



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

*Laurea Honoris Causa*

***EMILIANA BROCCHI***

*LECTIO MAGISTRALIS*

**“Un percorso, attraverso l’Afta Epizootica, nelle biotecnologie  
veterinarie e nella cooperazione internazionale”**

*Aula Magna Campus Universitario Grugliasco  
11 FEBBRAIO 2020*

## **Un percorso, attraverso l'Afta Epizootica, nelle biotecnologie veterinarie e nella cooperazione internazionale**

Grazie, innanzitutto. L'onore di ricevere questo riconoscimento dall'Ateneo di Torino è così grande che ancora mi domando se questo sta davvero avvenendo a me, e soprattutto se sarò all'altezza del suo valore.

Non posso quindi iniziare un excursus attraverso i momenti salienti della mia attività all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia, senza prima ringraziare il Senato Accademico e gli esimi Professori che mi hanno presentato con parole di elogio,

- il Magnifico Rettore, Prof. Stefano Geuna,
- il Direttore del Dipartimento di Scienze veterinarie, Prof. Domenico Bergero,
- il promotore di questa Laurea, Prof. Sergio Rosati, col quale condivido l'entusiasmo per sempre nuove sfide nella ricerca di applicazioni diagnostiche innovative, sfruttando le molteplici e variegata potenzialità delle biotecnologie.

Ma ancora, prima di addentrarmi nella parte ufficiale e un po' più tecnica di questa *lectio (con la quale spero di trasmettere agli studenti l'entusiasmo e la passione per le loro future attività)*, desidero ringraziare anche tutti i presenti per la calorosa partecipazione; ci sono tra loro volti amici, colleghi di lunga data con i quali sono state costruite preziose collaborazioni nel riconoscimento reciproco delle rispettive professionalità e competenze, condividendo successi e talvolta sconfitte nella nostra attività di ricerca; desidero ringraziare i vari direttori che si sono susseguiti al governo dell'Istituto da cui provengo e che hanno creduto nelle iniziative e negli indirizzi di Ricerca e Sviluppo intrapresi, concedendomi la libertà di esprimermi nel lavoro; voglio in particolare manifestare la mia gratitudine al dott. De Simone, che è stato il mio mentore e che tanti di voi conoscono per la leadership e la lungimiranza che ha dimostrato durante tutta la sua carriera; non posso non ricordare in questa occasione un collega, amico e illustre virologo che ci ha lasciato troppo presto, Paolo Cordioli, col quale ho costruito un proficuo sodalizio lavorativo, ed infine è doveroso ringraziare tutta l'equipe del mio reparto in Istituto, i tecnici, i borsisti e le colleghe e strette collaboratrici Santina Grazioli e Giulia Pezzoni, che sono certa porteranno avanti in un continuo crescendo l'attività dopo il mio vicino pensionamento, perché è d'obbligo riconoscere che i risultati si raggiungono in team, ed è quindi anche grazie a tutti loro che ricevo oggi questo grande riconoscimento.

Ma prima di approdare alla veterinaria ho mosso i miei primi passi nell'ambito della medicina umana, presso l'istituto di microbiologia e virologia dell'Università di Parma, dove avevo frequentato i due anni di tirocinio pre-laurea per la preparazione della tesi, e dove ho continuato l'attività come volontaria o borsista per successivi tre anni durante la Scuola di Specializzazione. Era la fine degli anni 70, e io apprendevo e collaboravo allo sviluppo dei primi test ELISA, che cominciavano a comparire nella diagnostica umana.

Arrivando all'Istituto Zooprofilattico, alla fine del 1980, ho scoperto la vastità del mondo veterinario; ho vivido il ricordo di quanto, allora, mi aveva positivamente impressionato: apprendere come, nella medicina veterinaria, gli agenti eziologici delle malattie infettive sono quasi sempre specifici e quindi moltiplicati per le varie specie animali, mentre la medicina umana studia e tratta una singola specie sovrana. Questo non ci veniva insegnato nel corso di laurea in Biologia, né durante la scuola di specializzazione in microbiologia e virologia. Diversamente, le tecnologie di indagine e di diagnosi delle malattie infettive erano e sono del tutto sovrapponibili, anche se in ambito veterinario la disponibilità di diagnostici commerciali è arrivata con significativo ritardo rispetto all'ambito umano, evidentemente più appetibile per le Ditte specializzate. Ed è proprio dalla allora mancanza di diagnostici commerciali che è derivata l'iniziativa di intraprendere studi per lo sviluppo di test e reagenti auto-prodotti, ma sempre più affinati e tecnologici, come approfondirò più avanti.

Ricordando ancora il mio approdo nel mondo veterinario, altre differenze che mi avevano colpito rispetto all'ambito umano erano il diverso approccio terapeutico e di controllo delle malattie infettive (ovviamente lo *stamping out* non è contemplato nella medicina umana, che persegue la cura del singolo individuo rispetto a quella dell'allevamento), e ancora, la possibilità di sperimentazione in vivo, che oggi è giustamente soggetta a regole etiche più rigorose di allora, ma che apre all'ambito veterinario potenzialità di studio molto più vaste di quanto sia possibile intraprendere in campo umano.

Oggi, i due mondi, veterinario e umano, sono più avvicinati, per lo meno nel settore delle malattie infettive, dall'approccio "*one health*".

Venendo ora alla parte più formale della lectio, ho scelto come filo conduttore una malattia che mi ha accompagnato in tutti gli anni della mia attività, quasi quarantennale, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia, l'Afta Epizootica, una delle malattie più temute nel mondo veterinario. Dell'Afta ho vissuto tutte le fasi epidemiologiche e di controllo, che dagli anni 80 ad oggi si sono susseguite in Italia e nella Unione Europea, per

arrivare alla sua completa eradicazione: passando da uno stato endemico persistente durante gli anni '80, con ondate epidemiche importanti nel nostro paese causate dall'alternarsi di virus appartenenti a tre diversi sierotipi (O, A, C), sino alla conquista dell'eradicazione raggiunta nel 1990, attraverso l'implementazione di rigorose misure restrittive per prevenire la diffusione dell'infezione e di campagne massive di vaccinazione obbligatoria (quasi tutti i veterinari più anziani hanno iniziato l'attività e ottenuto i primi guadagni con la vaccinazione contro l'afta); vaccinazione che è stata definitivamente abolita in tutta la UE a far data dal 1991, data storica per una Europa riconosciuta "*FMD-free without vaccination*" dall'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale.

Quando ho iniziato l'attività all'Istituto di Brescia, per i primi due anni come borsista poi come dipendente biologo, sono stata affiancata al dr. De Simone che gestiva il laboratorio nazionale di riferimento per lo studio dei virus aftosi, un laboratorio già dotato di attrezzature, metodi e tecnologie all'avanguardia per quei tempi, anche per la coltura, caratterizzazione, purificazione di virus e purificazione di immunoglobuline, condizioni che hanno permesso, con il piccolo bagaglio di esperienza che a mia volta portavo, di sviluppare e applicare le tecniche immunoenzimatiche (meglio note come test ELISA) che cominciarono ad affacciarsi anche al panorama veterinario, e soprattutto, di approntare il sistema di produzione degli anticorpi monoclonali (AcM). Risalgono al 1982 i primi AcM generati in Istituto, ed erano proprio specifici per i virus dell'afta dei tre sierotipi presenti in Europa e utilizzati per la produzione dei vaccini; i rispettivi ibridomi, cioè quelle cellule immortalizzate con metodi biotecnologici, e rese capaci di produrre in vitro gli AcM illimitatamente nel tempo e nelle quantità, sono tuttora conservati in azoto e ricoltivati ogniqualvolta è necessario produrre nuovi batch dell'Ac secreto.

Gli AcM si rivelarono da subito ai nostri occhi uno strumento nuovo, strategico e impareggiabile in confronto ai sieri immuni; utili per lo studio della struttura e della variabilità antigenica dei virus dell'afta, utili in molti altri ambiti di ricerca, oltre a rappresentare reagenti diagnostici innovativi, standardizzati e riproducibili, ideali per l'utilizzo in molteplici tecniche diagnostiche. Con AcM opportunamente selezionati abbiamo sviluppato test ELISA per la diagnosi rapida di afta direttamente da campioni sospetti; questi nuovi test mostravano performance di sensibilità più elevate della Fissazione del Complemento sino ad allora utilizzata, e ci permettevano in particolare di definire il profilo

antigenico dettagliato per ogni singolo ceppo responsabile di focolaio, e quindi di monitorare la variabilità antigenica o l'emergere di nuove varianti.

Infatti, l'afta non è una singola malattia, perché i virus responsabili sono presenti con sette diversi sierotipi e molteplici varianti antigeniche e genetiche in continua evoluzione; l'infezione con un sierotipo non protegge nei confronti degli altri sierotipi. Questo rende complesso non solo il controllo della malattia, ma anche il pattern di reagenti e relativi test necessari per la diagnosi.

I benefici degli AcM venivano sfruttati anche nella diagnosi differenziale tra afta e un'altra infezione vescicolare presente in Italia, la Malattia Vescicolare del Suino (MVS), sostenuta da un virus appartenente alla stessa famiglia ma diverso dai virus aftosi; anche per questo virus gli AcM selezionati a scopo diagnostico permettevano l'immediata identificazione della variante coinvolta, contribuendo così alla ricostruzione epidemiologica dei focolai.

Lo sfruttamento degli AcM era stato esteso anche allo sviluppo di metodi ELISA sierologici, per la ricerca di anticorpi, mettendo così a disposizione test standardizzati, rapidi e privi di rischio grazie all'utilizzo di antigeni inattivati, che, distribuiti alla rete dei 10 Istituti Zooprofilattici permettevano una capillare sorveglianza e nel caso dell'Afta il monitoraggio dell'immunità indotta dalle vaccinazioni.

.

Mentre con grande entusiasmo e carica scoprivamo pian piano le enormi potenzialità degli AcM, mi rendevo conto che limitarne l'applicazione e i relativi vantaggi all'afta e alla MVS, appannaggio di pochi laboratori in Europa e del solo Centro Nazionale di Referenza in Italia, non avrebbe permesso ad altri ricercatori e colleghi di conoscerne i pregi e sfruttarne i vantaggi. Per questo, in collaborazione con alcuni colleghi dell'istituto, tra cui voglio menzionare Lorenzo Capucci, abbiamo iniziato ad estendere la produzione di AcM verso altri agenti virali o antigeni di interesse veterinario, arrivando a disporre già alla fine degli anni '80 di una vasta collezione di AcM caratterizzati, specifici per le classi IgG, IgM e IgA delle immunoglobuline bovine e suine e per alcuni virus, quali il Virus Respiratorio Sinciziale, l'Herpesvirus bovino tipo 1, i Pestivirus, il virus della Malattia di Aujeszky. E di conseguenza, con la disponibilità di questi reagenti biotecnologici, si andava via via estendendo il ventaglio di test diagnostici innovativi a disposizione dei vari laboratori dell'Istituto, e con esso le collaborazioni anche a livello internazionale.

Questa attività è andata man mano crescendo negli anni successivi, anche grazie alla fervida collaborazione con l'entusiasta Paolo Cordioli, sempre pronto a spingere su nuove proposte, cogliere nuove sfide, spesso precorrendo le necessità e gli eventi che si sarebbero verificati nel futuro. Per riportare solo un paio di esempi, tra le iniziative mosse da Paolo, cito lo sviluppo di AcM e relativi test diagnostici per molteplici virus influenzali, arrivando a coprire quasi tutto lo spettro dei diversi sierotipi virali, con Ac specifici per ciascuna delle nove Neuraminidasi e per svariate Emoagglutinine. Oppure, la pronta produzione di AcM e di un test sierologico competitivo, adattabile a qualunque specie, per il virus Chickungunya già all'albore della sua prima comparsa in Italia nel 2007.

Non voglio tediare con una elencazione di prodotti biotecnologici ottenuti anno dopo anno, ma solo sostenere che siamo così arrivati a costruire la collezione di AcM di interesse veterinario più vasta a livello globale. *Collezione che comprende:*

- *AcM specifici per oltre 50 diversi virus specifici per oltre 50 diversi virus di varie specie animali, che diventano più di 100 se consideriamo anche sierotipi e varianti,*
- *AcM verso immunoglobuline di tutte le principali specie di interesse zootecnico,*
- *AcM verso proteine ricombinanti, un esempio per tutti: la proteina prionica*
- *AcM verso vari Micoplasmi e alcuni batteri;*

Gli AcM sono stati l'elemento più caratterizzante della mia attività, ma bisogna ricordare che componenti altrettanto importanti dei test diagnostici sono gli antigeni, e la sorgente di antigeni è tradizionalmente rappresentata dagli stessi patogeni coltivati e amplificati in vitro. Gli antigeni ricombinanti possono essere un valido sostituto in varie applicazioni, sia diagnostiche che di ricerca: si tratta di proteine o complessi proteici espressi attraverso le varieguate tecnologie dell'ingegneria genetica, che possono anche arrivare a mimare la struttura di un virus semplice riproducendone la conformazione antigenica. Non potevamo non perseguire anche questa strada, perciò già prima del nuovo millennio parte del laboratorio ha iniziato a cimentarsi con queste tecnologie. Ed è grazie alla presenza di giovani ricercatori, succedutisi con contratti o borse di studio, e alle competenze della collega Giulia Pezzoni che oggi disponiamo di svariati antigeni ricombinanti, valide alternative per studiare agenti patogeni non coltivabili, come il virus dell'Epatite E o della Malattia Emorragica Virale del Coniglio, o difficili da riprodurre come il poxvirus della Lumpy Skin Disease, per citare un paio di esempi; tra l'altro, per un felice connubio, gli antigeni ricombinanti si

sposano bene con gli AcM nella messa a punto di test diagnostici costruiti con reagenti completamente biotecnologici, che assicurano migliori performance di standardizzazione e omogeneità. A questo proposito, voglio cogliere l'occasione per estendere il mio plauso al team di ricerca guidato dal Prof. Rosati, che proprio nel vostro ateneo spicca per risultati e valenza scientifica nel settore delle proteine ricombinanti.

Ma ritornando all'afta epizootica, filo conduttore della lectio, ci sono alcune altre milestone da ricordare, che hanno inciso nei cambiamenti e in questo viaggio attraverso le varie fasi della malattia.

Una riguarda la mia prima partecipazione ad un progetto europeo, nel lontano 1993, progetto che ha visto muovere i primi passi nello sviluppo di test DIVA per l'afta, cioè metodi sierologici che permettono la distinzione tra animali vaccinati e animali infetti. Il riconoscimento della validità di questi test da parte dei noti esperti della malattia, ma anche a livello politico, non ha avuto un percorso facile, essendosi scontrato con una iniziale diffidenza e difficoltà a recepire il nuovo, ma alla fine le evidenze scientifiche hanno avuto la meglio. Ora i test DIVA per l'Afta sono largamente utilizzati e la possibilità di differenziare vaccinati da infetti ha permesso di reintrodurre la vaccinazione tra le strategie di controllo più etiche e sostenibili, nel malaugurato caso di incursione della malattia nei nostri paesi indenni.

A questo primo progetto europeo ne sono seguiti altri sulle malattie vescicolari e non solo, a cui ho avuto l'opportunità di partecipare, venendo a contatto con strutture di ricerca e colleghi in ambito europeo ed extra-Europeo, in un ambiente vivace e fervido di iniziative, che favoriva l'apertura verso nuovi fronti.

Tutto ciò, unitamente al fatto che l'acquisito stato di Europa indenne da afta aveva ridotto l'attività diagnostica, ci ha indirizzati verso altre attività, quelle della Cooperazione Internazionale.

Abbiamo così intensificato la collaborazione con FAO e con EUFMD (Commissione Europea per il controllo dell'afta) supportandone i programmi e le iniziative a favore dei paesi con infezione endemica. Abbiamo fornito il nostro contributo con conferme diagnostiche di sospetti focolai e con indagini filogenetiche per tracciare l'origine dei focolai e l'evoluzione dei virus, ma anche ai programmi di *post vaccination monitoring*, per definire i livelli di immunità nelle popolazioni vaccinate, ai piani di sierosorveglianza per valutare la

diffusione dell'infezione, negli studi di campo per valutare l'efficacia dei vaccini selezionati e predire il grado di cross-protezione verso ceppi eterologhi circolanti.

Hanno beneficiato di queste attività di cooperazione i paesi del Transcaucaso, di tutto il nord Africa, alcuni paesi dell'Africa orientale e dell'Asia centrale. Numerosi sono stati anche i training, organizzati presso il nostro laboratorio, per trasferire ai colleghi di paesi terzi le conoscenze per l'implementazione delle metodiche diagnostiche per l'afta e per l'interpretazione dei risultati.

Ed è anche grazie a queste attività che il laboratorio ha ottenuto il riconoscimento di Centro di Riferenza internazionale, FAO e OIE, per Afta e MVS.

Tuttavia, cooperazione non è solo sostituirsi ai paesi nell'implementazione di attività di controllo e monitoraggio, ma è soprattutto *capacity building*, cioè mettere i paesi meno sviluppati nelle condizioni di migliorare le proprie capacità. Aiutare i paesi endemici nel controllo dell'afta significa ridurre i rischi di introduzione nei nostri paesi indenni. Ed è da qui che è nata una nuova iniziativa, cioè la produzione di kit diagnostici pronto-uso, stabili e semplificati, derivati dai vari test che nel corso degli anni il laboratorio aveva sviluppato. Ci siamo cimentati in questa nuova avventura iniziando intorno al 2005, ed ora disponiamo di un portfolio di diversi kit diagnostici ELISA, alcuni dei quali ancora esclusivi nel panorama globale, per i sei sierotipi più diffusi dell'Afta. La richiesta di tali dispositivi diagnostici semplificati è andata via via aumentando nel corso degli ultimi 3-4 anni, anche grazie alla motivazione del team di laboratorio e alla tenacia della collega Santina Grazioli nella gestione dell'attività; con questi kit ELISA siamo presenti in oltre 50 Paesi nel mondo, ed alcuni, soprattutto africani, hanno potuto eseguire conferme diagnostiche in modo autonomo per la prima volta. Ciò favorisce spontaneamente l'instaurarsi di collaborazioni tra paesi endemici e laboratori di referenza, attraverso le quali i Paesi terzi sono incentivati ad inviare ai laboratori di referenza i campioni positivi per i successivi approfondimenti e le caratterizzazioni antigenico-molecolari dei virus circolanti, studi che permettono di mantenere aggiornata la conoscenza sui movimenti e sull'evoluzione dei virus aftosi e di individuare i ceppi vaccinali con le migliori aspettative di performance.

Sulla scia della produzione di kit ELISA pronto-uso per l'afta epizootica, ci siamo naturalmente impegnati anche nella trasformazione in kit stabilizzati all-inclusive di altri test ELISA in-house per la ricerca di anticorpi verso vari patogeni animali (Pestivirus, Leucosi Bovina Enzoistica, Rinotracheite Infettiva Bovina, Malattia di Aujeszky, Anemia Infettiva



Equina, Epatite E, ecc), kit che sono regolarmente distribuiti alla rete dei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia-Romagna, rendendo così l'istituto autonomo nell'approvvigionamento.

E per finire vorrei ritornare ancora una volta all'Afta, per citare una collaborazione in corso proprio con il Prof. Rosati del Dipartimento di Scienze Veterinarie e con la Prof. Anfossi del Dipartimento di Chimica del vostro prestigioso ateneo, per lo sviluppo di un test pen-side multiplex, estremamente robusto e facile da poter essere utilizzato direttamente in allevamento, per la diagnosi di Afta con simultanea identificazione del sierotipo. Questo test rapido sfrutta le potenzialità degli stessi AcM già sperimentati per il kit ELISA, e siamo ansiosi di vedere i risultati della sperimentazione in campo, prossimamente in Africa, del primo prototipo.

Riassumendo dunque, la mia lunga attività presso l'IZSLER non è stata solo Ricerca, ma si è sviluppata anche nei settori della diagnostica delle malattie vescicolari, con picchi di attività connessi alle ondate epidemiche di afta e MVS (di entrambe le quali ho vissuto il raggiungimento dell'eradicazione) e della produzione di kit diagnostici. Sono stata fortunata, perché ho avuto l'opportunità e la soddisfazione di vedere applicati i frutti della Ricerca.

Concludo la mia Lectio con un monito, diretto soprattutto ai giovani, agli studenti che desiderano intraprendere la strada della Ricerca, in qualunque ambito si vogliano cimentare: credeteci e non demordete. La Ricerca è alimentata da passione, iniziativa, motivazione; la Ricerca comporta talvolta l'assunzione di rischi, non sempre il successo è assicurato; Ricerca è anche democrazia, è libertà di espressione e non deve subire eccessivi condizionamenti. Ma la ricerca comporta anche sacrifici, determinazione, costanza, qualche rinuncia; e deve produrre risultati, risultati che possono non essere immediatamente tangibili, come nel caso nella ricerca di base, ma che devono però essere riconosciuti dalla comunità scientifica come risultati affidabili e validi. Siate mossi da una sana ambizione, ma non rincorrete facili successi individuali, non si può essere tuttologi soprattutto in un'epoca come la nostra dominata da tecnologie sempre più avanzate e specifiche, cercate invece di costruire fattive collaborazioni riconoscendo e mettendo a frutto le sinergie che derivano dal rispetto delle reciproche competenze in un team interprofessionale, perché l'unione fa la forza.

Emiliana Brocchi, Torino 11 febbraio 2020