

PARAMETRI ISTOLOGICI DI STIMA DELL'EFFICACIA DI VACCINI PCV2 A DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE

HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF EFFECTIVENESS OF PCV2 VACCINES WITH DIFFERENT ANTIGEN PAYLOAD

SARLI G.¹, D'ANNUNZIO G.¹, GUARNERI F.², BACCI B.¹, BONIOTTI M.B.²,
BARBIERI I.², LELLI D.², TRESOLDI E.T.³, AMADORI M.¹

¹ DIMEVET – Bologna University, Bologna, Italy

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy

³ DMV, Specialist in Science and Medicine of Laboratory Animals, Brescia, Italy.

Parole chiave: PCV2, vaccinazione, istologia.

Key words: PCV2, vaccination, histology.

RIASSUNTO

L'istopatologia, strumento imprescindibile per la diagnosi di PCVD, mediante l'immunoistochimica è oggi anche un supporto per valutare la carica virale residua nei tessuti per stimare l'efficacia vaccinale. Obiettivo del presente studio è stata la stima, in soggetti vaccinati e poi esposti ad infezione nasale con PCV2, della presenza di lesioni riconducibili a PCVD nonché la stima della carica virale residua nei tessuti linfoidi. In nessuno dei 20 soggetti in esame sono state rilevate lesioni macroscopiche o microscopiche riferibili a PCVD: unica osservazione compatibile con infezione da PCV2 è stata il riscontro di cellule istiocitarie reattive e/o cellule giganti multinucleate singole centrofollicolari nel 31% dei tessuti linfoidi disponibili dai soggetti vaccinati, rispetto ad una percentuale del 13% nei soggetti non vaccinati. La carica virale residua saggiata mediante immunoistochimica è stata dimostrata solo in 3 soggetti su 20, con positività prevalentemente di grado 1. Conclusioni: 1) l'infezione sperimentale con PCV2 preceduta da vaccinazione non è risultata associata allo sviluppo di PCVD; 2) la carica virale residua nei tessuti linfoidi dopo esposizione a PCV2 è risultata bassa, ma il risultato andrebbe confrontato con metodica più sensibile dell'immunoistochimica; 3) emerge la possibile associazione ad un meccanismo IFN-gamma dipendente stimolato dal vaccino, nella presenza nei soggetti vaccinati di cellule giganti/istiocitarie reattive.

ABSTRACT

Histopathology and immunohistochemistry have been confirmed as an essential tools in the diagnosis of Porcine Circovirus Diseases (PCVD), and are also helpful to evaluate the efficacy of PCV2-vaccines both in field conditions and in experimental vaccination challenges. The main goal of this study was to assess by histopathology and immunohistochemistry (IHC) the protective effect of an experimental PCV2-vaccine with different payload in vaccination-exposure challenge. Twenty pigs were examined. The only histological finding consistent with PCV2 infection was the presence of reactive histiocytic cells and/or centrofollicular single multinucleated giant cells. The percentage of these cells was higher in vaccinated (31%) than in the unvaccinated pigs (13%). Residual viral load assessed by IHC was demonstrated in 3/20 animals, which was predominantly grade 1. Conclusions: 1) experimental vaccination and infection with PCV2 was not associated with PCVD development; 2) residual viral load in lymphoid tissue after exposure to PCV2 is low, but the result should be compared with a more sensitive method; 3) the possible pathogenetic association between giant/histiocytic cells in lymphoid tissue and IFN-gamma-dependent mechanism in vaccinated subjects is hypothesized.

INTRODUZIONE

Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) è oggi considerato uno degli agenti patogeni più importanti per i suini domestici in tutto il mondo; è responsabile di un ampio spettro di patologie indicate con l'acronimo PCVD – *Porcine Circovirus Disease* (Opriessnig *et al.*, 2007), di cui la più nota è la *Post-weaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS).

La diminuzione della morbidità ed il miglioramento dell'efficienza produttiva dopo l'adozione dei vaccini anti-PCV2, introdotti in commercio nel 2004 in Europa e nel 2006 in America, hanno enfatizzato l'impatto negativo dell'infezione da PCV2. Infatti, oltre a ridurre la mortalità associata a PMWS, l'impiego della vaccinazione ha determinato un incremento della produttività sia nelle aziende colpite dalla PMWS che in quelle non colpite, in quest'ultimo caso rendendo evidente l'esistenza e l'importanza delle forme subcliniche d'infezione, che ugualmente determinano un impatto negativo sull'economia aziendale (Young *et al.*, 2011; Alacorn *et al.*, 2013). Nonostante i successi della vaccinazione, dimostratasi efficace nel ridurre i segni clinici di malattia, la carica virale nel sangue e la percentuale di suini viremici, nonché di determinare una diminuzione dell'escrezione virale, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2 (Afghah *et al.*, 2017). Infatti, i vaccini attualmente disponibili non inducono una protezione completa ed il virus continua a circolare anche nelle aziende che praticano la vaccinazione (Kekarainen & Segalés, 2015). In campo il problema principale rimane quello dell'insorgenza di infezioni subcliniche con ceppi naturalmente circolanti, che possono potenzialmente causare effetti collaterali, quali riduzione della risposta immunitaria sistemica, con ripercussioni sulla resistenza allo sviluppo di malattie.

Uno dei limiti dei vaccini commerciali può essere ascrivibile alla diversità genomica riscontrata nei ceppi di campo, che fanno ipotizzare la possibile fuga immunitaria da vaccino (Xiao *et al.*, 2012). Allo stesso modo, la diversità nella formulazione dei vaccini commerciali attualmente disponibili rende complessa la valutazione omogenea della loro efficacia, laddove si riscontrano differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini monodose in commercio (Seo *et al.*, 2014), ed in virtù della mancanza di un dato di riferimento oggettivo riguardante la carica antigenica minima proteggente da fornire affinché siano raggiunti gli obiettivi della vaccinazione.

Vanno oggi dunque ampliandosi le frontiere nella sperimentazione di formulazioni vaccinali che possano garantire il conferimento di una maggiore protezione mediante lo sviluppo di una risposta immunitaria protettiva completa. In questo scenario di prospettive future nel campo della sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali, la diagnostica istopatologica, che nel tempo si è confermata strumento diagnostico imprescindibile nelle diagnosi di PCVD, si colloca come supporto per stimare l'efficacia vaccinale sia in campo che in condizioni sperimentali di *challenge* vaccinazione-esposizione, tesa a dimostrare le basse cariche virali residue nei tessuti di soggetti vaccinati nel confronto con i non vaccinati, a conferma di un'avvenuta *clearance* virale.

Obiettivo del presente studio, di cui la parte in vivo ed i dosaggi di fattori umorali ematici è già stata presentata nel 2019 al convegno SIPAS (Guarneri *et al.*, 2019), è di documentare in soggetti vaccinati con una formulazione vaccinale sperimentale fornita a 3 diversi dosaggi, quale sia l'effetto protettivo verso l'infezione intranasale con PCV2 e quale sia, in seguito a quest'ultima, la carica residua virale nei tessuti target.

MATERIALI E METODI

Sperimentazione animale - Casistica

Sono stati utilizzati 20 suinetti ibridi commerciali "Goland" trattati nell'ambito di un programma sperimentale, autorizzato dal comitato etico di IZSLER e dal Ministero della Salute (autorizzazione MINSAL alla sperimentazione animale n. 230/2018 del 14/3/2018 ai sensi dell'art. 31 del D.lgs 26/2014). Brevemente: suinetti di 30 giorni di vita provenienti da 3

distinte nidiate, suddivisi in 4 gruppi, venivano stabulati in 4 diverse stalle d'isolamento. Dopo adeguato acclimatamento a 39 giorni sono stati vaccinati e, dopo 4 settimane, infettati per via intranasale (per dettagli Guarnieri *et al.*, 2019).

Il disegno sperimentale della vaccinazione ha previsto l'impiego di un vaccino sperimentale a diversa quantità di antigene costituito da un ceppo PCV2b intero inattivato con beta-propionolattone (BPL), formulato in adiuvante oleoso, somministrato per via IM nella regione del collo, a tre gruppi (A, B, C) di cinque animali ciascuno, in dose decrescente di antigene per ogni gruppo (A: 800 ng, B: 266 ng; C: 88 ng) e confrontato con un gruppo controllo non vaccinato (D). Dopo 4 settimane a tutti gli animali è stata somministrata, per via intranasale, una sospensione virale contenente 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2 omologo a quello del vaccino.

Esame necroscopico e processazione dei campioni

Gli animali sono stati soppressi a 51 ± 2 giorni post-infezione e sottoposti ad esame necroscopico secondo protocollo autorizzato dal MINSAL in tre giornate, con identificazione random dei soggetti da sopprimere, in maniera da garantire la presenza di soggetti appartenenti a ciascun gruppo in ogni giornata di soppressione.

Durante l'esame necroscopico sono stati fissati in formalina tamponata campioni di tessuti prevalentemente linfoidi, notoriamente bersaglio di PCV2: linfonodo mesenterico, milza, linfonodo mediastinico, linfonodo inguinale superficiale, tonsille, ileo, polmone, trachea, bronchi a livello di biforcazione tracheale, cuore, fegato, rene e pancreas.

I tessuti fissati sono stati successivamente inclusi in paraffina e sono state ricavate sezioni di 4 mm di spessore, colorate in seguito con ematossilina-eosina ai fini delle indagini istologiche.

Graduazione

E' stato applicato un sistema di graduazione atto a descrivere l'entità dell'iperplasia del tessuto linfoide (vedi figura 1) con le seguenti definizioni: Grado 1 o tessuto linfoide non reattivo: linfonodi (presenza di follicoli primari e tessuto medulla-like ben rappresentato), milza (presenza di guaine linfoidi periarteriolariformi formate unicamente da linfociti maturi con assenza di centri germinativi), tonsilla (presenza di tessuto linfoide diffuso senza centri germinativi), ileo (presenza di tessuto linfoide con assenza di centri germinativi). Grado 2: linfonodi (presenza di follicoli secondari in quasi tutto il tessuto linfoide ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare con riduzione percentuale della presenza di tessuto medulla-like, comunque sempre osservabile), milza (presenza di guaine linfoidi periarteriolariformi espanse, nel cui spessore è possibile apprezzare la presenza di centri germinativi), tonsilla e ileo (presenza di centri germinativi in non oltre il 50% del tessuto osservabile); Grado 3: linfonodi (marcata iperplasia reattiva di tutti i follicoli osservabili ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare, che va ad occupare completamente, cancellandone l'osservazione, il tessuto medulla-like), milza (espansione pericentrica delle guaine linfoidi periarteriolariformi con presenza di numerosi centri germinativi e tendenza alla confluenza con i centri linfoidi adiacenti), tonsilla ed ileo (presenza di centri germinativi in tutto il tessuto linfoide osservabile).

Poiché l'esposizione al virus è avvenuta per via nasale, si è concentrata l'attenzione su trachea e grossi bronchi a livello di biforcazione tracheale per individuare eventuali differenze di componente flogistica mucosale tra i gruppi a confronto, stimata mediante un sistema semiquantitativo di graduazione (esempio in figura 2). Il sistema ha previsto la valutazione dell'infiltrato infiammatorio e della sua estensione. Quest'ultima è stata stimata suddividendo idealmente lo strato della lamina propria *mucosae* in tre terzi: terzo superiore a contatto con l'epitelio cilindrico pseudostratificato ciliato della mucosa, terzo medio, e terzo inferiore a contatto con lo strato di cellule muscolari lisce. In ogni caso è stato stimato se l'infiltrato infiammatorio rimanesse localizzato nel terzo superiore o se si estendesse ad invadere gli altri

strati medio e inferiore. La valutazione semiquantitativa dell'entità della popolazione presente è stata considerata: lieve (+): quando in un campo a 40x si potevano osservare poche (da 5 a 10) cellule, tra linfociti e plasmacellule, disposte ad andamento lineare nella parte più superficiale del terzo superiore a contatto quasi con l'epitelio; moderata (++): quando il numero di cellule aumentava con tendenza ad occupare con distribuzione abluminale lo spazio disponibile; grave (+++): quando il numero delle cellule era così elevato da mascherare il tessuto connettivo della lamina propria. In tutta la circonferenza della trachea o dei bronchi sia l'intensità dell'infiltrato che l'estensione non apparivano uniformi e, il caso in corso di valutazione, è stato graduato in funzione della lesione peggiore osservabile anche se iporappresentata.

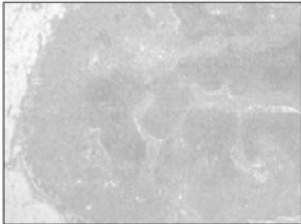
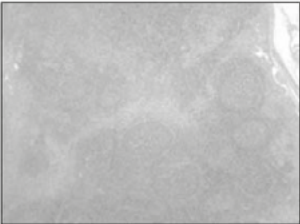
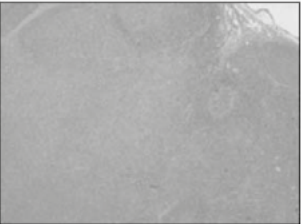
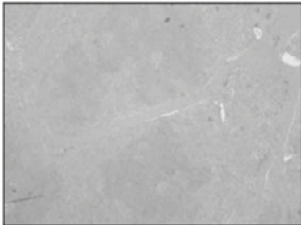
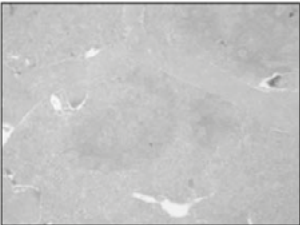
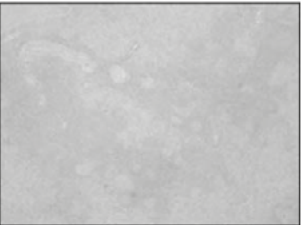
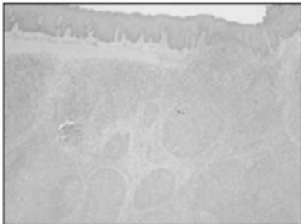
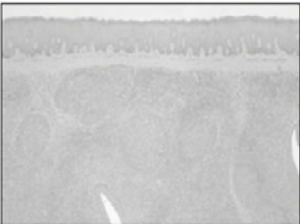
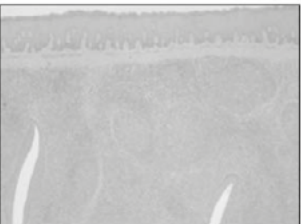
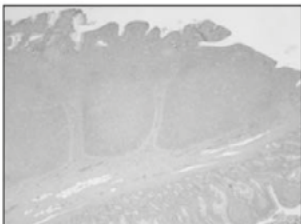
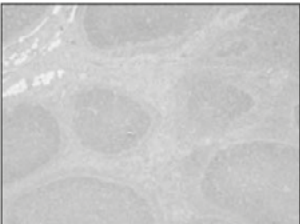
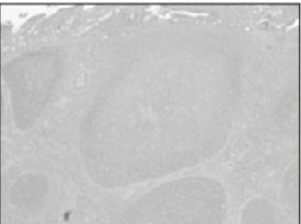
	Grado 1	Grado 2	Grado 3
LINFONODO			
MILZA			
TONSILLA			
ILEO			

Figura 1. Quadro istologico del grado di iperplasia del tessuto linfoide nelle diverse stazioni linfoidi impiegate nello studio. Per tutte le sezioni colorazione ematossilina-eosina, obiettivo 5x.

Figure 1. Histological picture of tissue hyperplasia in the lymphoid organs used in the study. For the grading system see text. For all sections hematoxylin-eosin staining, 5x objective.

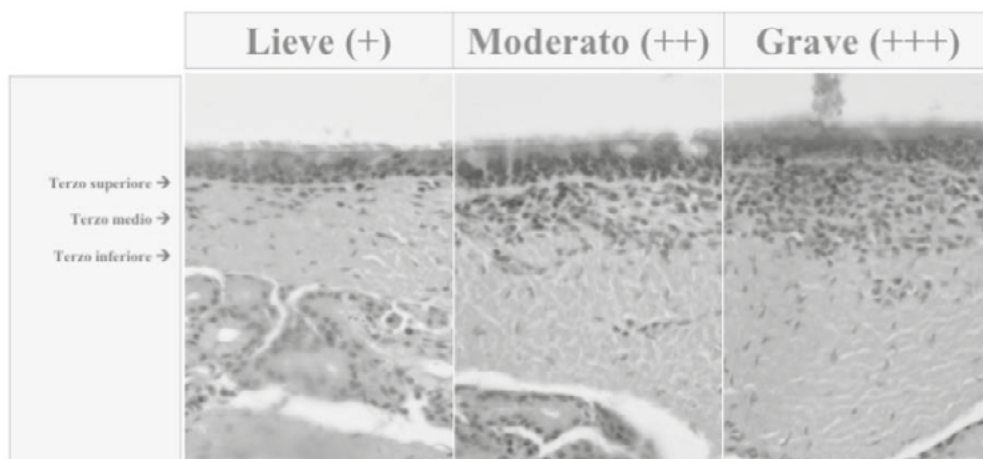


Figura 2. Graduazione dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria della trachea/bronco (biforcazione tracheale) confinata nel terzo superiore della lamina propria. Tutte le sezioni colorazione ematossilina-eosina, obiettivo 40x. Per il sistema di graduazione vedi testo. Da sinistra a destra +, ++, +++.

Figure 2. Grading of the inflammatory infiltrate in the lamina propria of the trachea / bronchus (tracheal bifurcation) confined in the upper third of the lamina propria. All sections hematoxylin-eosin staining, 40x objective. For the grading system see text. Left to right +, ++, +++.

Metodica immunoistochimica

L'indagine immunoistochimica per PCV2, è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (Mab F217) gentilmente fornito dal Dr. Gordon Allan secondo procedura già pubblicata (Sarli *et al.*, 2009).

Valutazione della reazione immunoistochimica per PCV2

Nei tessuti linfoidi la quantità di antigene virale, saggiata con indagine immunoistochimica, è stata stimata mediante una variazione dei criteri proposti da Opriessnig *et al.* (2010), prevedendo la possibilità di 4 differenti gradi di rilevazione dell'antigene:

Grado 0. assenza della reazione immunoistochimica;

Grado 1. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli inferiore al 25% dei follicoli presenti;

Grado 2. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti compreso tra il 25-50%;

Grado 3. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti superiore al 50%.

RISULTATI

In Tabella 1 sono riportati, suddivisi per gruppi, i risultati della graduazione dell'iperplasia dei tessuti linfoidi, le valutazioni del grado di infiltrazione mucosale nella trachea e nei grossi bronchi a livello della biforcazione tracheale ed i risultati della graduazione dell'indagine immunoistochimica.

Gruppi	Soggetto n.	LN mesenterico	Milza	LN mediastinico	LN inguinale sup.	Tonsille	Ileo	Trachea	Bronco dx	Bronco sx
A	15	3	1	2	1	3 (CG/M)	3 (CG/M)	*	S+	S+
	5	3	2	3	1	2 (CG/M)	2	S++	S++	S++
	17	3	1	2	1	2	3 (CG/M)	*	S e M ++	S e M++
	18	3 (CG/M)	2	2 (CG/M)	2 (CG/M)	2 (CG/M)	*	S e M++	S+	S++
	14	2 (CG/M)	2	2 (CG/M)	2 (CG/M)	2 (CG/M)	3 (CG/M)	S+	S++	S++
B	10	3 (CG/M)	1	2	1	3	3	*	S+	S+
	13	3	1	3	2	3	3 (CG/M)	S+	S e M ++	S+
	19	3	1	2 (CG/M)	1	3	2	S e M++	S++	S+
	20	3	2	2 (CG/M)	2	2	2	S++	*	S++
	12	*	2	3 (CG/M)	2	3 (CG/M)	*	S++	S++	S+
C	11	3	2	1	2	3	3 (CG/M)	S e M++	S e M ++	S e M++
		IHC 1	IHC 1		IHC 2					
	16	3 (CG/M)	2	2 (CG/M)	2	3 (CG/M)	2 (CG/M)	S e M++	S+	S+
		IHC 1				IHC 1	IHC 1			
	8	2	1	2	2	3 (CG/M)	*	S++	S++	S++
D	2	2	2	2	1	3	2 (CG/M)	S+	S+	*
	3	3 (CG/M)	2	2	1	3	3 (CG/M)	S+	S++	S++
		IHC 2	IHC 1	IHC 1	IHC 1	IHC 1				
	4	3	3	2	3	3	2	S+	S++	S++
	1	3	2	3	2	3	3	S++	S++	S++
	6	2	2	2	2	3	2 (CG/M)	S++	S++	*

Tabella 1. Risultati della graduazione istologica dell'iperplasia nelle diverse stazioni linfoidi, della localizzazione e dell'entità dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria della trachea e dei grossi bronchi a livello di biforcazione tracheale e della reazione IHC per la graduazione della carica virale residua nei tessuti linfoidi. I risultati dell'indagine IHC sono riportati solo se diversi da 0. CG/M = stazione linfoide con presenza di isolate cellule giganti e/o multinucleate centrofollicolari. * = sezione mancante. S = terzo superiore; M = terzo medio.

Table 1. Results of the histological grading of lymphoid tissues hyperplasia, localization and extent of the inflammatory infiltrate in the lamina propria of the trachea and of the large bronchi at the level of the tracheal bifurcation and of the IHC reaction for the grading of the residual viral load in lymphoid tissues. The results of IHC are reported only if different from 0. CG / M = presence of isolated giant cells and / or centrofollicular multinucleated cells. * = section missing. S = upper third; M = middle third.

Dall'esame dei risultati riportati in tabella 1, non si evincono differenze sostanziali tra i diversi gruppi nel grado di iperplasia dei tessuti linfoidei. Risulta evidente in tutti i soggetti la scarsa risposta iperplastica splenica che, solo nel gruppo D (soggetti di controllo non vaccinati), appare leggermente più pronunciata. In tutti i gruppi si può inoltre notare una scarsa risposta reattiva del linfonodo inguinale superficiale. Più elevata iperplasia è stata invece riscontrata in tonsille, linfonodi mesenterici e tessuto linfoide dell'ileo. Per quanto riguarda i linfonodi tracheo-bronchiali (tributari del territorio di esposizione al virus), la reazione iperplastica si è dimostrata essere di grado intermedio, sicuramente non elevata come quella dei linfonodi mesenterici.

In nessuno dei 20 soggetti in sperimentazione sono state rilevate lesioni macro- o microscopiche riferibili a PCVD. L'unica osservazione istologica compatibile con un effetto citopatico legato all'infezione da PCV2 è stata il riscontro di occasionali cellule istiocitarie reattive e/o cellule giganti multinucleate singole, localizzate al centro dei follicoli (Figura 3), senza mai riscontrare una chiara connotazione di granuloma. In ogni soggetto erano disponibili 6 stazioni linfoidei; nei 5 soggetti del gruppo non vaccinato (D), su 30 stazioni linfoidei totali sono state osservate cellule istiocitarie reattive e/o giganti centrofollicolari in 4 tessuti appartenenti a 3 soggetti diversi. Mentre complessivamente nei 15 soggetti dei 3 gruppi sottoposti a vaccinazione sono state riscontrate cellule istiocitarie reattive e/o giganti in 28 stazioni di tessuto linfoide su 90, appartenente ad ognuno dei 15 soggetti (vedi Tabella 1). Complessivamente la percentuale di cellule istiocitarie reattive e/o giganti centrofollicolari è risultata più elevata nei soggetti vaccinati (31%) rispetto ai soggetti non vaccinati (13%), ma il test Chi quadrato ha evidenziato una differenza al limite della significatività ($P=0,056$) nel confronto tra le due percentuali.

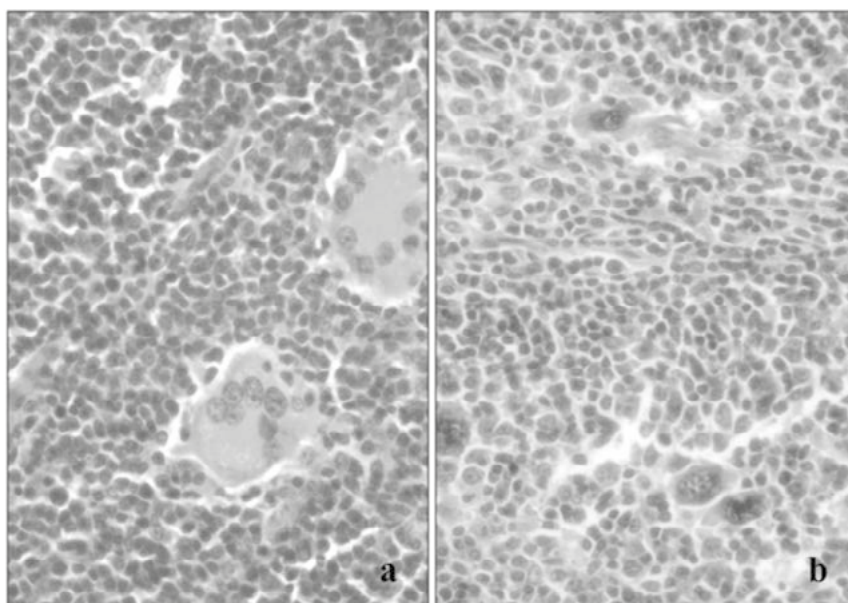


Figura 3. a) Suino, soggetto gruppo D (soggetto n. 6), ileo, cellule multinucleate nel tessuto linfoide. b) Suino, soggetto gruppo C (soggetto n. 16), ileo, cellule istiocitarie reattive nel tessuto linfoide. Ematossilina-eosina, 40x.

Figure 3. a) Pig, group D subject 6, ileus, multinucleated cells in lymphoid tissue. b) Pig, group C subject 16, ileum, reactive histiocytic cells in lymphoid tissue. Hematoxylin-eosin, 40x.

L'infiltrato infiammatorio mucosale a livello di trachea e grossi bronchi, in tutti i gruppi, si è dimostrato essere prevalentemente rappresentato da una lieve (+) o moderata (++) quantità di linfociti e plasmacellule localizzata nel terzo superiore della lamina propria; lo sconfinamento di una moderata quantità di infiltrato infiammatorio a livello di terzo medio è stato evidenziato saltuariamente (1 soggetto per gruppo), nell'ambito dei gruppi sottoposti a vaccinazione.

Con l'indagine immunoistochimica la reazione positiva per PCV2 si è evidenziata con colorazione marrone del citoplasma (figura 4), complessivamente con positività, se presente, riconducibile prevalentemente al grado 1; solo in due stazioni linfonodali (soggetti 3 e 11) si è riscontrata una quantità di antigene di grado 2. Nel complesso la carica virale residua è stata dimostrata solo in 3 soggetti su 20 sottoposti ad indagine immunoistochimica (vedi tabella 1).

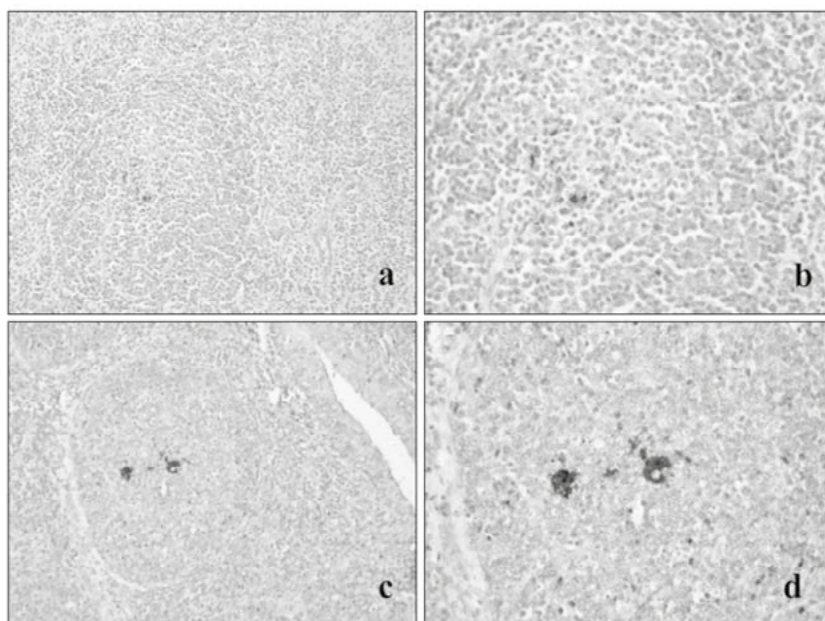


Figura 4 Risultato della reazione IHC per la quantificazione dell'antigene virale in un suino del gruppo D (soggetto n. 3); a) linfonodo inguinale superficiale, follicolo positivo, 20x; in b) a 40x, particolare della positività all'IHC nel follicolo linfonodale; c) tonsilla, follicolo positivo, 20x; in d) a 40x, particolare della positività nella tonsilla, rappresentata da 2 cellule giganti positive alla reazione IHC.

Figure 4 IHC reaction for the quantification of the viral load. Group D, subject 3; a) superficial inguinal lymph node and c) tonsils showing positive cells in a follicle, 20x; in b) and d) details at higher magnification respectively of a) and c) (40x).

DISCUSSIONE

Dai risultati presentati al Meeting annuale SIPAS del 2019 (Guarneri *et al.*, 2019) relativi all'indagine in vivo è emerso che lo sviluppo di risposta IFN-g è un rilievo altamente predittivo di protezione: la risposta IFN-g viene modulata in senso positivo dal vaccino inattivato e non dal virus infettante. Infatti, i soggetti che hanno sviluppato tale risposta PCV2-specifica dopo la vaccinazione, non hanno presentato viremia post-infezione. Inoltre, la quantità di antigene presente nel vaccino influisce sui livelli di anticorpi neutralizzanti anche nel periodo post-

infezione. Tutti i soggetti del gruppo di controllo non vaccinato (D), non hanno mostrato lo sviluppo di risposta IFN-g successivamente all'infezione intranasale con PCV-2. In tale gruppo, la viremia è stata riscontrata in tutti i soggetti; in generale, tutti i soggetti risultati viremici dopo l'esposizione al virus erano IFN-g negativi e con titolo anticorpale inferiore o uguale a 1:100 a tre settimane dalla vaccinazione, a testimonianza di una stimolazione non efficace del sistema immunitario. Il titolo anticorpale non è risultato un adeguato indicatore di protezione a livello individuale, dal momento che il picco anticorpale è risultato talora coincidere con il picco della viremia; tuttavia è risultata esserci una correlazione positiva tra dosaggio antigenico nel vaccino ed entità dei titoli di anticorpi, considerando che il gruppo A ha sviluppato un titolo medio significativamente maggiore. Sull'efficacia virologica del vaccino risulta essere quindi predittivo lo sviluppo di una risposta IFN-g-mediata più che lo sviluppo della risposta umorale (Guarneri *et al.*, 2019).

In sede di confronto dei risultati ottenuti dalle diverse pertinenze laboratoristiche coinvolte nel progetto, siamo stati chiamati, con i risultati ottenuti presso il Servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET, a rispondere alle seguenti domande.

1. Complessivamente si può sostenere che in seguito ad esposizione a PCV2 nei soggetti vaccinati non si sono rilevate lesioni riferibili a PCVD?

Il risultato si può considerare atteso, visto che la riproduzione sperimentale delle PCVD prevede sempre, oltre all'infezione con PCV2, anche la co-presenza di uno stressore infettivo o non infettivo che in questo caso non è stato fornito, poiché l'obiettivo del progetto era solo valutare la risposta al vaccino ed il contenimento della viremia dopo esposizione.

Unica manifestazione istologica del possibile danno da PCV2 è stata identificata nella presenza di cellule istiocitarie reattive/giganti centrofollicolari, senza che queste abbiano mai assunto una chiara connotazione di granuloma.

Si ritiene che in molti granulomi cosiddetti "infettivi" la formazione di cellule epiteliodi/giganti multinucleate a partire dai macrofagi faccia seguito all'attivazione degli stessi da parte di citochine liberate da linfociti attivati dal contatto con gli antigeni, come nel caso della formazione dei granulomi tubercolari, che si sviluppano attraverso una risposta linfocitaria di tipo Th1 (Ackermann, 2017). Tra le diverse citochine capaci di attivare i macrofagi nel processo che porta alla formazione di cellule giganti multinucleate, risultanti dalla fusione di due o più macrofagi attivati, risulta essere coinvolto anche l'IFN-g (Snyder, 2017), e nei soggetti vaccinati se ne è riscontrata una produzione antigene-specifica sia come risposta al vaccino che nella successiva infezione sperimentale.

Se si confrontano le percentuali di tessuti linfoidi che hanno manifestato la presenza di cellule istiocitarie reattive/giganti centrofollicolari, complessivamente i tre gruppi di soggetti vaccinati hanno presentato una percentuale di coinvolgimento maggiore (31%) rispetto a quelli non vaccinati (13%), lasciando ipotizzare l'importanza di questo meccanismo IFNg-dipendente; pur consapevoli che il test statistico ha messo in evidenza una differenza al limite della significatività tra i valori a confronto ($P=0,056$), la conferma potrebbe essere ottenuta utilizzando un maggior numero di soggetti. L'ipotesi di un meccanismo legato all'ipersensibilità ritardata nella genesi della formazione di queste varianti cellulari centrofollicolari andrebbe anche contestualizzato, considerando che anche il coinvolgimento di altre citochine può contribuire al risultato, interferendo in maniera sinergica o antagonista con l'IFN-g.

2. La vaccinazione ha realmente ridotto la carica virale nei tessuti target?

La diminuzione della comparsa di PCVD è stato uno dei successi maggiori conseguiti con l'avvento della vaccinazione, mentre non completamente conclusi sono i risultati sulla reale riduzione dei soggetti con infezione subclinica.

Da diversi anni sono noti criteri per stimare la carica virale per PCV2 nei tessuti anche in seguito a vaccinazione (Opriessnig *et al.*, 2010; Hemann *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). I criteri impiegati per stimare l'efficacia vaccinale sono gli stessi utilizzati per la diagnosi di PMWS, ma con logicità contraria: assenza di segni clinici di malattia, riduzione della carica virale nel siero indicante efficacia virologica, assenza di lesioni caratteristiche nei tessuti linfoidi e assenza di rilevazione mediante tecniche di immunoistochimica e ibridazione *in situ* dell'antigene virale a livello di stazioni linfoidi; a questi rilievi si aggiunge la stima dell'efficacia immunologica conferita dalla vaccinazione mediante valutazione della risposta umorale e cellulo-mediata (Chae, 2012).

Nella casistica oggetto di questo studio l'applicazione di metodica immunoistochimica per stimare la presenza di macrofagi contenenti antigeni virali ha messo in evidenza una bassa percentuale di soggetti positivi: 3 soggetti su 20, di cui 2 del gruppo a basso dosaggio di antigene virale vaccinale (gruppo C) e 1 del gruppo di controllo (D) non vaccinato. Il risultato va analizzato in maniera critica. Se da un lato può essere considerato positivamente, in quanto la riduzione della quantità di virus a livello di tessuti target è uno degli obiettivi della vaccinazione, dall'altro il risultato può essere la conseguenza delle condizioni sperimentali. Le PCVD sono sindromi multifattoriali innescate dalla presenza di cofattori infettivi e ambientali; la stessa gestione in termini di biosicurezza, igiene e management d'allevamento si è dimostrata poter influire sulla progressione dell'infezione da PCV2 (Madec *et al.*, 2008; Andraud *et al.*, 2009). Ne deriva che le condizioni di esperimento, con stabulazione degli animali in ambiente controllato ad elevata biosicurezza, in presenza di parametri ambientali ottimali, e che hanno diminuito o meglio tenuto sotto controllo la co-presenza di stressori microbiologici, ha di fatto ridotto la possibilità di raggiungere elevati tassi di replicazione del PCV2 che, come è noto, è favorito dalla presenza di attivatori dei macrofagi. Quindi già questa considerazione può giustificare la bassa carica virale riscontrata complessivamente a livello di tessuti nei soggetti in sperimentazione.

Gli unici 3 soggetti risultati positivi per PCV2 all'IHC a livello di tessuti linfoidi (vedi Tabella 1), hanno presentato una viremia più tardiva (al, o fino, al 35° giorno p.i.), mentre in tutti gli altri soggetti o la viremia non si è mai manifestata oppure si è risolta più precocemente e, quindi, temporalmente è risultata molto più distante dalla data di soppressione. Questo potrebbe giustificare l'assenza di antigene determinabile nei tessuti target riscontrata negli animali del presente studio. Inoltre nei 3 soggetti risultati con carica virale determinabile, è opportuno sottolineare la scarsa quantità riscontrata (prevalentemente con carica virale residua di grado 1). Va comunque considerato che pur con reazione IHC negativa, non si può concludere sulla reale negatività dei soggetti risultati tali, considerando la minore sensibilità della tecnica IHC rispetto ad altre più sensibili (es. PCR). Quindi una bassa carica virale di partenza abbinata ad un tempo di prelievo dei tessuti (soppressione) distante dall'ultima viremia, può aver contribuito al risultato ottenuto, che necessita di una verifica nelle condizioni di campo, molto diverse da quelle sperimentali soprattutto per la co-presenza di diversi co-stressori microbiologici.

CONCLUSIONI

In accordo con le attese, l'infezione sperimentale con solo PCV2 non è risultata associata allo sviluppo di PCVD nei 15 soggetti vaccinati in esame e in quelli del gruppo di controllo.

La carica virale residua nei tessuti linfoidi dopo esposizione a PCV2 è risultata bassa, ma il risultato andrebbe confrontato con metodica più sensibile (PCR), o programmando le soppressioni in tempi più vicini all'ultimo episodio viremico.

Resta da confermare, alla luce di una maggiore casistica, se la presenza di cellule giganti multinucleate e istiocitarie reattive, maggiormente presenti nel gruppo di soggetti vaccinati, possa essere riconducibile ad un meccanismo immunoreattivo IFN γ -dipendente.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackermann M. R. (2017) "Inflammation and Healing". In: Zachary, J. F., "Pathologic basis of veterinary disease" 6th Ed., St. Louis - Missouri, Elsevier, 72-131.
2. Afghah Z., Webb B., Meng X. J., & Ramamoorthy S. (2017) "Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: is eradication a possibility?" *Vet. Microbiol.* 206, 21-28.
3. Alarcon P., Rushton J., Nathues H., & Wieland B. (2013) "Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms". *Prev. Vet. Med.* 110(2), 103-118.
4. Andraud M., Rose N., Grasland B., Pierre J. S., Jestin A., & Madec F. (2009) "Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: a modelling approach". *Prev. Vet. Med.* 92(1-2), 38-51.
5. Chae C. (2012) "Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application". *Vet. J.* 194(2), 151-157.
6. Guarneri F., Amadori M., Boniotti M. B., Barbieri I., Lelli D., & Tresoldi E. (2019) "Parametri di immunità protettiva nel suino indotti da vaccini PCV2 a diverso contenuto di antigene". In: "Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini XLV Meeting Annuale", Rezzato (BS) - Villa Fenaroli - 21/22 Marzo 2019, 161-170.
7. Hemann M., Beach N. M., Meng X. J., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Vaccination with inactivated or live-attenuated chimeric PCV1-2 results in decreased viremia in challenge-exposed pigs and may reduce transmission of PCV2". *Vet. Microbiol.* 158(1-2), 180-186.
8. Kekarainen T., & Segalés J. (2015) "Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution". *Porcine Health Manag.* 1(1), 17.
9. Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R., & Jestin A. (2008) "Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience". *Transbound. Emerg. Dis.* 55(7), 273-283.
10. Opriessnig T., Meng X. J., & Halbur P. G. (2007) "Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies". *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(6), 591-615.
11. Opriessnig T., Patterson A. R., Madson D. M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X. J., & Halbur P. G. (2010) "Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination". *Vet. Microbiol.* 142(3-4), 177-183.
12. Park C., Oh Y., Seo H. W., Han K., & Chae C. (2013) "Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model". *Clin. Vaccine Immunol.* 20(3), 369-376.
13. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) "Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy". *Veterinary Record*, 164, 519-523, 2009.
14. Seo H. W., Lee J., Han K., Park C., & Chae C. (2014) "Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines". *Res. Vet. Sci.* 97(1), 38-42.

15. Shen H. G., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA". *J. Gen. Virol.* 93(6), 1345-1355.
16. Snyder P. W. (2017) "Diseases of Immunity". In: Zachary, J. F., "Pathologic basis of veterinary disease" 6th Ed., St. Louis, Missouri, Elsevier, 242-285.
17. Xiao C. T., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States". *J. Virol.* 86, 12469.
18. Young M. G., Cunningham G. L., & Sanford S. E. (2011) "Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis". *JSHAP*, 19(3), 175-180.