

VACCINAZIONE CONTRO VIRUS DELLA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO (PRRSV) E ESPOSIZIONE A INFEZIONE NATURALE DA CEPPO ETEROLOGO DI CAMPO: EFFICIENZA IMMUNITARIA E RISPOSTA NEUROENDOCRINA IN SUINI CONVENZIONALI

VACCINATION AGAINST PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) AND EXPOSURE TO NATURAL INFECTION BY A HETEROLOGOUS FIELD ISOLATE: IMMUNE EFFICIENCY AND NEUROENDOCRINE RESPONSE IN CONVENTIONAL PIGS

L. FERRARI

Dipartimento di Salute Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma

Parole chiave: virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), vaccinazione, infezione naturale, ceppo eterologo, risposta immunitaria e neuroendocrina.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), vaccination, natural infection, heterologous isolate, immune and neuroendocrine response.

Riassunto

La caratterizzazione della risposta anti-virale riveste una notevole importanza nello studio dei meccanismi volti a contrastare le infezioni e nell'impiego di nuove strategie per il miglioramento dell'efficienza vaccinale e della protezione immunitaria. Anche la determinazione della regolazione neuroendocrina può fornire informazioni sull'evoluzione dell'infezione, in quanto esiste una comunicazione bi-direzionale tra sistema immunitario e assi neuroendocrini. Ormoni quali cortisolo e ormone della crescita possono agire come sostanze immunomodulatrici, influenzando la risposta immunitaria e il decorso della patologia.

Il virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del suino (PRRSV) è una delle principali cause di malattia nel suino e la sua interazione con il sistema immunitario è complessa e ancora scarsamente compresa. Inoltre, ceppi virali geneticamente e antigenicamente distinti aumentano le difficoltà nello sviluppo di vaccini efficaci ad ampio spettro.

Nel presente lavoro, sono state dapprima valutate e ottimizzate differenti tecniche immunologiche e approcci di analisi al fine di quantificare in modo appropriato la risposta anti-virale, con particolare attenzione all'immunità cellulare. Inoltre, l'efficacia della somministrazione intradermica (ID) mediante dispositivo senza ago (IDAL®) è stata valutata rispetto alla più convenzionale somministrazione intramuscolare (IM) in un modello di intensa stimolazione anti-virale [vaccinazione per Aujeszky's Disease Virus (ADV)] allo scopo di trasferire tale applicazione alla più complessa interazione virus-ospite dopo vaccinazione e infezione da PRRSV.

La vaccinazione ID si è dimostrata in grado di indurre un'intensa risposta immunitaria, comparabile alla vaccinazione IM, come immunità umorale (anticorpi virus-neutralizzanti) e cellulare (cellule secernenti IFN- γ). I dati citofluorimetrici hanno evidenziato una modulazione positiva di cellule NK, linfociti T citotossici CD8 β +, cellule T attivate

CD4-CD25⁺ e regolatorie CD4⁺CD25⁺ in suini vaccinati per via ID. L'espressione genica di IFN- γ nelle PBMC è risultata indotta in entrambi i gruppi di animali vaccinati. La risposta immunitaria a PRRSV è stata quindi determinata dopo vaccinazione (ceppo cluster Lelystad) e infezione naturale da ceppo eterologo di campo (cluster italiano, 84% omologia ORF5) e associata al grado di protezione crociata e riduzione della patologia. Parallelamente ai parametri immunologici e clinici, è stata anche considerata l'attivazione citochinica e ormonale. Rispetto ai suini controllo, i suini vaccinati (gruppi IM e ID) hanno mostrato una riduzione della sintomatologia respiratoria del 72% e 79% e della sintomatologia complessiva (sintomatologia respiratoria + sintomatologia sistemica) del 68% e 72% rispettivamente. La protezione clinica è risultata associata a un'intensa attivazione immunitaria cellulo-mediata. I livelli più elevati di cellule PRRSV-specifiche secernenti IFN- γ sono stati osservati in associazione a un aumento di cellule NK, linfociti T γ/δ e linfociti T citotossici CD4-CD8^{high} nel sangue.

La protezione clinica è stata dimostrata dalla riduzione della sintomatologia clinica in termini di incidenza, durata e gravità, e da una più efficiente risposta immunitaria cellulo-mediata. Il precoce e rapido incremento dopo infezione e successivo ritorno a livelli basali dell'espressione di IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 e IFN- γ nelle PBMC, associato a modificazioni endocrine (cortisolo e GH) temporalmente regolate e più ridotti livelli di IL-10, sostengono una più efficiente responsività di cellule periferiche dell'immunità innata nella fase iniziale dell'infezione e un più efficiente controllo dello stato infiammatorio in una fase successiva. Inoltre, il grado di protezione clinica non è apparso influenzato dalla via di somministrazione del vaccino. I risultati confermano che la capacità di un ceppo di PRRSV di indurre una risposta immunitaria intensa riveste una maggior importanza rispetto alla similarità genetica tra ceppo vaccinale e ceppi di campo al fine di conferire una protezione clinica.

Abstract

The characterization of the anti-viral immune response is particularly relevant with regards to the study of the mechanisms mounted to cope with infections and to the employment of new strategies for improving vaccination efficacy and immune protection. Also determining the neuroendocrine modulation can be informative on the progression of infection since a bi-directional communication exists between the immune system and neuroendocrine axes. Hormones such as cortisol and growth hormone can act as immunomodulatory mediators, thus influencing the immune response and the recovery from the disease.

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is one of the major causes of disease affecting the swine population and its interaction with the immune system is complex and still poorly understood. Moreover, genetically and antigenically divergent strains make the development of efficacious wide spectrum vaccines more difficult.

In the present work, different immunological techniques and approaches of analysis were firstly evaluated and optimized in order to properly measure the anti-viral immune response, with particular attention to cellular immunity. Moreover, the efficacy of vaccine intradermal (ID) administration by a needle-less device (IDAL[®]) was assessed in comparison with the more conventional intramuscular (IM) route in a model of intense viral immune stimulation [vaccination against Aujeszky's Disease Virus (ADV)] in order to transfer such application to the more complex virus-to-host interaction observed upon PRRSV vaccination and infection.

ID vaccination proved to be able to elicit an intense immune response, strictly comparable to IM vaccination, in terms of humoral (VN antibodies) and cellular (IFN- γ secreting cells) immunity. Flow cytometry showed a positive modulation of NK cells, CD8 β + cytotoxic cells, CD4-CD25+ activated and regulatory CD4+CD25+ T cells in ID-vaccinated animals. IFN- γ gene expression in PBMC of both vaccinated groups was up-regulated.

The immune response to PRRSV was then determined after vaccination (Lelystad cluster strain) and natural infection by a heterologous field strain (Italian cluster, 84% ORF5 homology) and associated with the degree of cross-protection and reduction of disease. Besides immunological and clinical evaluations, also cytokine and hormonal activation were assessed. Compared to controls, vaccinated pigs (IM and ID groups) showed a reduction of the respiratory signs by 72% and 79% and of the overall clinical signs by 68% and 72%, respectively. Clinical protection was associated with a marked cell-mediated immune activation. The highest levels of PRRSV-specific IFN- γ secreting cells were associated with the increase of peripheral NK cells, γ/δ T lymphocytes and cytotoxic CD4-CD8^{high} T lymphocytes.

Clinical protection was demonstrated by the reduction of clinical signs in terms of incidence, duration and severity, and by a more efficient cell-mediated immune response. The early and prompt increase after PRRSV infection and the subsequent decrease to basal levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 and IFN- γ gene expression in PBMC, associated with temporally regulated endocrine changes (cortisol and GH) and lower IL-10 expression levels, sustain a more efficient responsiveness of peripheral innate immune cells in the early phase of infection and a more efficient control of inflammation in a later phase. Furthermore, the degree of clinical protection was not affected by the administration route. The results confirm that the ability of a PRRSV strain to induce a strong immune response is more important than the genetic similarity between vaccine and field strain in order to induce clinical protection.

INTRODUZIONE

Nella patogenesi dell'infezione da PRRSV, l'interazione tra il virus e le risposte infiammatorie e immunitarie del suino è complessa; l'immunità verso il virus è spesso solo parzialmente efficace in quanto l'attivazione subottimale o alterata dei meccanismi di difesa innati dovuta a meccanismi virali di evasione causa uno sviluppo ritardato dell'immunità adattativa e induce persistenza virale (Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004).

La risoluzione dell'infezione è invece dipendente da un'efficiente attivazione dei sistemi infiammatori ed innati-adattativi che coinvolgono citochine, volti a inibire la replicazione virale e il mantenimento di cellule infette.

Varie citochine pro-infiammatorie, quali IFN- α/β , IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1, e citochine immunomodulatrici, quali IFN- γ e IL-10, sono coinvolte nella risposta conseguente al riconoscimento virale cosicché una produzione di intensità e durata regolata può stimolare una risposta umorale e cellulare efficace, favorendo l'eliminazione virale (Scheerlinck and Yen, 2005; Thacker, 2005; Corradi et al., 2007). Nel suino, infatti, varie sottopopolazioni immunitarie sono responsabili della secrezione di queste citochine; in particolare, i livelli di cellule secernenti IFN- γ , citochina prodotta da cellule NK, linfociti T γ/δ , linfociti T citotossici, linfociti Th1 e cellule memoria, sono considerati un parametro informativo per il monitoraggio della reattività immunitaria a seguito di vaccinazione ed infezione (Meier et al., 2003, Zuckermann et al., 2007).

Nella valutazione della risposta immunitaria a PRRSV, un altro aspetto che recentemente sta rivestendo sempre maggior interesse è caratterizzato dal fatto che un maggior grado di protezione è stato osservato in condizioni di re-infezione da ceppi omologhi rispetto al ceppo di prima esposizione o rispetto al vaccino utilizzato, soprattutto per quanto riguarda vaccini vivi attenuati (MLV, modified live viruses), mentre esposizione a ceppi considerati eterologhi a livello genetico conferisce una protezione più variabile e generalmente meno intensa (Murtaugh et al., 2002). Il grado di protezione crociata sembra, infatti, essere influenzato dal grado di vicinanza genetica ma anche essere dipendente dalla possibile variabilità antigenica e da fattori non ancora conosciuti sia del virus che della genetica dell'ospite. Sembra comunque che la risposta sia fortemente influenzata dalla capacità di ciascun ceppo virale di stimolare e amplificare una risposta anticorpale neutralizzante ed una risposta cellulare efficace (Labarque et al., 2003, 2004; Diaz et al., 2006, Prieto et al., 2008). Scenari di persistenza virale in presenza di livelli anche elevati di anticorpi neutralizzanti o cellule secernenti IFN- γ o altri meccanismi immunitari testimonia come la immunopatogenesi del virus sia ancora solo parzialmente compresa.

È risaputo che, all'interno sia del prototipo europeo (EU) che americano (AM), esiste un'ampia variabilità genetica, tale da far identificare gruppi virali con caratteristiche conservate (clusters) e singoli isolati con caratteristiche peculiari tali da essere denominati varianti virali. Inoltre possono anche manifestarsi fenomeni di mutazione genica che fanno evolvere il ceppo virale nel tempo (Forsberg et al., 2002; Mateu et al., 2003; Stadejek et al., 2006, 2008).

Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione quando viene valutata la risposta immunitaria a PRRSV consistente nel fatto che, a differenza delle condizioni sperimentali, la valutazione in condizioni di campo può permettere di osservare l'insorgenza e l'evolversi della patologia (PRRS) in modo più esacerbato e quindi valutare in modo più informativo l'efficacia vaccinale in termini di prevenzione e/o riduzione della sintomatologia clinica (Halbur, 2003, Van Gucht et al., 2003; Martelli et al., 2007, 2009). Sempre maggiori evidenze, sia in campo umano che animale, hanno inoltre evidenziato che esiste un'intensa comunicazione bi-direzionale tra cellule responsabili delle risposte infiammatorie/immunitarie, citochine, e mediatori neuroendocrini; citochine e ormoni quali cortisolo, ormone della crescita (GH), IGF-1 e prolattina, possono infatti essere tra i principali responsabili del potenziamento delle risposte cellulari e umorali, sia locali che sistemiche (Borghetti et al., 2006a, 2006b, 2009).

Scopo del presente studio è stato la valutazione ed ottimizzazione di tecniche ed approcci di analisi per la determinazione qualitativa e quantitativa della risposta immunitaria e neuroendocrina in ambito di vaccinazione e infezione virale nel suino. Tali aspetti sono stati considerati in un modello di intensa stimolazione anti-virale, quale la vaccinazione per virus della malattia di Aujeszky (ADV), e nell'ambito di un'interazione virus-sistema immunitario più complessa, ossia a seguito di vaccinazione ed infezione naturale da PRRSV. Nel primo caso, è stata valutata la capacità di un vaccino somministrato per via intradermica (ID) con dispositivo senza ago di indurre una immunità comparabile con quella indotta dalla via intramuscolare (IM); nel secondo caso, dopo un confronto tra risposta a vaccinazione per ADV e PRRSV (cluster Lelystad), la risposta a PRRSV è stata valutata anche a seguito di esposizione a infezione da ceppo eterologo di PRRSV (cluster italiano) in condizioni di campo in modo da determinare l'efficacia vaccinale in termini di protezione clinica e attivazione/regolazione della risposta immunitaria umorale/cellulare e neuroendocrina.

MATERIALI E METODI

Animali e disegno sperimentale

- Vaccinazione per Virus della Malattia di Aujeszky (ADV)

Suini convenzionali di 60 giorni ($n = 30$) nati da scrofe vaccinate in un allevamento libero da Malattia di Aujeszky (AD) sono stati distribuiti in 3 gruppi: 1) suini vaccinati per via intramuscolare (IM, $n = 10$); 2) suini vaccinati per via intradermica (ID, $n = 10$) con dispositivo senza ago (IDAL[®]); 3) suini controllo non vaccinati (C, $n = 10$).

La vaccinazione è avvenuta a 60 e 88 giorni di età con vaccino costituito da virus vivo attenuato gE-/TK- ($10^{5.5}$ TCID₅₀ di Porcilis[®] Begonia – Merck AH) somministrato in adiuvante (Diluvac Forte[®], Merck AH; 2 ml per IM, 0.2 ml per ID); gli animali controllo sono stati inoculati con solo adiuvante.

La valutazione della stimolazione immunitaria indotta dal vaccino (anticorpi virus-neutralizzanti, cellule secernenti IFN- γ virus-specifiche, sottopopolazioni linfocitarie periferiche, espressione genica di IFN- γ in PBMC) è stata effettuata a 0, 2, 4, 5, 6, 7 settimane post-vaccinazione (PV)

- Vaccinazione per virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV)

Suini convenzionali di 28 giorni in un allevamento PRRSV-free, *Mycoplasma hyopneumoniae*-free sono stati suddivisi in 3 sottogruppi: 1) suini vaccinati per via intramuscolare (IM, $n = 10$); 2) suini vaccinati per via intradermica (ID, $n = 10$) con dispositivo senza ago (IDAL[®]); 3) suini di controllo non vaccinati (C, $n = 10$).

La vaccinazione è avvenuta a 35 giorni di età con vaccino vivo attenuato ($10^{4.5}$ TCID₅₀ di Porcilis[®] PRRS – Merck AH) somministrato in adiuvante (Diluvac Forte[®], Merck AH; 2 ml per IM, 0.2 ml per ID); gli animali controllo sono stati inoculati con solo adiuvante.

La valutazione della stimolazione immunitaria indotta dal vaccino in termini di livelli di cellule secernenti IFN- γ è stata valutata nell'intero gruppo in confronto alla stimolazione dopo vaccinazione per ADV (confronto gruppi IM+ID, $n = 20$) a 0, 14, 28 e 35 giorni PV.

La risposta in suini convenzionali sottoposti a stesso trattamento vaccinale (IM, ID) e non vaccinati (C) è stata valutata a 0, 7, 14, 28 e 45 giorni PV in termini di determinazione dei titoli virali, anticorpi anti-PRRSV totali, sottopopolazioni linfocitarie nel sangue e cellule secernenti IFN- γ PRRSV-specifiche.

- Infezione naturale da ceppo eterologo di PRRSV

A 45 giorni PV, il secondo gruppo di animali vaccinati e non vaccinati è stato messo a contatto con 30 suini con anamnesi positiva per infezione da PRRSV e conferma di infezione circolante al momento dell'esposizione in modo da indurre una infezione naturale. Durante il periodo post-esposizione (PE), campioni di sangue sono stati prelevati a 0 (45 giorni PV), 4, 7, 11, 14, 19, 21, 28, e 34 giorni PE. In questo periodo sono state effettuate le stesse indagini del periodo post-vaccinazione e sono stati valutati i livelli di citochine pro-infiammatorie/immunitarie e ormoni immunomodulatori (GH e cortisolo).

Sintomatologia clinica

Nel periodo PE (34 giorni), i suini sono stati monitorati giornalmente per la sintomatologia clinica generale e respiratoria in modo da definire uno score clinico generale (GCS) e uno score clinico respiratorio (RCS).

Il GCS ha incluso temperatura corporea, appetito e livello di coscienza/letargia. Il RCS

ha incluso la patologia respiratoria (tachipnea e dispnea; Samson et al., 2000), tosse e scolo nasale. Uno score clinico complessivo (OCS) è stato calcolato come GCS + RCS. L'efficacia vaccinale è stata determinata secondo Kirkwood e Stern (2003).

Quantificazione di PRRSV e anticorpi anti-ADV e anti-PRRSV

La identificazione di PRRSV è stata effettuata mediante PCR nel siero nel periodo PV e PE. Nel periodo PE, i livelli virali sono stati valutati mediante titolazione su macrofagi alveolari (PAM) secondo Van Reeth et al. (1996) e Labarque et al. (2000). PRRSV isolato da siero e polmoni dei suini manifestanti la patologia nel sito ricevente e nei suini sperimentali nel periodo PE è stato sottoposto a sequenziamento della ORF5 secondo Oleksiewicz et al. (1998).

La identificazione e titolazione (S/P) degli anticorpi anti-ADV e anti-PRRSV è stata effettuata mediante kit ELISA (HerdChek® anti-PRVg1 (gE) e HerdChek® PRRS Antibody Test Kit – IDEXX).

Test di virus neutralizzazione (VNT) per ADV

Il test di virus neutralizzazione per ADV è stato effettuato utilizzando diluizioni seriali (1:2) di siero e sospensione virale (5×10^3 TCID₅₀/ml). Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, sono state aggiunte cellule VERO e la comparsa dell'effetto citopatico è stata valutata per almeno 4 giorni. I titoli anticorpali sono stati espressi come log₂ del reciproco della più alta diluizione alla quale il virus è stato neutralizzato (100% end-point).

Immunofenotipizzazione e quantificazione delle sottopopolazioni linfocitarie

La caratterizzazione e quantificazione delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico dopo vaccinazione per ADV e dopo vaccinazione per PRRSV (periodo PV) e infezione naturale (periodo PE) è stata effettuata secondo Borghetti et al. (2006). I campioni cellulari sono stati sottoposti a singola o doppia marcatura di superficie per 15 minuti al buio con anticorpi monoclonali ad opportuna concentrazione e successiva eliminazione della componente eritrocitaria mediante lisi per 15 minuti con soluzione NH₄Cl (pH 7.2). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mouse anti-pig-CD3ε-PE (clone PPT3), mouse anti-pig-CD4α-PE (clone 74-12-4), mouse anti-pig-CD8α-FITC (clone 76-2-11 - Southern Biotech), mouse anti-pig-CD8β (clone PG164A), mouse anti-pig-TCRγ/δ (linea PGBL22A - VMRD), goat F(ab')₂ anti-mouse IgG-FITC (Dako Cytomation), mouse anti-pig-CD16-FITC (clone G7), mouse anti-pig-CD25 (clone 3B2 - Serotec). I campioni sono stati analizzati mediante citofluorimetro Epics® XL-MCL flow cytometer (Beckman-Coulter).

Livelli di cellule secernenti IFN-γ virus-specifiche

La frequenza di cellule secernenti (CS) IFN-γ ADV-specifiche e PRRSV-specifiche è stata quantificata mediante tecnica ELISPOT nelle PBMC secondo Meier et al. (2003) con minori modifiche. Le PBMC sono state isolate in gradiente di densità con Histopaque-1077® e seminate in RPMI-1640+10%FBS (2×10^6 cellule/ml) in piastre MultiScreen®_{HTS}-IP (MSIPS4510 - Millipore) rivestite O/N a 4°C con anticorpo anti-pig-IFN-γ (clone P2G10 – BD) e bloccate con RPMI-1640. La stimolazione antigenica *ex vivo* è stata effettuata per 20 ore, 37°C, 5% CO₂, con ADV (ceppo Begonia) o PRRSV (ceppo DV) utilizzati per la vaccinazione *in vivo*. Le prove di ottimizzazione della tecnica hanno previsto una titolazione in un intervallo di concentrazione compresa tra 0.1 e 1 MOI, mentre la valutazione temporale è stata effettuata con 0.5 MOI di ADV e 0.5-1 MOI di PRRSV. Dopo rimozione delle PBMC, le piastre sono state incubate per 1 ora a 37°C

con anticorpo anti-IFN- γ biotilato (clone P2C11 – BD) e quindi con anticorpo anti-biotina AP-coniugato (SP3020 – Vector Labs) in PBS+0.5%BSA. La rivelazione è stata effettuata con 1/100 BCIP/NBT per 7 minuti al buio. La frequenza di cellule secernenti IFN- γ è stata quantificata con lettore ELISPOT AID® e rapportata a 10⁶ PBMC.

La responsività cellulare a ADV e PRRSV è stata anche valutata mediante l'identificazione di “categorie di responsività” sulla base delle risposte osservate e secondo Xiao et al. (2004). La risposta a PRRSV è stata inoltre quantificata come animali “responsivi” e “non responsivi” dopo definizione di un valore ottimale di cut-off di 30 CS IFN- γ /10⁶ PBMC.

Quantificazione dell'espressione genica di citochine

I livelli di espressione genica di IFN- γ nelle PBMC dopo vaccinazione per ADV sono stati determinati mediante PCR quantitativa. I livelli delle citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1) ed immunitarie (IFN- γ , IL-10) nelle PBMC dopo vaccinazione e infezione naturale da PRRSV sono stati determinati mediante PCR.

In entrambi i casi, dopo isolamento delle PBMC con Histopaque-1077®, l'RNA totale è stato estratto mediante TRI-Reagent e la concentrazione determinata con spettrofotometro (GeneQuant pro^a, Amersham). L'RNA è stato retrotrascritto con kit Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (Amersham) e primer oligo dT (Ambion).

La PCR real-time per IFN- γ è stata effettuata usando termociclatore Rotor-Gene 3000™ (Corbett Research) con Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG e specifici primer (0.5 μ M). Il profilo termico ha previsto uno step a 50°C per 2 min., a 95°C per 2 min. e quindi 45 cicli di amplificazione (95°C 15 sec., 58°C 30 sec., 72°C 30 sec.).

I risultati sono stati analizzati con metodo della curva standard relativa (Bustin, 2000) utilizzando il gene GAPDH come riferimento (Fisher et al., 2006). La PCR per le citochine pro-infiammatorie/immunitarie è stata effettuata per 27 cicli (94°C 1 min., T_a primer 1 min., 72°C 1 min.). I prodotti di amplificazione sono stati valutati su gel di agarosio con SYBR® Safe (Invitrogen) ed analizzati con programma Scion Image. Il gene per l'RNA ribosomiale 18S è stato utilizzato come standard interno per la normalizzazione.

Livelli di GH e cortisolo

I livelli plasmatici di GH e cortisolo sono stati quantificati mediante ELISA (Baratta et al., 2002) e RIA (Tamanini et al., 1983), rispettivamente. L'ELISA ha previsto un'incubazione dei campioni e standard con anticorpo anti-pig-GH (1/300,000) per 48 ore a 4°C. È stato quindi aggiunto anticorpo anti-pig-GH biotilato per 2 ore a 4°C e poi extravidina POD-coniugata (1/2,000) per 1 ora. La reazione è stata rivelata dopo incubazione per 25 min. con ABTS/H₂O₂ mediante lettura dell'assorbanza a 405 nm (Spectra Shell Microplate Reader). Il RIA ha previsto l'utilizzo di cortisolo H₃-marcato e anticorpo anti-pig-cortisolo. La lettura è stata effettuata con lettore per radiazioni beta.

Analisi statistica

Vaccinazione per ADV. I dati sono stati sottoposti a analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute utilizzando un modello lineare misto. I valori pre-vaccinazione sono stati inclusi come covariata. Le correlazioni tra i parametri sono state valutate con coefficiente di Pearson. Il livello di significatività è stato definito per p<0.05. L'analisi è stata effettuata mediante programma SAS (v. 9.1).

Vaccinazione-infezione naturale da PRRSV. L'analisi di confronto dei gruppi sperimentali in relazione alla stintomatologia clinica (GCS e RCS) è stata effettuata con test del χ^2 e test di Dunnett. L'efficacia vaccinale è stata quantificata come proporzione di casi di patologia prevenuti e rischio di malattia tra suini vaccinati e non vaccinati esposti a infezione naturale (Kirkwood and Sterne, 2003).

La ANOVA è stata usata per valutare differenze nei titoli virali e per i cambiamenti temporali delle cellule secernenti IFN- γ in ELISPOT. L'analisi dopo definizione di cut-off ottimale (30 CS IFN- γ /10⁶ PBMC), con relativi valori di specificità (Sp) e sensibilità (Se), identificato mediante curve ROC, ha previsto la valutazione di dati binari (positivo-negativo) con test di Fisher.

Il confronto tra gruppi e nel tempo per i livelli di citochine ed ormoni è stato effettuato con ANOVA e test di Dunnett. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi. L'analisi è stata effettuata con programma SPSS (v.14.0)

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vaccinazione per ADV e confronto con vaccinazione per PRRSV

Il presente lavoro ha previsto lo sviluppo e ottimizzazione di tecniche immunologiche per la determinazione della reattività e modulazione di cellule e mediatori immunitari al fine di sfruttare tali approcci e parametri per lo studio di aspetti immunologici e virologici, oltre che clinici, alla base della efficacia vaccinale e protezione crociata a seguito di infezione da ceppo eterologo di PRRSV rispetto al ceppo utilizzato come vaccino.

A tal fine sono state dapprima indagate tecniche immunologiche per la valutazione della risposta immunitaria in un classico modello di intensa stimolazione anti-virale quale la vaccinazione per ADV in quanto noto essere caratterizzato da una intensa risposta Th1 (Gerdt, 1997; van Rooij et al., 2004). Inoltre è stata anche valutata la capacità di un sistema di somministrazione vaccinale intradermica (ID) senza ago in confronto alla convenzionale via intramuscolare (IM) in quanto potenzialmente in grado di indurre una stimolazione locale e sistemica più intensa (Mikulska-Skupien et al., 2005; Zhao et al., 2006; Goubier et al., 2008). A fianco della risposta umorale come anticorpi totali virus-specifici e neutralizzanti, particolare enfasi è stata indirizzata alla attivazione cellulare, spesso responsabile della completa eliminazione del patogeno e delle cellule infette (Meier et al., 2003; Mateu et al., 2003; Mateu and Diaz, 2008).

Lo studio relativo alla vaccinazione per ADV ha mostrato che parallelamente all'incremento dei livelli di anticorpi anti-ADV neutralizzanti, è stata indotta e sostenuta una intensa risposta cellulo-mediata come frequenza di cellule secernenti IFN- γ virus-specifiche dopo entrambe le somministrazioni vaccinali (Fig. 1). La risposta cellulare in ELISPOT è stata valutata anche mediante l'identificazione di "categorie di responsività" per evidenziare possibili distribuzioni all'interno di una stessa tendenza. Dopo vaccinazione per ADV, la stimolazione *ex vivo* ha evidenziato animali altamente responsivi per tutto il periodo di indagine (4 categorie: 100-300, 305-600, 605-1000, 1005-2000 CS IFN- γ /10⁶ PBMC) ed i profili medi e la distribuzione in classi tra gruppi IM e ID a ciascun tempo è risultata sovrapponibile (Fig. 2).

È stata anche valutata la "produttività di IFN- γ per cellula" che fornisce informazioni sull'attività secretiva della popolazione cellulare. Il mantenimento di un'elevata secrezione di IFN- γ nel tempo, caratterizzata da spot di grandi dimensioni, testimonia una intensa e duratura capacità di rispondere al richiamo antigenico virale, probabilmente dovuta ad un'ottimale risposta primaria e ad una risposta di cellule T memoria (Fig. 2).

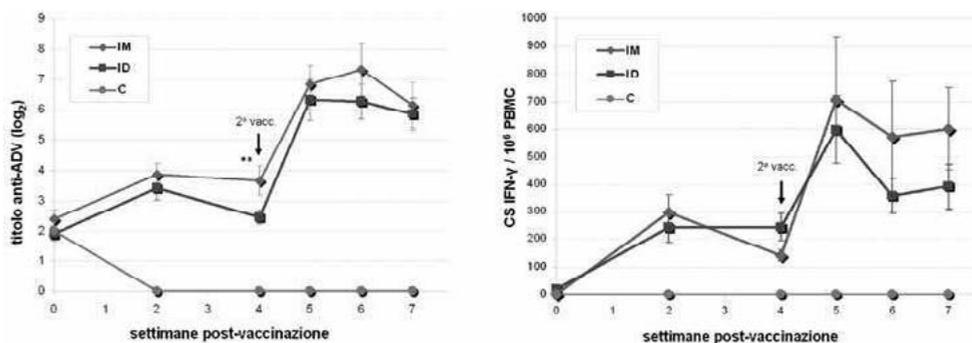


Fig. 1: Risposta umorale (anticorpi anti-ADV neutralizzanti) e risposta cellulo-mediata (cellule secernenti IFN- γ ADV-specifiche) in suini vaccinati per via intramuscolare, intradermica senza ago e in suini controllo.

Fig. 1: Humoral (anti-ADV neutralizing antibodies) and cell-mediated (ADV-specific IFN- γ secreting cells) immune response in pigs IM- and needle-less ID-vaccinated and in control pigs.

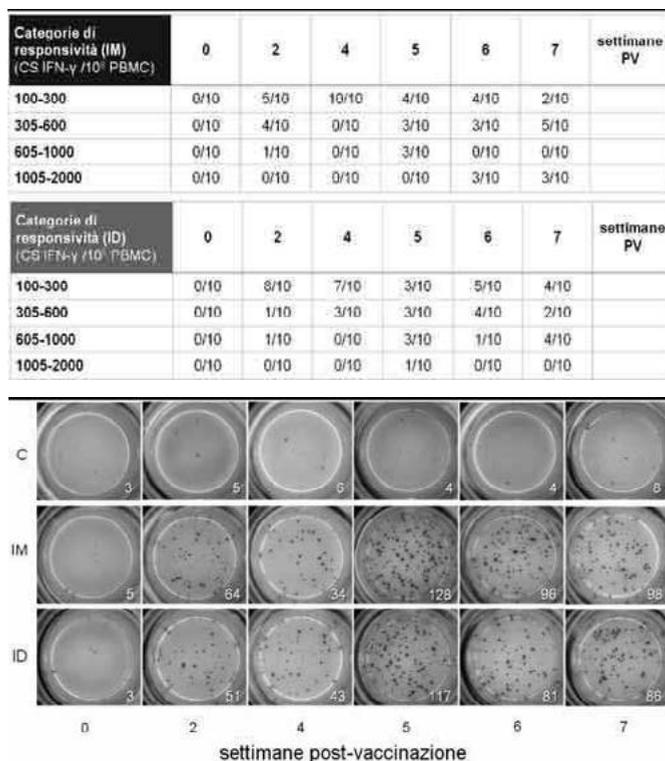


Fig. 2: Categorie di responsività di IFN- γ e produttività per cellula in suini vaccinati IM e ID per ADV.

Fig. 2: IFN- γ responsiveness categories and IFN- γ per cell productivity in pigs IM- and ID-vaccinated against ADV.

Il confronto tra la stimolazione *ex vivo* con ADV e PRRSV ha confermato questa osservazione. ADV induce una elevata produzione di IFN- γ per singola cellula (spot grandi) mentre PRRSV ne induce una quantità più ridotta (spot più piccoli); inoltre la risposta ai due virus ha mostrato andamenti contrari, suggerendo la prevalenza dell'effetto citopatico di ADV all'aumentare della concentrazione virale (Fig. 3).

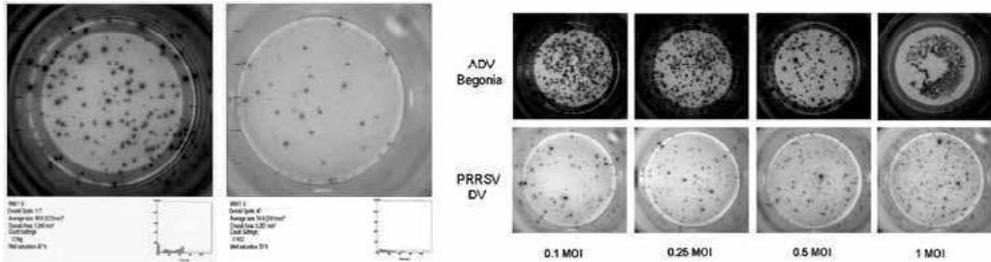


Fig. 3: Confronto tra la produttività di IFN- γ per cellula a seguito di ri-stimolazione *ex vivo* con ADV e PRRSV.

Fig. 3: Comparison between the IFN- γ per cell productivity upon *ex vivo* re-stimulation with ADV and PRRSV.

La risposta post-vaccinale delle cellule secernenti IFN- γ specifiche per ADV e PRRSV ha evidenziato come PRRSV stimoli livelli di cellule secernenti IFN- γ inferiori. Questo fornisce l'indicazione di una minor stimolazione *in vivo* della risposta cellulare per PRRSV, caratterizzata da una maggior frazione di cellule a bassa secrezione di IFN- γ , probabilmente costituita anche da cellule a reattività innata (cellule NK e linfociti T γ/δ) o cellule T scarsamente attivate (Fig. 4). L'ELISPOT si è comunque dimostrato una tecnica altamente sensibile e robusta sia a seguito di intensa (ADV) che debole (PRRSV) re-stimolazione *ex vivo*.

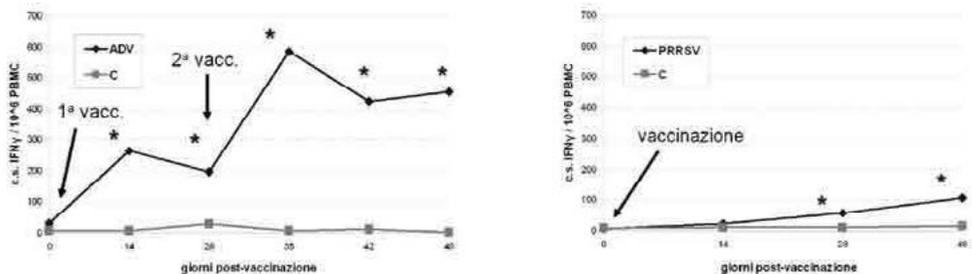


Fig. 4: Confronto tra i livelli di cellule secernenti IFN- γ virus-specifiche a seguito di vaccinazione per ADV e PRRSV.

Fig. 4: Comparison of the levels of virus-specific IFN- γ secreting cells after vaccination against ADV and PRRSV.

Questo è apparso particolarmente evidente quando la risposta a PRRSV è stata analizzata come classi di responsività negli animali vaccinati (IM e ID) considerati come unico

gruppo. Dopo vaccinazione per PRRSV, si sono rilevati ridotte frequenze di CS IFN- γ , tali che vari animali sono stati classificati come a responsività assente-scarso (0-30 CS IFN- γ). La maggior parte degli animali è risultata con responsività inferiore a 100 CS IFN- γ (tre categorie: 0-30, 35-50, 55-100 CS), mentre solo un ristretto numero ha mostrato valori più elevati (Tab. 1).

CATEGORIE (0.5 MOI) ADV								CATEGORIE (0.5 MOI) PRRSV					
giorni PV	0	14	28	35	42	49	giorni PV	0	14	28	49		
100-300	0/20	14/20	17/20	8/20	11/20	8/20	0-30 (scarsa-assente)	20/20	14/20	6/20	4/20		
305-600	0/20	4/20	3/20	6/20	6/20	6/20	35-50 (bassa)	0/20	4/20	4/20	0/20		
605-1000	0/20	2/20	0/20	3/20	1/20	4/20	55-100 (intermedia)	0/20	1/20	7/20	9/20		
1005-2000	0/20	0/20	0/20	3/20	2/20	2/20	>105 (alta)	0/20	1/20	3/20	7/20		

Tab. 1: Categorie di responsività di IFN- γ in suini vaccinati per ADV e PRRSV (gruppo unico IM + ID).

Tab. 1: IFN- γ responsiveness categories in pigs vaccinated against ADV and PRRSV (whole group IM + ID).

Tale analisi può dimostrarsi particolarmente informativa quando risposte alquanto ridotte sfavoriscono la possibilità di evidenziare una differente reattività cellulare. La risposta è stata valutata negli animali vaccinati considerati come unico gruppo in quanto le risposte a seguito di vaccinazione IM e ID sono apparse comparabili, soprattutto per ADV. È apparso inoltre evidente che la risposta alla vaccinazione per PRRSV è fortemente variabile.

L'analisi citofluorimetrica dopo vaccinazione per ADV ha permesso di identificare e monitorare varie sottopopolazioni linfocitarie, con particolare attenzione alle cellule citotossiche (CD8+) e cellule attivate (CD25+). Differenze sono state infatti riscontrate nei livelli delle cellule NK (CD3-CD8 α + e CD16) e dei linfociti T citotossici (CD8 β +) tra animali vaccinati e non vaccinati sia dopo prima che seconda somministrazione (Fig. 5, 6a, 6b).

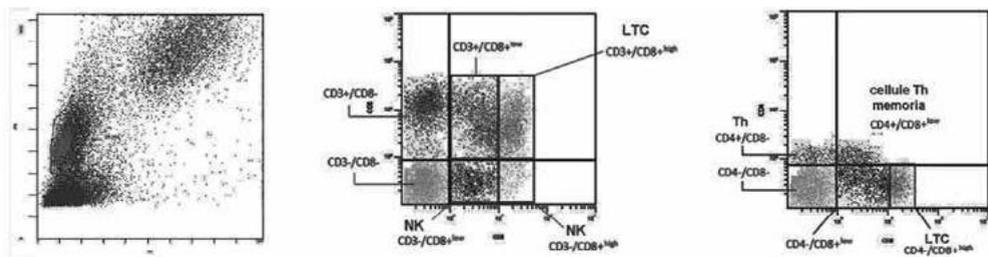


Fig. 5: Identificazione mediante citofluorimetria a flusso delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico.

Fig. 5: Identification of the lymphocyte subsets in the peripheral blood by using flow cytometry.

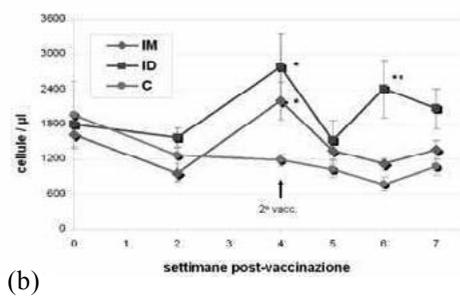
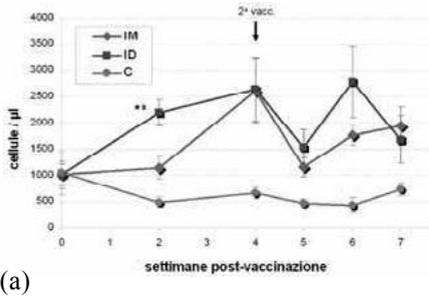


Fig. 6: Livelli di cellule NK CD3-CD8+ (a) e linfociti T citotossici CD8β+ (b) periferici in suini vaccinati e non vaccinati per ADV.
Fig. 6: Levels of peripheral NK cells CD3-CD8+ (a) and cytotoxic T lymphocytes CD8β+ (b) in ADV-vaccinated and unvaccinated pigs.

L'aumento transitorio di cellule CD4-CD25+ negli animali vaccinati rispetto agli animali controllo (Fig. 7a) insieme all'incremento delle cellule CD8β+ suggerisce uno stato di attivazione di quest'ultime cellule citotossiche mentre l'incremento transitorio delle cellule CD4+CD25+ (T_{reg}) dopo il richiamo vaccinale sostiene una regolazione positiva dell'attivazione immunitaria (Fig. 7b). La frazione di cellule memoria T helper CD4+CD8+ non ha subito variazioni significative negli animali vaccinati (dati non mostrati); questo risultato può essere stato influenzato dalla maggiore variabilità e dai più ridotti livelli di tale sottopopolazione.

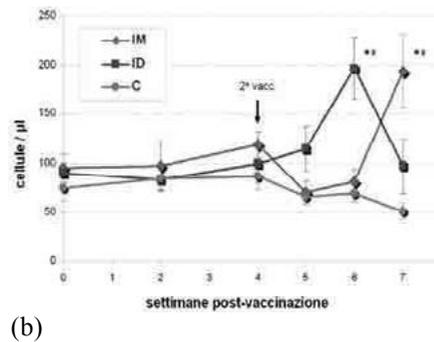
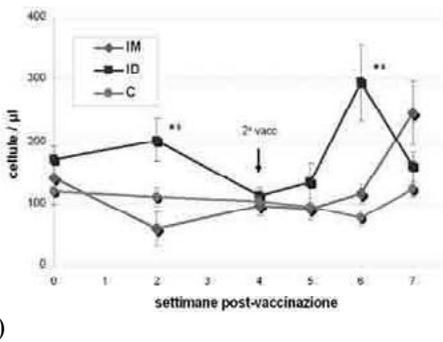


Fig. 7: Livelli di cellule attivate CD4-CD25+ (a) e linfociti T regolatori CD4+CD25+ (b) periferici in suini vaccinati e non vaccinati per ADV.
Fig. 7: Levels of peripheral activated CD4-CD25+ (a) and CD4+CD25+ regulatory (b) T lymphocytes in ADV-vaccinated and unvaccinated pigs.

I profili citofluorimetrici hanno fornito informazioni funzionali sulla ripartizione delle cellule immunitarie coinvolte nella risposta anti-virale nonostante le sottopopolazioni responsabili della secrezione di IFN-γ non siano risultate modulate come i livelli di cellule secernenti IFN-γ osservate in ELISPOT. L'espressione genica di IFN-γ nelle PBMC ha mostrato uno stato di attivazione negli animali vaccinati IM e ID rispetto agli animali controllo (Fig. 8).

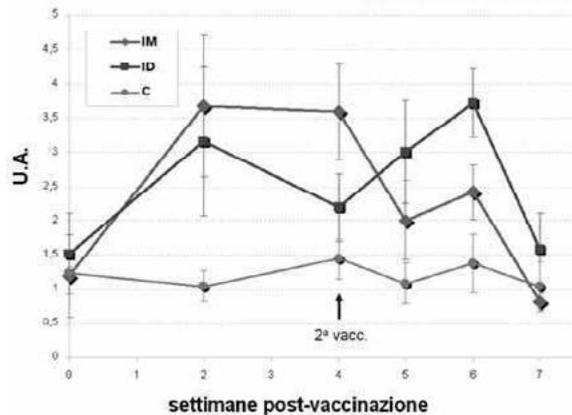


Fig. 8: Livelli di espressione genica di IFN- γ nelle PBMC di suini vaccinati contro ADV per via IM e ID e in suini non vaccinati.

Fig. 8: Levels of IFN- γ gene expression in PBMC of pigs IM- and ID-vaccinated against ADV and in unvaccinated pigs.

Vaccinazione per PRRSV e infezione naturale da ceppo eterologo

Lo studio è stato finalizzato alla valutazione della efficacia della vaccinazione per PRRSV, somministrata per via IM e ID in animali successivamente esposti a infezione naturale da ceppo eterologo rispetto al vaccino, in termini di grado di protezione crociata e riduzione della patologia (PRRS) in relazione a modificazioni immunologiche e neuroendocrine. Le condizioni di campo, e quindi l'esposizione naturale, hanno permesso di riprodurre la patologia con sintomatologia clinica evidente e quindi registrare i sintomi e valutare la protezione clinica indotta dal vaccino in modo ottimale. I suini vaccinati hanno mostrato una significativa riduzione sia della sintomatologia generale (GCS) che respiratoria (RCS) dopo infezione, tale che lo score complessivo (OCS) legato alla protezione clinica ha evidenziato una efficacia vaccinale di circa il 70% (Fig. 9). Tale risultato conferma che la similarità genetica tra ceppi di PRRSV non è un buon indicatore del grado di protezione immunitaria (Prieto et al., 2008), considerando ceppo vaccinale e isolato responsabile dell'infezione.

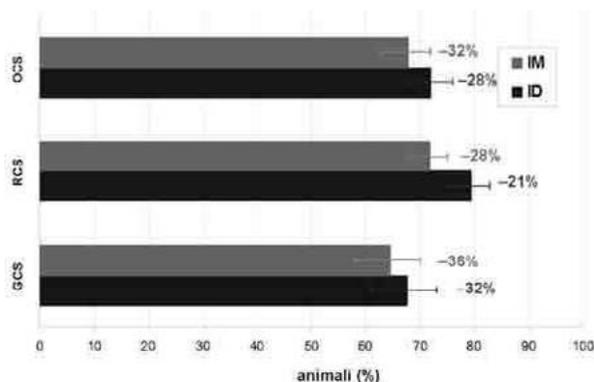


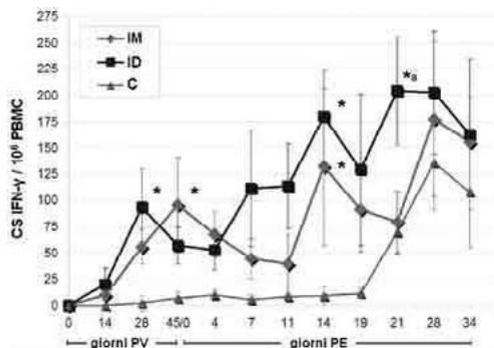
Fig. 9: Efficacia vaccinale in termini di riduzione della sintomatologia clinica come score clinico generale (GCS), respiratorio (RCS) e complessivo (OCS).

Fig. 9: Vaccine efficacy in terms of reduction of clinical signs as general clinical score (GCS), respiratory clinical score (RCS) and overall clinical score (OCS).

Seppur si siano evidenziate differenze significative tra numero di animali PRRSV-positivi solo dopo 28-34 giorni PE e non si siano osservate differenze nei livelli di viremia tra animali vaccinati e non vaccinati esposti, la reattività umorale e cellulo-mediata ha fornito profili differenti tra i gruppi.

Una rapida risposta anticorpale (S/P) anamnestica è stata osservata dopo esposizione negli animali vaccinati e i livelli di CS IFN- γ PRRSV-specifiche stimolati dalla vaccinazione sono aumentati di 2-3 volte a seguito dell'esposizione/infezione eterologa (Fig. 10a). La risposta delle CS IFN- γ è stata valutata, oltre che come frequenza nelle PBMC, anche come categorie di responsività: questa tipologia di analisi ha evidenziato la comparsa di una risposta significativa dopo vaccinazione in entrambi i gruppi IM e ID, sebbene i livelli siano stati relativamente bassi. Una variabilità elevata di risposta è stata osservata sia dopo vaccinazione che dopo esposizione/infezione; questo testimonia che il riconoscimento virale e l'attivazione immunitaria sono complessi e vari fattori possono influenzarli.

Questo aspetto è confermato dalla reattività post-esposizione negli animali non vaccinati, aumentata solo dopo circa 3 settimane dall'esposizione. L'analisi in categorie ha evidenziato che, come dopo vaccinazione, nelle prime 2-3 settimane PE la risposta negli animali vaccinati si è distribuita in 3 classi (0-30, 35-50, 55-100 CS IFN- γ), anche includendo animali a scarsa-assente o bassa responsività, mentre risposte molto più intense sono state osservate nelle ultime 2 settimane PE (Fig. 10b).



	IM	ID	C
Giorni POST-VACCINAZIONE			
0	0/10	0/10	0/10
14	3/10	4/10	0/10
28	8/10*	9/10*	0/10
45 = 0 PE	9/10*	7/10*	0/10
Giorni POST-ESPOSIZIONE			
4	7/10	7/10	3/10
7	6/10*	7/10*	0/10
11	3/10	9/10*	2/10
14	9/10*	10/10*	2/10
19	5/10*	8/10*	5/10
21	7/10	10/10	7/10
28	7/10	9/10	9/9
34	7/9	7/10	5/8

a)

c)

Categorie di responsività (ID) (CS IFN- γ /10 ⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (scarsa-assente)	3/10	3/10	1/10	0/10	4/10	0/10	1/10	3/10	
35-50 (bassa)	3/10	2/10	2/10	2/10	2/10	1/10	0/10	1/10	
55-100 (intermedia)	2/10	4/10	4/10	3/10	0/10	1/10	0/10	2/10	
>105 (alta)	2/10	1/10	3/10	5/10	4/10	8/10	9/10	4/10	

Categorie di responsività (IM) (CS IFN- γ /10 ⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (scarsa-assente)	3/10	4/10	7/10	1/10	5/10	3/10	3/10	2/9	
35-50 (bassa)	2/10	2/10	0/10	3/10	0/10	1/10	0/10	0/9	
55-100 (intermedia)	3/10	3/10	1/10	3/10	2/10	2/10	3/10	2/9	
>105 (alta)	2/10	1/10	2/10	3/10	3/10	4/10	4/10	5/9	

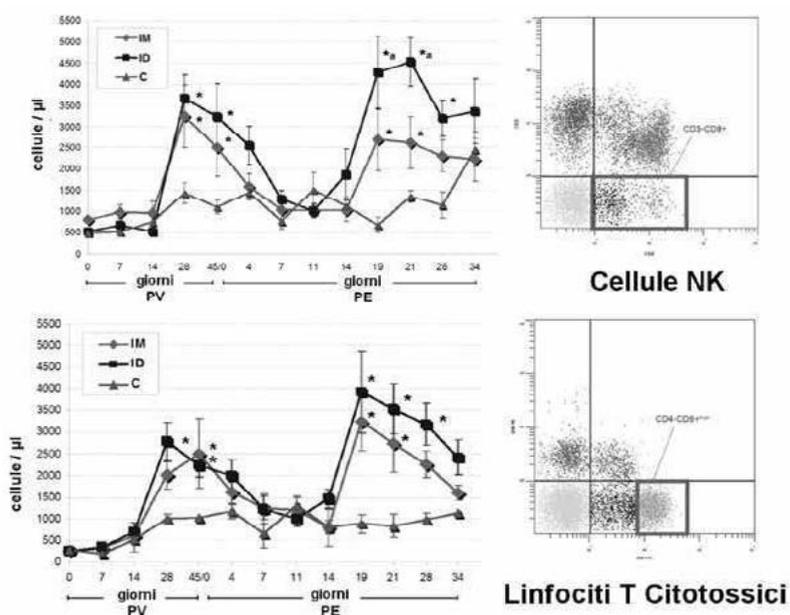
Categorie di responsività (C) (CS IFN- γ /10 ⁶ PBMC)	4	7	11	14	19	21	28	34	giorni PE
0-30 (scarsa-assente)	7/10	10/10	8/10	8/10	10/10	3/10	0/9	3/8	
35-50 (bassa)	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/9	0/8	
55-100 (intermedia)	0/10	0/10	2/10	2/10	0/10	4/10	3/9	2/8	
>105 (alta)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	5/9	3/8	

b)

Fig. 10: Risposta di cellule secernenti (CS) IFN- γ PRRSV-specifiche in suini vaccinati e non vaccinati esposti a infezione da ceppo eterologo. Analisi a) come frequenze, b) mediante identificazione di “categorie di responsività” e c) dopo definizione di un valore ottimale di cut-off (30 CS IFN- γ /10⁶ PBMC).

Fig. 10: PRRSV-specific IFN- γ secreting cell (SC) response in vaccinated and unvaccinated pigs exposed to infection by a heterologous isolate. Analysis a) as frequencies, b) by identification of “responsiveness categories” and c) upon definition of an optimal cut-off value (30 SC IFN- γ /10⁶ PBMC).

Data l'elevata sensibilità della tecnica ELISPOT, anche risposte molto ridotte sono state evidenziate (categoria a scarsa-assente responsività: 0-30 CS IFN- γ /10⁶ PBMC); l'effettiva efficacia *in vivo* di reattività ridotte può essere questionabile. Per questo, l'analisi della risposta celluloso-mediata è stata affrontata anche determinando un cut-off ottimale, risultato uguale a 30 CS (Sp: 98%, Se: 64%), sulla base del quale i suini sono stati suddivisi in animali “responsivi” e “non responsivi”. Con tale analisi, differenze significative di risposta in animali vaccinati sono state osservate già a 14 giorni PV e 7 giorni PE rispetto ai suini controllo, per cui la definizione di un cut-off si è dimostrata efficace per distinguere risposte differenti a seconda del trattamento. Le risposte tra animali vaccinati e controllo sono risultate sovrapponibili anche con questo approccio da 21 giorni PE (Fig. 10c).



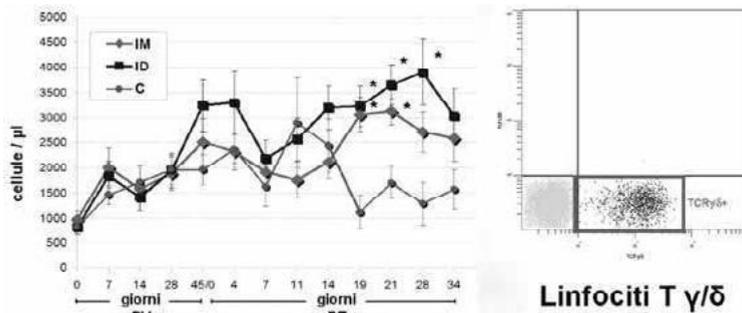


Fig. 11: Livelli di cellule citotossiche nel sangue di suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.

Fig. 11: Levels of cytotoxic cells in the blood of pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.

I profili delle CS IFN- γ sono risultati associati sia dopo vaccinazione che infezione a incrementi significativi delle sottopopolazioni responsabili della sua secrezione quali cellule NK (CD3-CD8 α +), linfociti T citotossici (CD4-CD8 α +^{high}) e linfociti T γ/δ (TCR γ/δ +)(Fig. 11).

La valutazione della reattività cellulare mediante ELISPOT e citofluorimetria ha permesso di evidenziare il coinvolgimento dell'immunità cellulare innata e adattativa nella protezione crociata tra ceppo vaccinale e ceppo di campo. La sintomatologia clinica è risultata fortemente associata alla risposta cellulo-mediata, sia come CS IFN- γ che come sottopopolazioni linfocitarie nel sangue.

Riguardo alla risposta citochinica nelle PBMC come espressione genica, si è osservata una reattività precoce pro-infiammatoria legata a incrementi dei livelli di IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1 sia negli animali IM che ID esposti a infezione; questo testimonia un efficiente riconoscimento e una maggior efficienza della risposta infiammatoria e immunitaria innata. I livelli di IFN- γ confermano, insieme ai profili ELIPOT, che i suini vaccinati hanno reagito all'infezione con un aumento dell'espressione e secrezione della citochine immunitaria, mantenendo la reattività a seguito di ri-stimolazione virale (Fig. 12).

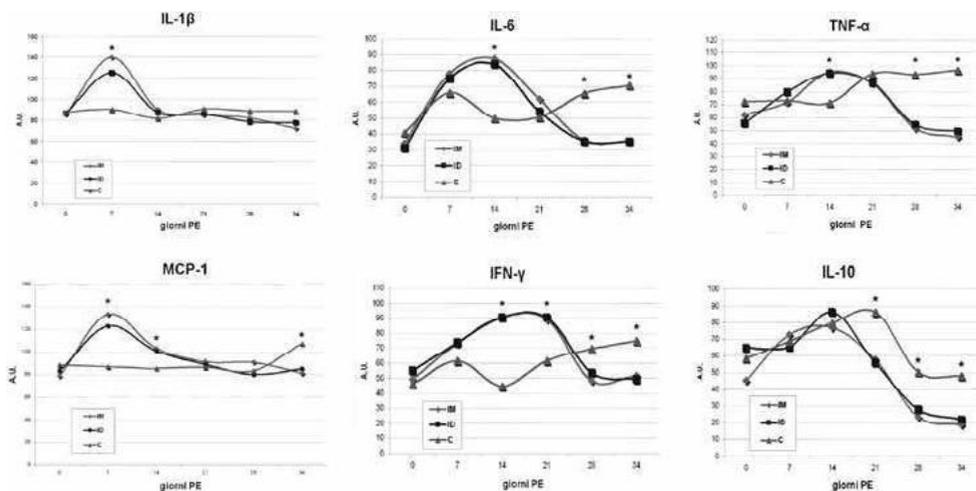


Fig. 12: Livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie e immuni in PBMC di suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.

Fig. 12: Levels of pro-inflammatory and immune cytokine gene expression in PBMC of pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.

Considerando i livelli ormonali, i livelli plasmatici di GH sono stati positivamente modulati negli animali vaccinati nelle prime due settimane PE, mostrando quindi una regolazione a sostegno della risposta infiammatoria immunitaria innata (Fig. 13). Il mantenimento di livelli superiori di IL-10 negli animali non vaccinati-esposti/infetti a tempi più tardivi si è associato ad una reattività ritardata (IL-6, TNF- α , MCP-1, IFN- γ) o assente (IL-1 β). Livelli superiori di citochine pro-infiammatorie e IL-10 nella fase più avanzata dell'infezione (dopo circa 1 mese) possono essere interpretati come uno stato non controllato di infiammazione, controilanciato dall'azione della IL-10, associato alla patologia (Fig. 12).

I livelli di cortisolo si sono modificati in senso negativo nelle prime due settimane PE solo nei suini non vaccinati sottoposti a infezione in parallelo all'assenza di variazioni significative di GH e reazione infiammatoria precoce. Questa deregolazione neuroendocrina si è associata a sintomatologia (GSC e RSC) più grave e 100% di viremia durante le ultime 2 settimane PE (Fig. 13).

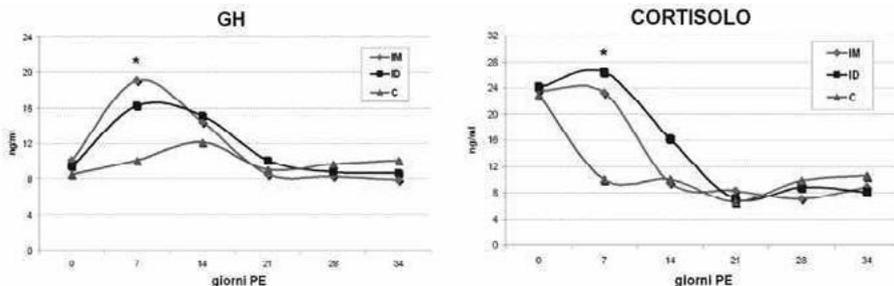


Fig. 13: Livelli plasmatici di ormone della crescita (GH) e cortisolo in suini vaccinati IM e ID per PRRSV e in animali non vaccinati dopo esposizione a infezione naturale a ceppo eterologo.

Fig. 13: Plasmatic levels of growth hormone (GH) and cortisol in pigs IM- and ID-vaccinated against PRRSV and in unvaccinated pigs after exposure to natural infection by a heterologous isolate.

CONCLUSIONI

Lo studio relativo alla vaccinazione per ADV ha dimostrato che la doppia somministrazione del vaccino per via intradermica (ID) con dispositivo senza ago (IDAL®) è in grado di stimolare una risposta immunitaria comparabile a quella stimolata mediante somministrazione intramuscolare (IM) in termini di immunità umorale (anticorpi virus-neutralizzanti) e cellulo-mediata (cellule secernenti IFN- γ virus-specifiche).

La vaccinazione ID è apparsa in grado di stimolare una modulazione immunitaria più intesa

e regolata caratterizzata da un incremento più precoce di cellule citotossiche attivate e un più precoce coinvolgimento auto-limitato di linfociti T regolatori.

Lo studio relativo alla vaccinazione per PRRSV e alla infezione naturale sostenuta da ceppo eterologo ha dimostrato che una protezione clinica crociata elevata, sebbene non totale, è stata indotta nei suini vaccinati con virus vaccinale vivo attenuato e che l'efficacia vaccinale è associata a una risposta cellulo-mediata efficiente, in grado inoltre di svolgere un ruolo nella riduzione della gravità della patologia.

La protezione clinica è apparsa associata ad una risposta precoce e regolata di citochine pro-infiammatorie e immunitarie. Al contrario, negli animali non vaccinati, la gravità della patologia e l'infezione sono risultate associate a una risposta cellulare e citochinica assente o ritardata.

Lo studio conferma che la capacità di un ceppo di PRRSV di indurre una risposta immunitaria intensa riveste un ruolo più importante della omologia genetica tra ceppo vaccinale e infettante al fine della protezione clinica.

La somministrazione del vaccino per via intradermica con dispositivo senza ago si è mostrata efficiente quanto la via intramuscolare, oltre che in condizioni sperimentali (Martelli et al., 2007), anche in condizioni di campo, aspetto importante nello sviluppo di applicazioni senza ago per la salute e benessere animale.

References

Baratta M., Saleri R., Mainardi G.L., Valle D., Giustina A., Tamanini C., 2002. Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinol.* 143, 551-557.

Borghetti P., De Angelis E., Saleri R., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Mocchegiani E., Martelli P., 2006a. Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 17-25.

Borghetti P., Ferrari L., Cavalli V., De Angelis E., Saleri R., Corradi A., Martelli P., 2006b. Effect of weaning and vaccinations on immune and hormonal parameters in neonatal piglets. *Vet. Res. Comm.* 30, 227-230.

Borghetti P., Saleri R., Mocchegiani E., Corradi A., Martelli P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 141-162.

Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.

Corradi A., Ferrari L., Borghetti P., 2007. Parameters for evaluating the cell-mediated immune response during viral infection: diagnostic and prognostic applications. *Vet. Res. Comm.* 31, 103-107.

Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E., 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virol.* 351, 249-259.

Fisher T., Buttner M., Rziha H.J., 2006. T helper 1-type cytokine transcription in

peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization. *Immunol.* 101, 378-387.

Forsberg R., Storgaard T., Nielsen H.S., Oleksiewicz M.B., Cordioli P., Sala G., et al., 2002. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology.* 299, 38-47.

Gerdtts V., Jöns A., Makoschey B., Visser N., Mettenleiter T.C., 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78, 2139-2146.

Goubier A., Fuhrmann L., Forest L., Cachet N., Evrad-Blanchard M., Juillard V., Fischer L., 2008. Superiority of needle-free transdermal plasmid delivery for the induction of antigen-specific IFN γ T cell responses in the dog. *Vaccine.* 26, 2186-2190.

Halbur P., 2003. Factors that influence the severity of clinical disease. In: Zimmerman J. and Yoon K.J. PRRS Compendium. 2nd ed. National Pork Board. 17-26.

Kirkwood B.R. and Sterne J.A.C., 2003. Medical statistics. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science. 454-455.

Labarque G.G., Nauwynck H.J., Van Reeth K., Pensaert M.B., 2000. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J. Gen. Virol.* 81, 1327-1334.

Labarque G.G., Van Gucht S., Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M., 2003. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95, 187-197.

Labarque G.G., Van Reeth K., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M., 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine.* 22, 4183-4190.

Martelli P., Cordioli P., Alborali L.G., Gozio S., De Angelis E., Ferrari L., Lombardi G., Borghetti P., 2007. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine.* 25, 3400-3408.

Martelli P., Gozio S., Ferrari L., Rosina S., De Angelis E., Quintavalla C., Bottarelli E., Borghetti P., 2009. Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine.* 27, 3788-3799.

Mateu E., Martín M., Vidal D., 2003. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Spain. *J. Gen. Virol.* 84, 529-534.

Mateu E. and Diaz I., 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet. J.* 177, 345-351.

- Meier W.M., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*. 309, 18-31.
- Mikulska-Skupien E., Szweida W., Procajlo Z., 2005. Evaluation of specific humoral immune response in pigs vaccinated intradermally with deleted Aujeszky's disease vaccine and challenged with virulent strain of Herpesvirus suis type I. *Pol. J. Vet. Sci.* 8, 11-16.
- Murtaugh M., Xiao Z., Zuckermann F., 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15, 533-547.
- Oleksiewicz M., Botner A., Madsen K.G., Storgaard T., 1998. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet. Microbiol.* 64, 7-22.
- Prieto C., Alvarez E., Martínez-Lobo F.J., Simarro I., Castro J.M., 2008. Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* 175, 356-363.
- Samson J.N., de Bruin T.G.M., Voermans J.J.M., Meulenber J.J.M., Pol J.M.A., Bianchi A.T.J., 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8⁺ cells. *J. Gen. Virol.* 81, 497-505.
- Scheerlinck J.P. and Yen H.H., 2005. Veterinary application of cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 17-22.
- Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Potapchuk D., Podgórska K., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835-1841.
- Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., et al., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.* 153, 1479-1488.
- Tamanini C., Giordano N., Chiesa F., Seren E., 1983. Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating. *Acta Endocrinol.* 102, 447-450.
- Thacker E.L., 2005. Lung inflammatory responses. *Vet. Res.* 37, 469-486.
- Van Gucht S., Van Reeth K., Pensaert M., 2003. Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 960-966.

Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M., 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* 48, 325-335.

Van Rooij E.M.A., de Bruin T.G.M., de Visser Y.E., Middel W.G.J., Boersma W.J.A., Bianchi A.T.J., 2004. Vaccine-induced T cell-mediated immunity plays a critical role in early protection against pseudorabies virus (suid herpes virus type I) infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 113-125.

Xiao Z., Batista L., Dee S., Halbur P., Murtaugh M.P., 2004. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923-5933.

Zhao Y.L., Murthy S.N., Manjili M.H., Guan L.J., Sen A., Hui S.W., 2006. Induction of cytotoxic T lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. *Vaccine.* 24, 1282-1290.

Zuckermann F.A., Garcia E.A., Luque I.D., Christopher-Hennings J., Doster A., Brito M., Osorio F., 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123, 69-85.