivenza e di trasmissione: avrà comunque, come nel caso precedente, le caratteristiche del ceppo vaccinale Bartha.

Non va infine dimenticato che eventuali eventi di ricombinazione genomica virale, che dovessero manifestarsi in una popolazione di suini sottoposti a vaccinazione con ceppi vivi deleti (a seguito di acquisizione, oppure di delezione di geni da parte o dei ceppi vaccinali o dei ceppi virulenti di campo), potranno essere rapidamente rilevati grazie alle moderne tecniche di biologia molecolare, quali la PCR (in tutte le sue molteplici varianti metodologiche), con conseguente possibilità di pronto intervento nel prevenire ogni conseguenza negativa.

Vaccini costituiti da ceppi virali eterologhi vivi, attenuati e ingegnerizzati per l'espressione di proteine immunogene di altri microrganismi patogeni

Questo sistema prevede di sfruttare un microrganismo vettore vivo, che può essere ingegnerizzato per fargli poi esprimere, una volta inoculato nel soggetto da vaccinare, proteine virali appartenenti a più patogeni diversi e quindi proteggerlo contemporaneamente verso più malattie infettive. Il virus più usato per questa finalità è il *Vaccinia virus* (un ceppo attenuato del virus del vaiolo). Più precisamente, si introduce nel suo genoma un particolare gene ottenuto dall'agente infettivo contro cui si vuole preparare il vaccino. Questo gene «estraneo», scelto in quanto contiene l'informazione essenziale per la sintesi di un antigene importante per l'immunità, viene ora espresso in un virus «ricombinante» del vaiolo.

In campo veterinario, Tilhaum Yilma ha messo a punto un *Vaccinia virus* ricombinante, che veicola i geni del *virus della peste bovina*: questo prodotto, vivo attenuato, ha il vantaggio di poter essere somministrato per scarificazione cutanea; inoltre, a motivo dell'elevata resistenza alla temperatura del *Vaccinia virus* vettore, può essere impiegato nelle aree tropicali, senza la necessità di mantenere la catena

del freddo (indispensabile per i vaccini vivi e non realizzabile nella realtà dei Paesi in via di sviluppo). Tale prodotto potrebbe quindi trovare una valida applicazione in una campagna vaccinale panafricana contro la peste bovina.

Un altro microrganismo vettore, da impiegare come vaccino per fare esprimere proteine di altri patogeni è rappresentato dal batterio *Escherichia coli*, che, opportunamente ingegnerizzato, potrà essere somministrato in forma vivente, *per via orale*, e quindi proteggere il soggetto vaccinato dalle *infezioni gastro-enteriche* in quanto, replicandosi, può esprimere sulla sua superficie esterna gli antigeni dei patogeni verso cui si vuole proteggere il soggetto. Pertanto il traguardo più ambìto per produrre vaccini polivalenti è quello di impiegare un solo vettore ingegnerizzato: appunto il *Vaccinia virus* che esprime proteine antigeniche protettive verso infezioni/infestazioni sia batteriche, sia virali, sia parassitarie.

Comunque, ogni malattia infettiva degli animali, per la quale sia stato identificato l'agente patogeno può essere presa in considerazione per la realizzazione di un vaccino ricombinante. Per la produzione industriale, naturalmente, intervengono altre considerazioni nella valutazione del prodotto, quali i costi di produzione (rispetto ai vaccini tradizionali) e l'estensione del mercato. Anche in quei vaccini economicamente poco interessanti, tuttavia, la sintesi di antigeni da parte dei batteri offre la possibilità di produrre contemporaneamente più vaccini in un unico batterio, riducendo corrispondentemente i costi di produzione.

Produzione di vaccini animali in vegetali transgenici

La più recente innovativa tecnica per la produzione di vaccini, soprattutto di interesse zootecnico-veterinario, è rappresentato dalla possibilità di generare piante transgeniche che esprimono a livello di semi o di altra struttura (es., foglie) le proteine immunizzanti di origine virale o batterica. Pertanto alimentando gli animali (es., polli) con tali preparati (mangimi o altro) si induce una protezione immunitaria soprattutto a livello delle mucose gastroenteriche e respiratorie, che rappresentano la principale via di ingresso dei patogeni più pericolosi per gli animali.

Alcuni successi sono già stati ottenuti da un gruppo di ricerca della Meristem (Israele) che ha prodotto e sperimentato con successo soia e patate transgeniche ricche in proteine immunizzanti per la vaccinazione, mediante il mangime, dei polli contro la malattia di Gumboro e dei bovini e suini contro l'afta epizootica. Lo stesso gruppo ha iniziato alcune sperimentazioni per produrre micro- e macroalghe transgeniche, ricche in proteine immunizzanti, per la vaccinazione dei pesci sia di acqua salata, sia di acqua dolce, nei confronti delle più diffuse malattie virali e batteriche.

Vaccini allestiti in vegetali transgenici per la protezione dei suini nei confronti delle patologie sostenute da *Salmonella* spp. e da *Escherichia coli*, sono allo studio da parte di ricercatori della Facoltà di Agraria di Piacenza e della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano.

Le biotecnologie innovative sembrano pertanto rappresentare le migliori pro-

messe per il futuro della vaccinologia e più precisamente, l'*ingegneria genetica* che, oltre a rappresentare la tecnica più affascinante, pare essere la più promettente per i mezzi che sta offrendo per risolvere alcuni dei problemi che assillano l'umanità e, in particolare, quelli relativi alla diagnosi, alla terapia e alla prevenzione delle malattie dell'uomo e degli animali, alla produzione di alimenti di origine vegetale e animale migliorati per produttività, qualità e salubrità, che promettono soluzioni anche per i Paesi più poveri o, ancora, al disinquinamento ambientale ad opera di microrganismi ingegnerizzati e allo sviluppo di nuove fonti energetiche.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1994): "Cellular and molecular immunology" 2nd ed. WB Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich, Inc. Philadelphia.

Bitte J.L., Murphy F.A. (1989): "Vaccine Bietechnology" Academic Press Inc. San Diego California.

Atti del Convegno Prospettive nell'applicazione delle biotecnologie in medicina: Vaccini: Manipolazione genica in vivo: Trapianto genico. Torino 30 Novembre - 1 Dicembre 1995 a cura di Landolfo S., Forni G., Rappuoli R., Silengo L.

Farina R., Scatozza F. (1995): "Trattato di Malattie infettive degli animali domestici" ed. UTET Torino.

Poli G., Cocilovo A. (1996): "Microbiologia e Immunologia Veterinaria" ed. UTET Torino.

Poli G. (2001): "Biotecnologie Conoscere per Scegliere" ed. UTET Periodici Torino.

Ross D.W. (1996): "Introduction to Molecular medicine" ed. Springer-Verlag, New York Inc.

Primrose S.B. (1991): "Molecular Biotechnology" ed. Blackwell Scientific Publications, London.