



---

## **Presenza di retrovirus endogeni (ERV) in alcune tipologie di latte bovino destinato al consumo umano - Endogenous retrovirus (ERVs) presence in certain types of bovine milk for human consumption.**

Torresi C., Bazzucchi M., Casciari C., Rossi E., Feliziani F.

---

**Abstract.** Most retroviruses infect somatic cells, but some others can also infect germline cells and once have been transmitted to the next generation, they are termed endogenous. The risk of zoonotic infection by animal endogenous retroviruses was suspected in the context of pig-to-human xeno-transplantation. Although there is no evidences of ERV horizontal transmission, recombination phenomenon between exogenous and endogenous retroviruses were demonstrated. If ERV cross the species barrier and adapt to new human hosts the risk will be not only to the first infected people, but also to the general public. To better investigate the potential zoonotic risk of these viruses, this study investigated the presence of ERV in samples of bovine milk produced for human consumption.

**Riassunto.** La maggior parte dei retrovirus infettano le cellule somatiche, ma alcuni di essi possono anche infettare le cellule germinali e, una volta che siano trasmessi alla generazione successiva, si possono definire endogeni. Il rischio di infezioni zoonotiche da retrovirus endogeni di animali animali è stata sospettata nel contesto degli xeno trapianti da suino a uomo. Sebbene non vi siano evidenze di una trasmissione orizzontale di ERV, è stato dimostrato il fenomeno della ricombinazione tra retrovirus esogeni ed endogeni. Se gli ERV sono in grado di attraversare la barriera di specie e adattarsi ai nuovi ospiti umani, il rischio non è circoscritto alle singole persone infette, ma anche alla popolazione nel suo insieme. Per meglio studiare il potenziale rischio zoonotico di questi virus, il presente studio ha valutato la presenza di ERV in campioni di latte bovino prodotto per il consumo umano.

---

### **Introduzione**

I virus appartenenti alla famiglia Retroviridae sono caratterizzati da un patrimonio genetico a RNA; fondamentale per la replicazione di questi virus è la sintesi di un enzima (trascrittasi inversa) che è in grado di retrotrascrivere il genoma del virus da RNA a DNA sfruttando l'ambiente cellulare ospite. I retrovirus esogeni (di cui ricordiamo l'HIV e l'HTLV nell'uomo e il BLV e gli SRLV negli animali) sono stati molto studiati mentre molto meno si conosce dei retrovirus endogeni: questi sono presenti in forma integrata nel DNA ospite anche nelle cellule della linea germinale: ciò rende possibile la trasmissione verticale di queste infezioni. Il loro ruolo non è attualmente ben definito e, forse prematuramente, sono stati considerati innocui; alcuni studi più recenti, hanno messo in relazione questi agenti con alcune patologie, mentre altri ricercatori ne sottolineano le azioni positive. Non potendo escludere la possibilità di ricombinazione con altri retrovirus esogeni, molti ricercatori ritengono elevato la probabilità che questi virus possano modificarsi ed adattarsi a specie diverse con eventuali rischi di ordine sanitario. L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare la presenza di retrovirus endogeni nel latte bovino destinato al consumo umano.

### **Materiali e metodi**

Al fine di monitorare la presenza di retrovirus endogeni nel genoma bovino (bovine endogenous retrovirus, BERV) mediante PCR diretta, sono stati collezionati diversi campioni biologici, in particolare varie tipologie di latte commerciale (UHT, pastorizzato, fermentato, fresco e crudo); sono inoltre stati raccolti campioni di latte di massa e di sangue intero in aziende residenti in Umbria. Allo scopo di ottimizzare il protocollo per il recupero delle cellule somatiche e l'estrazione del DNA genomico, i campioni di latte sono stati aliquotati in provette da 50 ml le quali sono state sottoposte ad agitazione lenta per inversione ed incubate per 15 minuti a 37° C nel bagnetto termostato. Dopo aver centrifugato le provette per 20 minuti a 3000 g a temperatura ambiente (15-25°C), la parte lipidica è stata aspirata, il sovrinatante recuperato per il successivo saggio

dell'attività retrotrascrittasi ed il pellet cellulare sospeso nuovamente e trasferito in una nuova provetta sterile. Le cellule somatiche sedimentate sono state lavate due volte con 7 ml di PBS e successivamente sospese in 1 ml di PBS per ridurre la densità e permettere la conta delle cellule. Il volume della sospensione cellulare contenente il numero di cellule somatiche desiderato (max  $5 \times 10^6$ ) è stato trasferito in una nuova provetta e centrifugato ad alta velocità. Dopo aver eliminato il sovrantante, il pellet di cellule somatiche raccolto è stato sottoposto ad estrazione. Per evidenziare l'espressione di retrovirus endogeni sono stati testati diversi metodi di estrazione dell'RNA totale scegliendo, alla fine, il kit RNeasy mini Kit QIAGEN. La qualità e la quantità dell'RNA totale estratto sono state successivamente valutate allo spettrofotometro mediante il rapporto dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e 280 nm. Per accertare la presenza di sequenze integrate di retrovirus nel genoma bovino è stata impiegata una reazione di PCR convenzionale con primer specifici desunti dalla letteratura (Fig. 1) e diretti in una regione conservata della polimerasi retrovirale. Per verificare l'amplificabilità del DNA sono stati utilizzati primer specifici per il gene housekeeping GAPDH bovino disegnati sul DNA genomico.

Primer	Sequenza	Lunghezza dell'amplificato
$\beta$ 3 forward	5'-ACTGAAGAATGGCCCCCTTG-3'	221 bp
$\beta$ 3 reverse	5'-CTGTGGCTTTCGTTTGTTC-3'	
$\gamma$ 4 forward	5'-CTCCTCCCAAACCTGTACCA-3'	759 bp
$\gamma$ 4 reverse	5'-AATACTGTCCAAGTCATCTG-3'	
$\gamma$ 7 forward	5'-TGACTTCTCTGTTCTTCCTT-3'	762 bp
$\gamma$ 7 reverse	5'-TGTTCCAGGTCCCACT-3'	
GAPDH forward	5'-ATGGTAGGAGTGGTGGGAAACT-3'	483 bp
GADPH reverse	5'-CAGGTCAGATCCACAACAGACA-3'	
$\gamma$ 9 forward	5'-GGTGGGACAACAACCTACT-3'	700 bp
$\gamma$ 9 reverse	5'-CAGGAGCCAACATCCATACC-3'	

Figura 1: sequenze nucleotidiche dei primer impiegati in PCR convenzionale per l'amplificazione del genoma provirale e del gene housekeeping GAPDH

I prodotti di amplificazione sono stati infine analizzati per elettroforesi in un gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro (0,5  $\mu$ g/ml). I campioni risultati positivi anche ad uno solo dei target molecolari, sono stati successivamente utilizzati per uno studio di genotipizzazione. La banda specifica è stata ritagliata, purificata tramite QIAquick Gel Extraction Kit e quantificata su gel di agarosio al 2%. Il DNA così ottenuto si è utilizzato per allestire la reazione di sequenza su sequenziatore ABI Prism 3130 (Applied Biosystem) utilizzando il Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem), secondo un protocollo standard di amplificazione. Le sequenze ottenute da 3 repliche dello stesso campione sono state assemblate mediante il software SeqManII del pacchetto DNASTAR (DNASTAR Inc., USA). Per l'allineamento si è utilizzando il programma ClustalW versione 1.83 e le sequenze sono state confrontate con quelle dei ceppi di riferimento presenti in GeneBank. I risultati ottenuti hanno suscitato la necessità di valutare anche l'espressione di tali Retrovirus per mezzo della purificazione dell' RNA totale. Ottenuta una quantità di RNA compatibile con quella richiesta dal protocollo, la fase successiva ha previsto il trattamento dell'acido nucleico con DnaseI dopo aver saggiato diverse combinazioni di unità dell'enzima, temperatura e durata di reazione. A questo punto, l'RNA è stato retrotrascritto seguendo il protocollo del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). A verifica dell'efficienza della DNaseI si sono condotte due retrotrascrizioni in parallelo per ciascun campione: in una delle due repliche non è stato impiegato l'enzima retrotrascrittasi (replica del campione definita in seguito -RT). Infine, il cDNA è stato trattato con l'enzima RNaseH il quale degrada il filamento di RNA in ibridi RNA-DNA per produrre cDNA a singolo filamento. Il protocollo di amplificazione da utilizzare è lo stesso descritto precedentemente nel protocollo del DNA ad eccezione dei primers della GADPH che sono:

forward 5' GAAGCTCGTCATCAATGGAAAG 3'  
reverse 5' CAGTGGTCATAAGTCCCTCCAC 3'

Un'ulteriore indagine è stata condotta attraverso il Kit HS-Mn RT Activity (Cavidi, Uppsala, Sweden) per saggiare l'eventuale attività enzimatica retrotrascrittasi presente nel sovrinatante del latte mediante. Tale test prevede l'impiego di una piastra a fondo piatto su cui sono adsorbiti RNA con poly(A). La mix di reazione contiene primer e un nucleotide, BrdUTP: l'enzima eventualmente presente nel campione viene quindi sfruttato per sintetizzare il DNA complementare. Tramite una fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo alfa-BrdU specifico per il doppio filamento RNA/DNA si mette in evidenza l'avvenuta sintesi per mezzo di una reazione colorimetrica.

### Risultati e discussione

Il protocollo sperimentale adottato per il recupero delle cellule somatiche da campioni individuali di latte bovino (di massa e commerciale) e da buffy coat, seguito dall'estrazione del DNA genomico con il QIAamp DNA minikit, con opportune modificazioni per l'adattamento alla matrice latte, ha dato esito favorevole.

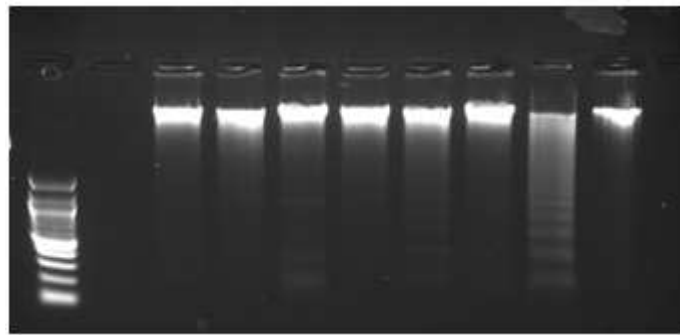


Figura 2. DNA genomico estratto da cellule somatiche del latte

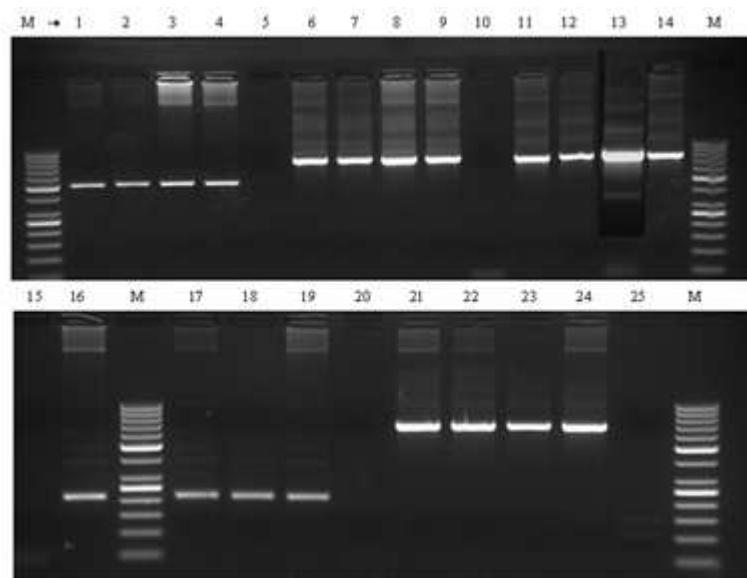


Figura 3. PCR su DNA genomico Gel elettroforetico dei prodotti di PCR di DNA genomico. Da 1 a 4: gene GAPDH (1: l. di massa, 2: l. UHT, 3: l. crudo, 4: buffy coats, 5: bianco); da 6 a 10: gene  $\gamma_4$  (6: l. di massa, 7: l. UHT, 8: l. crudo, 9: buffy coats, 10: bianco); da 11 a 15: gene  $\gamma_7$  (11: l. di massa, 12: l. UHT, 13: l. crudo, 14: buffy coats, 15: bianco); da

16 a 20: gene  $\beta 3$  (16: l. di massa, 17: l. UHT, 18: l. crudo, 19: buffy coats, 20: bianco); da 21 a 25: gene  $\gamma 9$  (21: l. di massa, 22: l. UHT, 23: l. crudo, 24: buffy coats, 25: bianco). M: marcatore di p. molecolare 50 bp generuler.

La PCR condotta con i primer specifici di è rivelata in grado di evidenziare la presenza di retrovirus endogeni sia nei campioni di latte bovino di massa che commerciale nonché nei leucociti costituenti i buffy coats (Fig. 3). I risultati ottenuti hanno aperto la strada per ulteriori indagini volte sia ad evidenziare l'espressione dei retrovirus endogeni nella matrice latte e nei PBMC, sia a saggiare l'eventuale presenza dell'attività enzimatica retrotrascrittasi.

Nel latte di massa non sempre la presenza di quest'ultima è associata alla presenza di amplificati retrovirali endogeni in RT-PCR e ciò può essere imputabile ad un sistema poco sensibile considerate le difficoltà nel ripetere le amplificazioni del gene housekeeping GAPDH (Fig. 4)

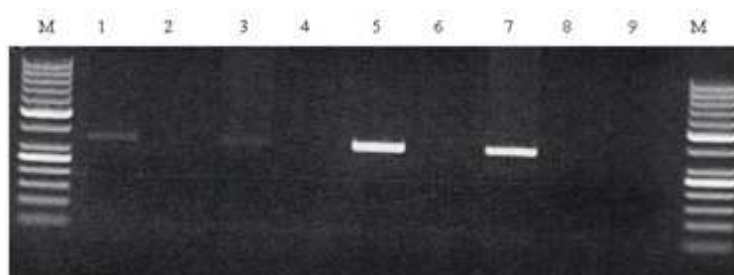


Figura 4. Repliche di RT-PCR con primer GAPDHbos for e rev.  
1-3-5-7: +RT; 2-4-6-8: -RT; 9 bianco. M: marcatore di peso molecolare 50 bp generuler.

Le tipologie di latte destinato al commercio sottoposti a trattamento termico (UHT e pastorizzato) non hanno fatto rilevare nessuna attività retrotrascrittasi e nello stesso tempo nessun trascritto è stato amplificabile in RT-PCR. Tale risultato è spiegabile con la termolabilità dei retrovirus. Nei saggi dell'attività RT dei campioni di latte crudo e pastorizzato, al contrario, si sono ottenuti risultati positivi. In RT-PCR, tuttavia, è stato rilevato l'amplificato relativo al  $\gamma 4$  solo nel 50% dei campioni di latte crudo ed in nessun latte pastorizzato; non sono stati rilevati  $\gamma 9$ ,  $\gamma 7$  e  $\beta 3$  in nessuno di questi campioni (mentre il GAPDH si è ritrovato nel 100% dei campioni in esame).

In ultimo, nei campioni di latte fresco non è stato possibile rilevare attività retrotrascrittasi ed i risultati della PCR su cDNA sono contraddittori (solo nel 50% dei casi si amplifica il GAPDH ed in nessun caso si osservano amplificati relativi ai retrovirus endogeni). Concludendo, se da un lato i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di latte UHT sono facilmente spiegabili e conformi alle attese, si ritiene che il protocollo impiegato potrebbe essere carente in termini di sensibilità e ripetitività. Anche l'adozione di una strategia alternativa, con l'impiego del protocollo Invitrogen SuperScript III Reverse Transcriptase, ha dato dei risultati paragonabili a quelli descritti.

### **Bibliografia**

- Rui X., Kwangha P., Hoontaek L., Jinhoi K., Chankyu P. (2008). Identification and Classification of Endogenous Retroviruses in Cattle. *Journal of Virology*, January 2008, p. 582-587, Vol. 82, No. 1.
- Morozov V.A., Morozov A. V., Lagaye S. (2007). Endogenous JSVR-like proviruses in domestic cattle: Analysis of sequence and transcript. *Virology*.
- Kempf W., Marshall E. K., Dvorak A. M., Lord C. C., Burg G., Letvin N. L., Koralkin I. J. (2003). Endogenous retroviral element, but not exogenous retroviruses, are detected in CD30-positive lymphoproliferative disorders of the skin. *Carcinogenesis* Vol. 24, n. 2, pp. 301-306.
- Yu P., Zeng L., Li S., Li Y., Chen J., Lu Y., Zeng Y., Bu H. (2004). Screening and analysis of porcine endogenous retroviruses in Chinese banna minipig inbred line. *Transplantation proceedings*, 36. 2485-2487.

Rui X., Kwangha P., Oh Y., Jinhoi K., Chankyu P. (2008). Structural characterization of genome of BERV y4, the most abundant endogenous retrovirus family in cattle. *Molecules and Cells*, 26, 404-408, October 31.

Rui X., Jinhoi K., Choi H., Kwangha P., Lee H., Chankyu P. (2008). Characterization of the Bovine Endogenous Retrovirus  $\beta$ 3 genome Rui Xiao, Juhyun Kim, Hojun Choi, Kwangha Park, Hoonteak Lee, Chankyu Park *Mol. Cells*, Vol. 25, n. 1, pp. 142-147.



*Presenza di retrovirus endogeni (ERV) in alcune tipologie di latte bovino destinato al consumo umano - Endogenous retrovirus (ERVs) presence in certain types of bovine milk for human consumption by Torresi C., et al. is licensed under a Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.*

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it; redazione-spvet@izsum.it <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> ; <a href="http://indice.spvet.it">http://indice.spvet.it</a>
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it