

STUDIO MOLECOLARE SULLA RISPOSTA INFIAMMATORIA E IMMUNITARIA IN CORSO DI INFEZIONE NATURALE DA PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV)

MOLECULAR STUDY ON THE INFLAMMATORY AND IMMUNE RESPONSE UPON PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) NATURAL INFECTION

Ferrarini G., Ferrari L., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P.

*Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie – Università degli Studi di Parma
Via del Taglio, 10 – 43126 Parma*

RIASSUNTO

Scopo del presente lavoro è stato lo studio della modulazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immunitarie (IFN- γ), anti-infiammatorie (IL-10), nonché di segnali immunoregolatori (FoxP3) in corso di infezione naturale da PRRSV. L'indagine è stata svolta in un allevamento con anamnesi patologica recente supportata da evidenze virologiche di infezione da PRRSV in fase di accrescimento. Sono stati considerati 20 suini suddivisi in due gruppi: 1) gruppo vaccinato a 3 settimane di età contro PRRSV (V-PRRSV) mediante vaccino vivo attenuato (MLV: modified live virus) e 2) gruppo non vaccinato (NV) controllo costituito da animali della stessa età. Gli animali, dopo un periodo post-vaccinale (da 3 a 6 settimane di età) sono stati esposti naturalmente all'infezione presente in allevamento in quanto messi a contatto con animali residenti infetti. Gli animali si sono naturalmente infettati a 8 settimane di vita e la viremia si è mantenuta per circa 8 settimane. In questo periodo, ai due gruppi di suini sono stati effettuati prelievi di sangue a 6, 8, 10, 12, 14, e 16 settimane di età. Su siero sono state effettuate indagini virologiche e su sangue intero è stato effettuato l'isolamento delle PBMC e l'analisi dell'espressione genica in RT-qPCR (retrotrascrizione - PCR quantitativa).

Dai risultati ottenuti si sono potute osservare importanti modulazioni temporali dei marker indagati e differenze significative tra i due gruppi vaccinati e non vaccinati esposti. Per le citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), pur senza differenze tra i due gruppi, si è riscontrata una netta riduzione dell'espressione fin dall'inizio dell'infezione, con un ritardato incremento in associazione al picco di viremia. Riguardo all'IFN- γ , è stato possibile rilevare un incremento significativo dell'espressione nel gruppo V-PRRSV nella fase acuta dell'infezione. Per la citochina anti-infiammatoria IL-10 si sono osservati livelli più ridotti negli animali vaccinati precedentemente al picco di espressione a 12 settimane associato ai livelli massimi delle citochine pro-infiammatorie. Diversamente, negli animali esposti/infetti non vaccinati, è stata riscontrata una maggiore espressione genica del fattore di trascrizione FoxP3 per tutto il periodo di infezione.

ABSTRACT

The study aims at evaluating gene expression of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immune (IFN- γ), anti-inflammatory (IL-10) cytokines and immunoregulatory signals (FoxP3) upon PRRSV natural infection. The study was carried out in a herd with recent clinical history of PRRSV infection associated with viremia in growers. Twenty pigs were divided into two groups: 1) the V-PRRSV group was vaccinated at 3 weeks of age against PRRSV with a modified live virus vaccine (MLV) and 2) the NV non-vaccinated group that served as control. Three weeks after vaccination, the animals were co-mingled with resident pigs in order to be naturally exposed

to the resident virus. Animals were naturally infected at 8 weeks of age and the viremia has lasted for about 8 weeks. In this period, blood samples were collected at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 weeks of age in both groups. Virological and gene expression (RT-qPCR) analyses were performed in serum and PBMC, respectively. The results highlight relevant marker modulations over time and significant differences between groups. In both groups, the modulation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, TNF- α) showed a reduction at the beginning of infection and a delayed increase in association with the viremic peak. The IFN- γ course showed a higher gene expression in the V-PRRSV group during the acute phase of infection. Lower expression of IL-10 was observed in vaccinated animals before the peak at 12 weeks associated with the increase of pro-inflammatory cytokines. Differently, in exposed/infected unvaccinated animals, significantly higher gene expression of the transcription factor FoxP3 was observed throughout the period of PRRSV infection.

Parole chiave

Infezione naturale, PRRSV, citochine, FoxP3.

Key words

Natural infection, PRRSV, cytokines, FoxP3.

Introduzione

Il virus della PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) è uno dei più diffusi agenti patogeni negli allevamenti suini di tutto il mondo, responsabile di una sindrome riproduttiva e respiratoria causa di gravi danni ad impatto sanitario ed economico. Questo virus è emerso verso la fine agli anni '80 ma nonostante siano passati più di venti anni, le conoscenze su alcuni aspetti essenziali che riguardano le caratteristiche del virus (patogenesi, risposta immunitaria, epidemiologia) appaiono ancora spesso incomplete.

PRRSV induce una risposta innata lenta e debole nei polmoni (Murtaugh e Foss, 2002; Murtaugh et al., 2002), è in grado di causare una bassa induzione (Van Reeth, 1999) o una azione inibitoria (Miller, 2004) di citochine pro-infiammatorie (es. IFN di tipo I, TNF- α) e immunitarie (es. IFN- γ). Gli anticorpi anti-PRRSV sono rilevabili nel siero e nei polmoni dopo circa 10 giorni dall'infezione ma non sono in grado di neutralizzare il virus (Labarque et al., 2000), quindi PRRSV induce una risposta innata e umorale ritardata. Anche la risposta cellulo-mediata indotta da PRRSV è insolitamente lenta a svilupparsi e inefficiente, forse proprio a causa di un'iniziale risposta innata anch'essa lenta e inefficiente. La risposta cellulo-mediata è monitorabile e quantificabile come livelli di cellule secernenti IFN- γ nelle PBMC a circa 3 settimane dopo l'infezione; la frequenza di tali cellule si mantiene generalmente bassa nelle successive 7-9 settimane (Meier et al., 2003). Tra i meccanismi cellulari, l'induzione dei linfociti T regolatori (T_{reg}) è uno dei meccanismi utilizzati da alcuni patogeni per evadere la risposta immunitaria. I linfociti T_{reg} sono coinvolti nell'instaurarsi delle infezioni croniche e persistenti quali le infezioni sostenute da virus dell'immunodeficienza umana (HIV), citomegalovirus, Epstein-Barr virus e virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV) in campo umano (Kinter et al., 2004; Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005; Rieger et al., 2006; Peng et al., 2008; Smyk-Pearson et al., 2008).

Recenti studi nel suino hanno dimostrato che nella fase precoce di infezione da PRRSV si osserva l'induzione dell'attività dei linfociti T_{reg} (Silva-Campa et al., 2009, 2010, 2012; Wongyanin et al., 2010; Dwivedi et al., 2011; LeRoith et al., 2011); per questo le indagini sono volte a valutare se questa sottopopolazione sia coinvolta nel ritardo della risposta cellulo-mediata in suini infetti.

Lo scopo del presente lavoro è lo studio della modulazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immunitarie (IFN- γ), anti-infiammatorie (IL-10) e

di segnali immunoregolatori (FoxP3) implicati nella risposta immunitaria in corso di infezione naturale da PRRSV in animali vaccinati e non vaccinati.

MATERIALI E METODI

Animali

Il lavoro è stato svolto in un allevamento con recente anamnesi patologica di infezione da PRRSV e relativi problemi clinici in fase di accrescimento, supportata da evidenze virologiche. Sono stati considerati 20 suini suddivisi in due gruppi: 1) gruppo vaccinato (10 suinetti) a 3 settimane di età contro PRRSV (V-PRRSV) mediante vaccino vivo attenuato (MLV); 2) gruppo non vaccinato (NV, 10 suinetti) come gruppo controllo della stessa età. La vaccinazione per PRRSV è stata effettuata per via intramuscolare (2 ml) a 3 settimane di vita, utilizzando un vaccino vivo attenuato in commercio (Porcilis PRRS® - MSH Animal Health). Gli animali, dopo un periodo post-vaccinale (da 3 a 6 settimane di età), sono stati esposti naturalmente all'infezione presente in allevamento in quanto messi a contatto con animali residenti infetti. Gli animali si sono naturalmente infettati a 8 settimane di vita e la viremia si è mantenuta per circa 8 settimane. Ai due gruppi di suini sono stati effettuati prelievi di sangue a 3, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 settimane di età. La determinazione della viremia per PRRSV è stata effettuata mediante RT-qPCR nel siero e da sangue intero sono state isolate le cellule mononucleate del sangue (PBMC) su cui è stata condotta l'analisi dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-8), citochine immunitarie (IFN- γ , IL-10) e marcatori immunoregolatori (FoxP3) mediante PCR real-time.

Determinazione della viremia per PRRSV

Per la quantificazione dell'RNA virale di PRRSV mediante RT-qPCR, l'RNA totale è stato dapprima estratto da 200 μ l di siero mediante TRIzol LS (Invitrogen) e risospeso in 50 μ L di acqua DEPC. La sintesi di cDNA (RT, retrotrascrizione) è stata effettuata con kit SuperScript II (Invitrogen). La PCR è stata effettuata con termociclatore Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizzando i seguenti primer: ShS: 5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3' e IZR: 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACT-3' modificati da Suárez et al. (1994) e Oleksiewicz et al. (1998), rispettivamente per l'amplificazione di un frammento di 398 paia basi della ORF7 di PRRSV. Una coppia di sonde FRET è stata disegnata considerando la variabilità dei ceppi italiani: 5'-LCRed640-CAGGAAGTGCCTCGCTTTCATCCAG-3' PH e 5'-ATCCAGACGGCTTTCATCAAGGC-3' FL. La PCR real-time è stata effettuata con un protocollo costituito da 10 min. di denaturazione del cDNA e attivazione enzimatica a 95°C, seguita da 40 cicli a 95°C per 10 sec., 58°C per 10 sec. e 72°C per 10 sec. dopo 45 sec. di estensione finale, è stata applicata l'analisi mediante curva di denaturazione per confermare la specificità di reazione (Bonilauri et al., 2007).

Espressione genica di citochine e segnali trascrizionali mediante RT-qPCR in PBMC

Dalle PBMC isolate da sangue periferico mediante gradiente di densità in Histopaque-1077® (Sigma) è stato isolato l'RNA totale mediante kit TRI-Reagent® (Ambion). La retrotrascrizione a cDNA è stata effettuata mediante kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) in termociclatore StepOne (Applied Biosystems) secondo le seguenti condizioni: 25°C per 10 min., 37°C per 120 min. e 85°C per 5 min. La PCR real-time è stata effettuata su stesso termociclatore con chimica SYBR® Green (FAST SYBR® Green-1 Master Mix, Applied Biosystems). I dettagli dei primer utilizzati a concentrazioni ottimizzate sono riportati in tab. 1. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno (Borghetti et al., 2012; Ferrari et al., 2013).

Gene	Sequenza	T _m (°C)	Amplicone (pb)
TNF- α	S: 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'	59.8	118
	AS: 5'-GGCGACGGGCTTATCTGA-3'	58.2	
IL-1 β	S: 5'-ATGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	56.3	89
	AS: 5'-TTGTTGCTATCATCTCCTTGCAC-3'	54.5	
IL-8	S: 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'	53.5	75
	AS: 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'	57.5	
IFN- γ	S: 5'-TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG-3'	60.6	79
	AS: 5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'	58.2	
IL-10	S: 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	60.3	114
	AS: 5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA-3'	57.1	
FoxP3	S: 5'-CGCATGTTTCGCCTTCTTCA-3'	56.7	68
	AS: 5'-AGGCTCAAGTTGTGGCGAAT-3'	57.3	
GAPDH	S: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	61.4	70
	AS: 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'	59.8	

Tab. 1: Dettagli delle coppie di primer utilizzati nell'analisi in real-time PCR. T_m: temperatura di melting; pb: paia basi; S: primer senso; AS: primer anti-senso.

Table 1: Details of the primer pairs used in the real-time PCR analysis. T_m: melting temperature; pb: base pairs. S: sense primer; AS: anti-sense primer.

Le condizioni di PCR sono state le seguenti: 95°C per 20 sec. e 40 cicli a 95°C per 3 sec. e 60°C per 30 sec. I livelli di espressione dei geni considerati sono stati analizzati mediante quantificazione relativa (RQ: relative quantity) con metodo del $\Delta\Delta Ct$.

L'analisi è stata effettuata definendo un gruppo di riferimento per ciascun gruppo sperimentale (V-PRRSV e NV) costituito dagli animali dei due rispettivi gruppi prima della vaccinazione (età: 3 settimane).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante test ANOVA univariata a due fattori e test post-hoc con correzione di SIDAK. Il grado di significatività è stato definito per valori di $p < 0.05$. L'analisi è stata condotta utilizzando il software IBM SPSS Statistics 19 (OBM ITALIA). L'asterisco (*) indica differenze statisticamente significative all'interno di ciascun gruppo, V-PRRSV o NV tra i tempi sperimentali (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Lettere diverse (a, b) indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi V-PRRSV e NV allo stesso tempo sperimentale.

RISULTATI

Indagini virologiche

Durante il periodo sperimentale analizzato (6-16 settimane di età), è stata determinata la viremia per PRRSV nel siero degli animali appartenenti ai due gruppi considerati (Fig. 1).

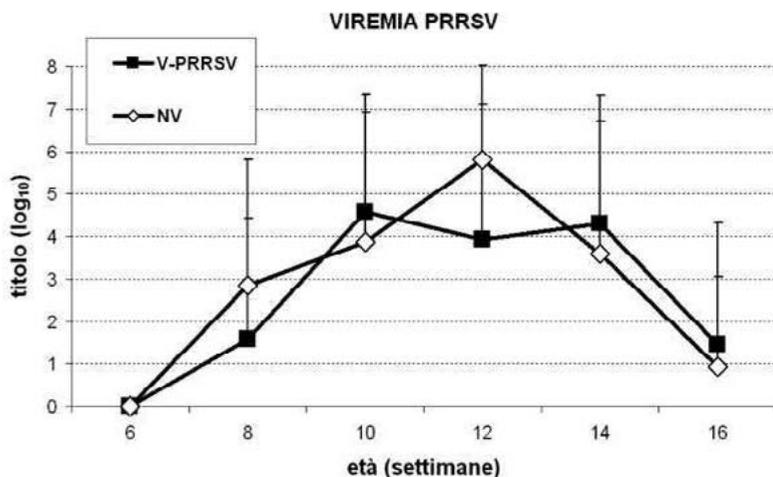


Fig. 1: Carica virale di PRRSV nel siero.

Fig. 1: PRRSV viral burden in serum.

Gli animali sono risultati positivi a PRRSV alla ottava settimana di età. Si è osservato un incremento progressivo della carica virale con picco a 12 settimane nel gruppo di controllo e successiva riduzione tra 14 e 16 settimane in entrambi i gruppi. Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi di animali.

Analisi dell'espressione genica di marker immunitari

L'analisi dell'espressione genica dell'IL-1 β mostra un andamento sovrapponibile tra gruppo vaccinato PRRSV (V-PRRSV) e gruppo non vaccinato (NV) (Fig. 2a). Nel periodo tra 6 e 8 settimane di vita, quando si instaura l'infezione, è possibile osservare un drastico calo dei valori, riduzione che si mantiene costante fino a 10 settimane di vita (6 vs. 10 settimane, $p < 0.05$) sia per il gruppo V-PRRSV che per NV. A 12 settimane si riscontra un picco di espressione ($p < 0.001$); a 14 settimane si osserva una forte riduzione ($p < 0.001$). A 16 settimane si riscontrano valori comparabili a 6 settimane (pre-infezione). Anche per l'IL-8 non si osservano differenze nell'andamento temporale tra i due gruppi di animali considerati. Sia nel gruppo V-PRRSV che nel gruppo NV si osserva una diminuzione dell'espressione genica da 6 a 10 settimane ($p < 0.05$, Fig. 2b). A 12 settimane vi è un significativo incremento e quindi un ritorno a valori basali pre-infezione a 16 settimane.

Per quanto riguarda il TNF- α , la modulazione dell'espressione genica è analoga a quella delle altre due citochine pro-infiammatorie in entrambi i gruppi: i livelli si riducono dalla sesta alla decima settimana in entrambi i gruppi, seppur in modo meno intenso nel gruppo V-PRRSV. Un picco di espressione è osservato anche in questo caso a 12 settimane ed una riduzione intensa è osservata due settimane dopo. Un aumento successivo in entrambi i gruppi è rilevato a 16 settimane di età (Fig. 2c).

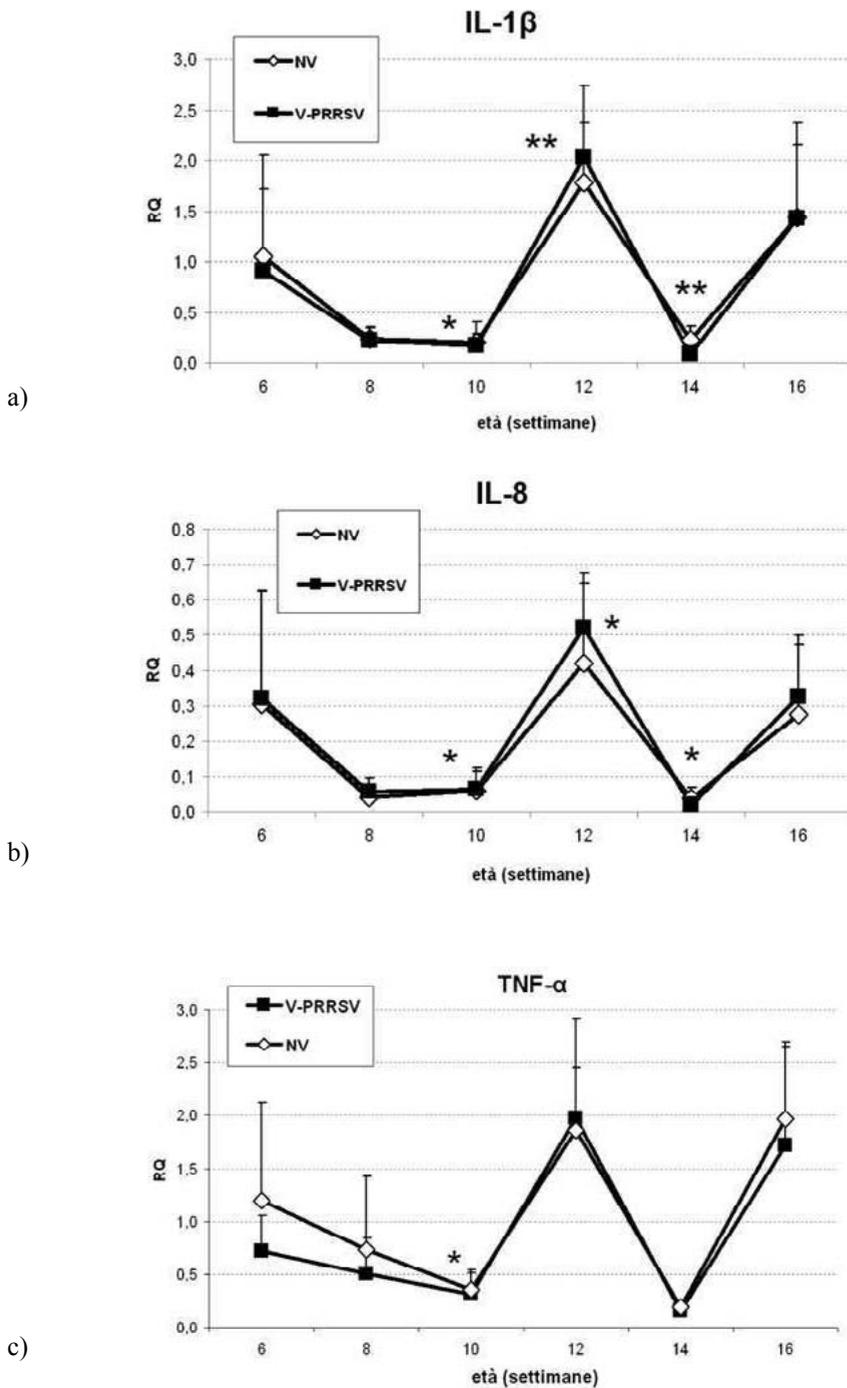


Fig. 2: Espressione genica di IL-1 β , IL-8 e TNF- α in PBMC.
Fig. 2: Gene expression of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in PBMC.

L'espressione genica di IFN- γ mostra un differente comportamento temporale nei due gruppi considerati, particolarmente evidente dall'ottava alla dodicesima settimana di età, nel periodo di infezione (Fig. 3). Nel gruppo vaccinato (V-PRRSV) si verifica un significativo incremento dell'espressione genica di IFN- γ nel tempo con valori alla decima ($p<0.01$) e dodicesima ($p<0.05$) settimana significativamente maggiori anche rispetto al gruppo NV (a vs. b) in cui gli incrementi dalla sesta alla dodicesima settimana di età non sono significativi. Dalla dodicesima alla quattordicesima settimana si osserva una diminuzione, in accordo con la riduzione della viremia in entrambi i gruppi.

Anche l'analisi dell'espressione dell'IL-10, pur nell'ambito di un andamento temporale pressoché simile, ha mostrato alcune differenze tra i due gruppi considerati, NV e V-PRRSV (Fig. 4). È stata rilevata un'espressione mediamente più elevata nel gruppo NV soprattutto nel periodo iniziale di infezione (8-10 settimane) seppur caratterizzata da ampia variabilità. A 12 settimane si nota un picco di espressione risultato significativo per il gruppo V-PRRSV ($p<0.01$) rispetto ai valori a 10 settimane, seguito da una successiva riduzione.

Il profilo temporale di espressione di FoxP3 mostra differenze altamente significative ($p<0.001$) tra i due gruppi di animali (Fig. 5). Infatti, i livelli risultano maggiori nel gruppo NV rispetto al gruppo vaccinato V-PRRSV per tutto il periodo di infezione, mantenendosi persistentemente più elevati anche a 12 e 14 settimane, indipendentemente dall'abbassamento della viremia.

In particolare, da 8 a 12 settimane si nota un aumento progressivo di espressione che tende a decrescere lievemente solo a 14 settimane in concomitanza con la riduzione della viremia. Negli animali vaccinati (V-PRRSV), l'espressione di FoxP3 si è mantenuta pressoché costante, senza variazioni statisticamente significative nel tempo.

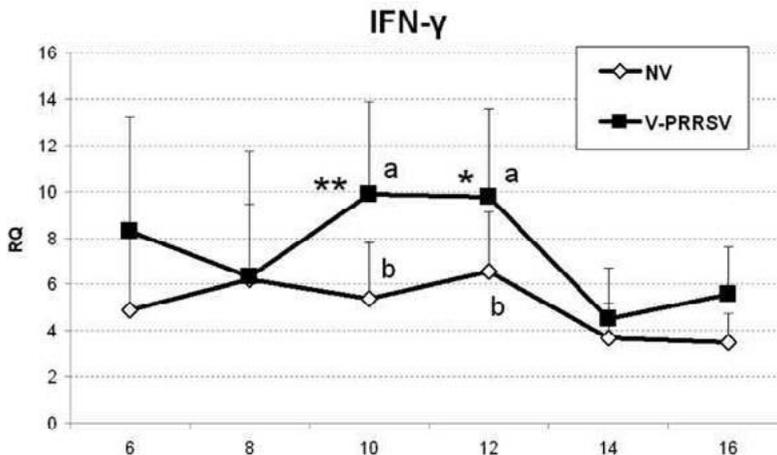


Fig. 3: Espressione genica di IFN- γ in PBMC
Fig. 3: Gene expression of IFN- γ in PBMC.

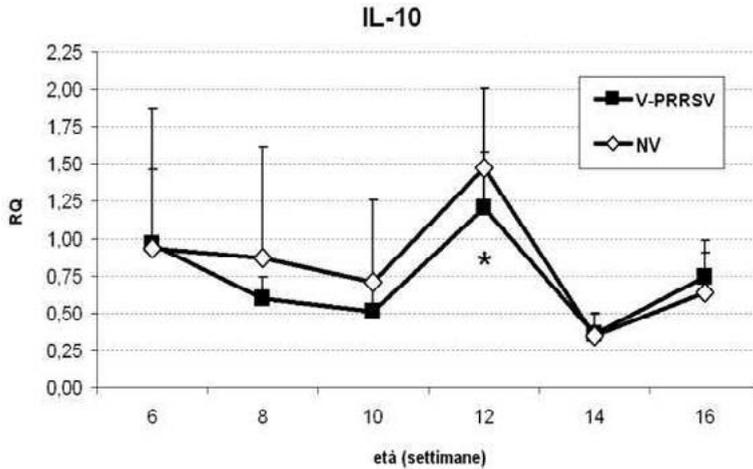


Fig. 4: Espressione genica di IL-10 in PBMC.
Fig. 4: Gene expression of IL-10 in PBMC.

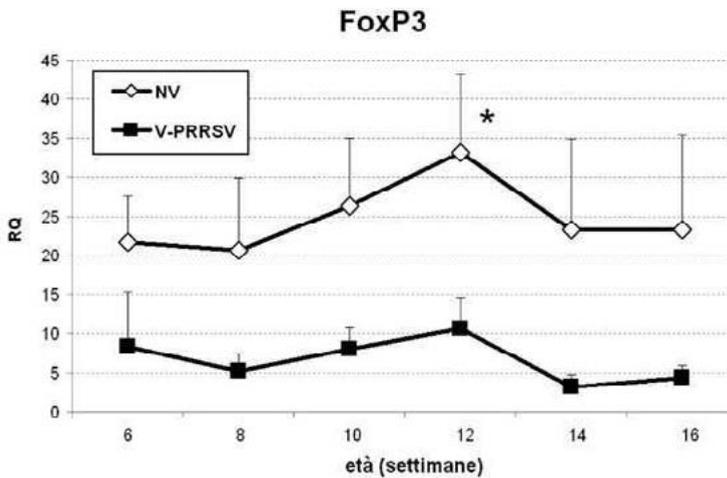


Fig. 5: Espressione genica di FoxP3 in PBMC.
Fig. 5: Gene expression of FoxP3 in PBMC.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

PRRSV causa un'infezione caratterizzata da una viremia che generalmente ha la durata di un mese ed è seguita da una fase di persistenza all'interno dei tessuti linfoidi per 4-6 mesi. Il meccanismo con cui PRRSV evade/altera la risposta immunitaria è ancora parzialmente sconosciuto. È noto che durante l'infezione si sviluppano sia una risposta immunitaria cellulo-mediata sia umorale, ma il loro specifico ruolo nella protezione e nell'eliminazione del virus dai tessuti non è completamente conosciuto (Thanawongnuwech et al., 2010). PRRSV può riconoscere ed interagire con i macrofagi, le cellule dendritiche a livello

alveolare e del tratto riproduttivo. I macrofagi infettati, in particolare i macrofagi polmonari alveolari sialoadesina-positivi (PAM), trasportano rapidamente il virus nei linfonodi, organi linfoidi, polmoni e in maniera minore in altri tessuti (Silva-Campa et al., 2009). L'infezione delle cellule coinvolte nella risposta difensiva determina una down-regolazione di citochine infiammatorie, compromettendo la risposta immunitaria innata e conseguentemente anche la risposta adattativa.

Lo scopo del presente studio è stato la valutazione dell'espressione genica di alcune fondamentali citochine ad azione pro-infiammatoria (IL-1 β , IL-8, TNF- α) e pro-immunitaria (IFN- γ) in associazione a citochine anti-infiammatorie (IL-10) e a segnali immunoregolatori trascrizionali (FoxP3) in corso di infezione naturale da PRRSV al fine di poter comprendere come il virus sia in grado di modulare la risposta immunitaria ma anche di poter identificare ulteriori parametri di valutazione di tale modulazione.

Dai dati ottenuti è stato possibile trarre alcune considerazioni sugli andamenti temporali di tali mediatori a conferma ed ulteriore definizione del ruolo patogenetico di PRRSV nei suoi meccanismi di interazione con la risposta immunitaria del suino.

I livelli di IL-1 β e IL-8 hanno un andamento sia temporale sia di intensità di espressione molto simili tra loro. È evidente un marcato decremento dei livelli di espressione di tali citochine nella fase precoce di infezione con un innalzamento tardivo solo in concomitanza con il picco della viremia. Questo tipo di modulazione temporale conferma che PRRSV determina una precoce inibizione della risposta infiammatoria e immunitaria innata mediante una precoce "down-regulation" dei principali segnali della sua attivazione (Darwich et al., 2010), almeno nel periodo iniziale di infezione, ed un evidente ritardo (5-6 settimane) della loro risposta nel tempo (Van Reeth et al., 1999, 2000; Meier et al., 2003; Royae et al., 2004). Per quanto riguarda il TNF- α , si evidenzia una mancata risposta in fase precoce meno evidente come abbassamento e alterazione dei livelli di espressione, ma comunque con netto ritardo del picco di successivo incremento, analogamente a quanto osservato per le citochine precedenti. Questi risultati sono in accordo con Thanawongnuwech et al. (2010), seppur tale studio sia stato condotto su macrofagi alveolari polmonari.

È da sottolineare che non sempre l'effetto di PRRSV sulle citochine pro-infiammatorie è risultato univoco in senso inibitorio. In alcuni studi alcune citochine, in particolare IL-1 β e IFN- γ hanno evidenziato un precoce seppur transitorio incremento durante l'infezione naturale (Borghetti et al., 2011). Ne consegue che, come ormai assodato ed accettato, differenti isolati di PRRSV possano esprimere differenti capacità di indurre o inibire le citochine precoci dell'immunità innata.

Anche in questo caso, una possibile spiegazione dei risultati ottenuti potrebbe essere legata alle caratteristiche intrinseche dell'isolato implicato nell'infezione in termini di patogenicità ed immunogenicità in quanto alcuni isolati possono inibire fin dalle fasi iniziali la risposta pro-infiammatoria, renderla transitoria e debole, oppure ritardarla nel tempo (Royae et al., 2004; Mateu e Diaz, 2008; Borghetti et al., 2011).

Quanto di rilevante ha mostrato questo studio è che l'infezione naturale da PRRSV è caratterizzata da un'iniziale inibizione a cui fa seguito un picco molto tardivo delle due citochine tipicamente coinvolte nell'attivazione precoce della risposta innata (IL-1 β e IL-8); inoltre, si osserva una marcata posticipazione della risposta mediata da TNF- α che più specificatamente sostiene il mantenimento della risposta cellulare innata e la produzione di citochine pro-immunitarie come l'IFN- γ .

Per quanto riguarda le citochine pro-infiammatorie, non si riscontrano differenze nella risposta durante l'infezione, tra animali non vaccinati e vaccinati. Sembra pertanto che la somministrazione del vaccino non porti a variazioni nella modulazione di questi tre geni

codificanti per mediatori pro-infiammatori, questo in parziale contrasto con quanto osservato in precedenti lavori (Borghetti et al., 2011). Ancora una volta, tale diverso riscontro, potrebbe essere spiegato dal fatto che, in base alle caratteristiche intrinseche di patogenicità/immunogenicità, gli isolati implicati in condizioni diverse di infezione naturale potrebbero aver diversamente interagito sulla attivazione della risposta immunitaria anche indotta da una precedente vaccinazione.

Si potrebbe ipotizzare che l'isolato di PRRSV responsabile dell'infezione naturale oggetto del presente studio sia stato in grado di interagire fortemente, o debolmente, con l'attivazione della risposta innata, come caratteristica intrinseca della risposta di tale patogeno, e riduca comunque, nell'uno o nell'altro caso, in fase precoce di infezione, l'attivazione delle componenti cellulari responsabili dell'espressione/produzione di tali citochine.

Contrariamente, si potrebbe anche ipotizzare che l'isolato implicato possa aver determinato l'induzione/mantenimento di una immunoregolazione inibitoria fisiologica correlata alla fase di vita dell'animale. Tale effetto inibitorio non verrebbe contrastato dalla precedente vaccinazione, a conferma che l'effetto del vaccino può avere un ruolo variabile nell'attivazione delle componenti precoci della risposta difensiva. Ciò spiegherebbe anche l'effetto protettivo di intensità diversa, anche scarsa, che si osserva a seguito della vaccinazione.

Altre considerazioni sorgono quando sono analizzati gli andamenti temporali delle citochine pro-immunitarie tardive e specifiche (IFN- γ) e delle citochine/segnali immuno-regolatori (IL-10, FoxP3).

Per quanto attiene all'IFN- γ , l'infezione di per sé induce un lento e limitato incremento dopo 2-3 settimane dall'inizio dell'infezione, mentre nei soggetti vaccinati si osserva una maggiore efficienza e un rapido innalzamento della citochina in concomitanza con il periodo di innalzamento della viremia. L'andamento ritardato dell'IFN- γ , in corso di infezione da PRRSV, è in accordo con quanto descritto da diversi autori (Meier et al., 2003; Royae et al., 2004;). Analogamente, a differenza di quanto osservato per le citochine pro-infiammatorie, si conferma (Borghetti et al., 2011) che la vaccinazione è in grado di sostenere una maggior espressione genica di IFN- γ rispetto agli animali non vaccinati, come dimostrato sia in espressione genica sia come secrezione di proteina mediante tecnica ELISpot (Martelli et al., 2009).

Anche l'andamento temporale della citochina anti-infiammatoria e immunosoppressiva IL-10 appare simile tra i due gruppi, ad eccezione del periodo iniziale dell'infezione quando risulta mediamente più elevata nel gruppo dei soggetti non vaccinati. L'espressione di IL-10 mostra un massimo in coincidenza con il picco della viremia, in associazione con la massima espressione delle citochine pro-infiammatorie. La ritardata risposta legata all'IL-10 appare in relazione all'incremento tardivo delle citochine pro-infiammatorie che deve controbilanciare in relazione al suo ruolo di fattore di "spegnimento" della risposta infiammatoria. Contrariamente, è importante rilevare che i valori più elevati di IL-10 in fase iniziale di infezione negli animali non vaccinati potrebbero spiegare il riscontro della minore risposta di IFN- γ negli stessi e quindi un effetto diretto di PRRSV sull'espressione di tale citochina.

Diversi studi ritengono che l'espressione di IL-10 possa essere un importante meccanismo di modulazione della risposta dell'ospite in corso di infezione da PRRSV poiché promuove l'evasione di PRRSV dalla risposta immunitaria, inibendone un corretto sviluppo (Johnsen et al., 2002; Suradhat et al., 2003; Diaz et al., 2006), nonché potrebbe influenzare l'efficacia della risposta difensiva con ripercussione anche sullo score clinico (Borghetti et al., 2011).

Dopo l'infezione sia con ceppo europeo che americano, i livelli di IL-10 aumentano sia come espressione genica che come secrezione di proteina nel BALF (Suradhat e Thanawongnuwech,

2003). Analogamente, è riportato che l'espressione di IL-10 può essere diversamente indotta o inibita in base all'isolato di PRRSV con cui l'animale viene a contatto (Darwich et al., 2010).

Da questo studio si evince che la determinazione dell'IL-10, più che delle citochine infiammatorie, rimane un marker importante per valutare le modulazioni della risposta infiammatoria/innata ma con significatività ed intensità legati alle caratteristiche intrinseche del virus isolato che determina l'infezione. L'effetto immunosoppressivo della IL-10 può però essere maggiormente valutabile attraverso lo studio di meccanismi legati alla fase di regolazione inibitoria della risposta immunitaria.

A tal proposito, è stata valutata l'espressione del fattore di trascrizione FoxP3, marker specifico dei linfociti T_{reg} . Questo fattore promuove il differenziamento dei linfociti T naive in linfociti T_{reg} , fisiologicamente coinvolti nell'omeostasi della risposta immunitaria e nella regolazione inibitoria di "spegnimento".

Recenti studi, in accordo con il presente, hanno mostrato che l'infezione da PRRSV induce un incremento dei linfociti T_{reg} a 14 giorni dall'infezione, e che questo è positivamente correlato con i livelli di viremia. Nel presente studio si è riscontrato una netta differenza di espressione del gene che codifica per il fattore di trascrizione FoxP3 tra gli animali vaccinati e non vaccinati per tutta la durata dell'infezione naturale da PRRSV.

Il gruppo vaccinato (V-PRRSV) ha mostrato una bassa espressione di FoxP3, a sostegno di una bassa attivazione dei linfociti T_{reg} , e dunque di una risposta immunitaria cellulo-mediata Th1 protettiva in senso antivirale che si può sviluppare più adeguatamente. Contrariamente, nel gruppo controllo (NV), si è osservata una maggiore espressione e quindi una maggior attivazione dei linfociti T_{reg} , con una potenziale inibizione della risposta immunitaria difensiva. Due potrebbero essere le spiegazioni funzionali della differente modulazione del fattore trascrizionale FoxP3 durante l'infezione naturale da PRRSV nei due gruppi di animali considerati: 1) la somministrazione del vaccino ha stabilizzato a bassi livelli l'espressione di questo gene "antagonista", che viceversa sarebbe attivato direttamente dall'interazione del virus con le cellule immunitarie; 2) l'elevata espressione pre-infezione che si osserva nel gruppo controllo (NV) potrebbe essere legata a un'elevata espressione fisiologica di FoxP3 in relazione all'età (animali giovani nel periodo post-svezzamento) (Wen et al., 2012) mentre, al contrario, la vaccinazione, già in fase pre-infezione, potrebbe aver "educato" la risposta immunitaria in senso Th1, mantenendola nel tempo cosicché nel periodo di infezione non si verifica quell'incremento significativo di FoxP3 che si osserva negli animali non vaccinati in concomitanza con l'infezione e l'incremento dei livelli di viremia.

Dai risultati ottenuti e dal confronto con la letteratura, si possono evidenziare alcune considerazioni conclusive sull'importanza di conoscere il pattern citochinico sia come andamento temporale che come livelli di espressione genica durante l'infezione da PRRSV in relazione alle caratteristiche intrinseche dell'isolato implicato in termini di patogenicità/immunogenicità:

- 1) l'infezione da PRRSV inibisce e ritarda l'attivazione della produzione delle citochine pro-infiammatorie;
- 2) l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie può essere modulata diversamente a seconda dell'isolato causa di infezione e la vaccinazione può esprimere un effetto variabile su tale modulazione;
- 3) la vaccinazione riduce l'effetto negativo sull'espressione di IFN- γ ;
- 4) la vaccinazione potrebbe avere un effetto protettivo sul meccanismo inibitorio causato dall'infezione da PRRSV riducendo l'effetto dell'IL-10, ma soprattutto del fattore trascrizionale FoxP3, marker specifico dei linfociti T_{reg} .

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bonilauri P., Bonci M., Meriardi G., Dottori, M. (2007) Development and validation of real time (FRET probe) PCR for detection of PRRSV (EU). In: Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Krakow, 24-27 June 2007, 194.
- 2) Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Franceschi V., Bottarelli E., Matrelli P. (2011) Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs. *Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 143-155.
- 3) Borghetti P., Morganti M., Saleri R., Ferrari L., De Angelis E., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Martelli P. (2012) Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet. Microbiol.* (in stampa).
- 4) Darwich L., Diaz I., Mateu E. (2010) Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunology. *Virus Res.* 154, 123-132.
- 5) 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. *Virology* 351, 249-259.
- 6) Dwivedi V., Manickam C., Patterson R., Dodson K., Weeman M., Renukaradhya G.J. (2011). Intranasal delivery of whole cell lysate of *Mycobacterium tuberculosis* induces protective immune responses to a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. *Vaccine* 29, 4067-4076.
- 7) Ferrari L., Martelli P., Saleri R., De Angelis E., Cavalli V., Bresaola M. Benetti M., Borghetti P., 2013. Lymphocyte activation as cytokine gene expression and secretion is related to the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) isolate after *in vitro* homologous and heterologous recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pigs vaccinated and exposed to natural infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 193-206.
- 8) Johnsen C.K., Botner A., Kamstrup S., Lind P., Nielsen J. (2002) Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: association of sustained expression of IFN- γ and IL-10 after viral clearance. *Viral Immunol.* 15, 549-556.
- 9) Kinter A.L., Hennessey M., Bell A., Kern S., Lin Y., Daucher M., Planta M., Mc Glaughlin M., Jackson R., Ziegler S.F., Fauci A.S. (2004) CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+)CD8(+) HIV specific T cell immune responses *in vitro* and associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med.*, 200, 331-343.
- 10) Labarque G.G., Nauwynck K.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.
- 11) LeRoith T., Hammond S., Todd S.M., Ni Y., Cecere T., Pelzer K.D. 2011 A modified live PRRSV vaccine and the pathogenic parent strain induce regulatory T cells in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 312-316.
- 12) Martelli P., Gozio S., Ferrari L., Rosina S., De Angelis E., Quintavalla C., et al. (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.

- 13) Miller L.C., Laegreid W.W., Bono J.L., Chitko-McKown C.G., Fox J.M. (2004) Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch. Virol.* 149, 2453-2463.
- 14) Mateu E. e Diaz I. (2008) The challenge of PRRS immunology. *Vet. J.* 177, 345-351.
- 15) Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Scnitzlen W.M., Zuckermann F.A. (2003) Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, 309, 18-31.
- 16) Murtaugh M.P. e Foss D.L. (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 109-121.
- 17) Murtaugh M.P., Xiao, Z., Zuckermann F. (2002). Immunological responsive of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15, 533-547.
- 18) 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.
- 19) Peng G., Li S., Wu W., Sun Z., Chen Y., Chen Z. (2008) Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunol.* 123, 57-65.
- 20) Rieger K., Loddenkemper C., Maul J., Fietz T., Wolff D., Terpe H., et al. 2006 Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 107, 1717-1723.
- 21) Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzanda-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K. (2004) Deciphering the involvement of innate immune factors in development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 199-216.
- 22) Silva-Campa E., Flores-Mendoza L., Resendiz M., Pinelli-Saavedra A., Mata Haro V., Mwangi W., Hernandez J. (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol.* 387, 373-379.
- 23) Silva-Campa E., Cordoba L., Fraile L., Flores-Mendoza L., Hernandez J. (2010) European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virol.* 396, 264-271.
- 24) Silva-Campa E., Mata-Haro V., Mateu E., Hernandez J. (2012) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+FoxP3+ regulatory T cell (Tregs). *Virol.* 430, 73-80.
- 25) Smyk-Pearson S., Golden-Meson L. Klarquist J., Burton Jr J.R., Tester I.A. Wang C.C. et al. (2008) Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25+(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 197, 46-57.
- 26) Suárez P., Zardoya R., Prieto C., Solana A., Tabarés E., Bautista J.M., Castro J.M. (1994) Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135, 89-99.
- 27) Surhadat S. e Thanawongnuwech R. (2003) Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leucocytes of pigs infected with porcine reproductive respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.
- 28) Thanawongnuwech R. e Suradhat S. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res.* 154, 133-140.
- 29) Vahlenkamp T.W., Tompkins M.B., Tompkins W.A. (2005) The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 219-225.
- 30) Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M. (1999) Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.
- 31) Van Reeth K. e Nauwynck H. (2000) Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31, 187-213.