

PARAMETRI DI IMMUNITÀ PROTETTIVA NEL SUINO INDOTTI DA VACCINI PCV2 A DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE

PARAMETERS OF PROTECTIVE IMMUNITY IN SWINE INDUCED BY PCV2 VACCINES WITH DIFFERENT ANTIGEN PAYLOAD

GUARNERI F.¹, AMADORI M.¹, BONIOTTI M.B.², BARBIERI I.³, LELLI D.⁴, TRESOLDI E.T.⁵

¹Laboratorio Benessere Animale, Biochimica Clinica e Immunologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; ²Laboratorio di Genomica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; ³Laboratorio Analisi Genomiche, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; ⁴Laboratorio di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; ⁵DMV, Specialista in Scienza e Medicina degli Animali da Laboratorio; Specialista in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche

Parole chiave: suino, vaccino, PCV2.

Key words: swine, vaccine, PCV2.

RIASSUNTO: Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un patogeno ubiquitario nella popolazione suina ed è considerato l'agente eziologico principale del complesso di malattie Circovirus suino-associate (PCVAD), che comprende la sindrome da deperimento multisistemica post svezzamento (PMWS), malattie respiratorie, il complesso dermatite / nefropatia e problemi riproduttivi. PCVAD corrisponde a sindromi multifattoriali, innescate da co-infezioni con altri patogeni comuni (ad esempio, arterivirus PRRS, Parvovirus suino) e/o da stressori ambientali non-infettivi (ad esempio densità, dieta, variazioni di temperatura e umidità relativa). Dal momento che PCVAD colpisce gravemente l'industria suinicola in tutto il mondo, diversi vaccini sono stati sviluppati per ridurre le infezioni da PCV2 e la sua progressione a PCVAD. Tali vaccini, ancorché efficaci, sono scarsamente standardizzati in termini di dosaggio dell'antigene e di parametri riconosciuti di protezione dei suini vaccinati. Abbiamo pertanto selezionato 20 suini (ibrido Goland) di 40 giorni di vita, allocati a 4 gruppi da cinque l'uno con residui uniformi di anticorpi materni anti-PCV2. I gruppi sono stati vaccinati, rispettivamente, con 450/150/50/0 ng di un ceppo PCV2b inattivato con beta-propione-lattone, formulato nel medesimo adiuvante del vaccino commerciale Circovac. A 27 giorni dalla vaccinazione, tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2 omologo. I risultati principali possono essere riassunti come segue: 1) Nessun sintomo clinico è stato osservato nei suini oggetto di studio. 2) E' stata osservata viremia in tutti i suini di controllo (gruppo PBS + adiuvante), come pure in due suini dei gruppi 150 e 50 nanogrammi. Nessun suino del gruppo 450 ng ha sviluppato viremia. 3) Non c'è stata alcuna correlazione sui singoli animali tra titolo di Ab ELISA e protezione, anche se il gruppo 450 nanogrammi ha sviluppato in media un titolo anticorpale più elevato. 4) In accordo con il nostro studio del 2015, tutti i suini con risposta IFN-gamma PCV2-specifica a 3 settimane dalla vaccinazione erano totalmente protetti nei confronti dell'infezione sperimentale. Inoltre, tale risposta è stata indotta solo dalla vaccinazione, non

dall'infezione sperimentale. Sulla base di tali dati, il saggio IFN-gamma può costituire un valido strumento per la verifica della vaccinazione PCV2 e della sua efficacia. Inoltre, la definizione in vitro di parametri chiari ed affidabili di protezione può contribuire ad una futura riduzione delle infezioni sperimentali dei suini per valutare l'efficacia dei diversi lotti di vaccino PCV2.

ABSTRACT: Porcine Circovirus 2 (PCV2) is a ubiquitous pathogen in the swine population and is considered the main etiologic agent of the Porcine circovirus associated disease (PCVAD) complex, which includes post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), respiratory diseases, dermatitis/nephropathy and reproductive problems. PCVAD corresponds to multifactorial syndromes, caused by co-infections with other common pathogens (e.g. PRRS Arterivirus, porcine Parvovirus), and/or by environmental stressors (e.g. density, diet, variations in temperature and relative humidity). Since the disease severely affects the swine industry worldwide, different vaccines have been developed to reduce PCV2 infections and its progression to PCVAD. Such vaccines, albeit effective, are poorly standardized in terms of antigen payload and recognized correlates of protection. Therefore, we selected twenty, 40-day old piglets (Goland hybrid), and allocated them to 4 groups (5 animals each) with uniform levels of maternally-derived antibody to PCV2. Animals were vaccinated with 450/150/50/ 0 ng of an inactivated PCV2b strain, formulated in the same adjuvant of the commercial Circovac vaccine. Twenty-seven days later, all pigs were challenged intranasally with 200,000 TCID50% of the homologous PCV2 strain. The main findings can be summarized as follows: 1) No clinical signs were observed in the pigs under study. 2) Viremia was observed in all the control pigs, as well as in 2 pigs of the 150 and 50 ng groups, respectively. No pigs of the 450 ng group developed viremia. 3) There was no correlation whatsoever between protection and ELISA Ab titers in the single animals, even though the 450 ng group developed on average a stronger Ab response. 4) In agreement with our previous study of 2015, all the pigs with a PCV2-specific IFN-gamma response at 3 weeks after vaccination were fully protected against viremia. Owing to the above, the IFN-gamma assay can represent a useful tool for monitoring PCV2 vaccination and its efficacy. Also, in vitro clear and reliable immune parameters can contribute to a future reduction of swine in challenge experiments to evaluate the efficacy of PCV2 vaccines.

INTRODUZIONE

Ricerche approfondite hanno suddiviso i ceppi PCV2 in due gruppi principali designati come genotipo "a" (PCV2a) e "b" (PCV2b). Più tardi, un terzo genotipo (PCV2c) è stato retrospettivamente descritto in suini danesi nel 1980. Infine, un quarto genotipo (PCV2d) è stato descritto per la prima volta in Cina e, successivamente, in tutto il mondo; esso è attualmente considerato un genotipo emergente. Un cambiamento è stato descritto del genotipo predominante da PCV2a a PCV2b, forse associato al decorso epidemico dei casi di malattia sostenuti da PCV2. I vaccini PCV2 attuali sono basati sul genotipo "a" e sarebbero in grado di produrre un'estesa immunità crociata. Tuttavia, sebbene non sussistano prove conclusive di meccanismi di evasione della risposta immunitaria, vi sono ipotesi in tal senso basate per l'appunto sulla variabilità genomica sopra riportata. L'efficacia dei vaccini PCV2 è stata correlata con ridotti livelli di viremia, associata alla comparsa di anticorpi neutralizzanti anti-PCV2 e di cellule interferone-gamma-secerenti (IFN- γ -SC), come evidenziato da numerose pubblicazioni. Vi sono tuttavia dati contrastanti circa il ruolo della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata ai vaccini PCV2, così come le ripercussioni positive dei vaccini PCV2 su altre malattie virali e batteriche nella specie suina (Kixmoller et al., 2008). I vaccini PCV2 sono prodotti e formulati sulla base di parametri diversi, poco chiari, che rendono

molto complessa la loro valutazione di efficacia rispetto alla dose di antigene effettivamente impiegata. E' necessario pertanto introdurre elementi di standardizzazione e di valutazione omogenea dei vaccini in uso per un loro impiego più razionale. E' necessario altresì definire affidabili parametri di risposta immunitaria protettiva sui quali tarare l'efficacia dei vaccini di vecchia e nuova generazione. Gli obiettivi di questo progetto sono stati pertanto: determinare la correlazione tra dose Ag PCV2 e risposta del sistema immunitario e correlare la protezione (assenza di viremia dopo infezione sperimentale) con una dose minima di Ag PCV2.

MATERIALI E METODI

Produzione dell'antigene PCV2

Sulla base di prove preliminari di efficacia, per l'amplificazione della massa antigenica di PCV2 sono state scelte cellule di rene suino PK-15c28, persistentemente infette dal ceppo PCV2b "DV6503", isolato in provincia di Mantova nel 1999. Dopo 4-5 giorni di coltura, tali cellule venivano sottoposte a doppio ciclo di congelamento/scongelo a -80° e a centrifugazione (8000 g, 16 minuti, 4°C) per rimuovere i detriti cellulari. Ciascun lotto di produzione veniva poi congelato nuovamente a -80°C in attesa dei controlli d'infettività (titolazione in immuno-fluorescenza su cellule PK-15c28 non infette) e di saggio ELISA con anticorpi monoclonali anti-PCV2.

Sulla base di tali saggi, sono stati prescelti i lotti di PCV2 a più alto contenuto di Ag. Questi sono stati scongelati e inattivati a 4°C con beta-propionio-lattone (BPL) 0,05% finale, inoculato 2 volte, rispettivamente al giorno 0 e al giorno 7 del trattamento. Al giorno 14, il virus è stato sottoposto a controllo di inattivazione su cellule PK-15c28 non infette mediante immunofluorescenza e Real-time PCR sul surnatante delle cellule PK-15 inoculate. Dopo l'esito favorevole del controllo d'inattivazione, il virus è stato concentrato 10X mediante ultrafiltrazione su membrana a taglio molecolare 10 kDa. Il virus inattivato concentrato è stato nuovamente congelato in aliquote a -80°C .

Formulazione del vaccino PCV2 a diverse dosi

Il virus inattivato, ottenuto come sopra descritto, è stato prima chiarificato ancora (8000 g, 16 minuti, 4°C) e poi pellettato mediante ultracentrifugazione su rotore T42.1 a 35.000 rpm per 3,5 ore a 4°C . E' stato allontanato il sovrastante ed il pellet virale è stato risospeso per una notte in frigorifero in 1 ml per tubo di tampone PBS (= concentrazione 25X). Il virus così ottenuto è stato poi aliquotato e conservato a -80°C in attesa dei controlli di processo.

Ciascuna aliquota di virus inattivato è stata sottoposta ad analisi su gradiente lineare di saccarosio 10-25% su rotore SW40 come descritto in precedenza (Zanotti, Amadori, 2015). Secondo tale procedura, dall'area dei picchi UV a 254 nm di PCV2 (coefficiente di sedimentazione 57S) è stata calcolata la concentrazione in nanogrammi/mL. A differenza di quanto ottenuto nel nostro studio precedente (Zanotti, Amadori, 2015), abbiamo valutato la presenza di due distinte popolazioni virali, caratterizzate da lieve differenza di sedimentazione in gradiente di saccarosio, denominate "picco precoce" e "picco tardivo". Per dirimere i possibili dubbi, abbiamo prelevato aliquote di entrambi i picchi, che abbiamo inviato al laboratorio di microscopia elettronica di IZSLER. Le analisi eseguite hanno confermato la presenza di Circovirus in entrambi i picchi. L'identità PCV2 di tali componenti è stata controllata mediante Real-time PCR. Tuttavia, il saggio ELISA sandwich con anticorpi monoclonali murini ha rivelato una fondamentale differenza, poiché una piena reattività è stata evidenziata solo sul "picco tardivo", mentre una reazione nulla o dubbia veniva evidenziata sul "picco precoce". A questo punto, per porsi nelle stesse condizioni realizzate nel progetto IZSLER precedente (Zanotti, Amadori, 2015), è stato deciso di

formulare il vaccino sperimentale sulla base del contenuto antigene del solo “picco tardivo”, rispettivamente a 450, 150, 50, 0 ng/dose (Tabella 1).

Tabella 1. Dosi di antigene PCV2 inoculate nei diversi gruppi di suini

Table 1. PCV2 antigen doses in the different swine groups

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D
Dosi Ag Picco PCV2 “tardivo”	450 ng	150 ng	50 ng	0 ng

Tali dosi di Ag PCV2 sono state ottenute per diluizione in PBS e si riferiscono a 2160 microlitri di volume. A tale volume venne poi aggiunto un volume di 2840 microlitri di adiuvante oleoso del vaccino PCV2 Circovac (CEVA Italia) per ottenere il volume di inoculo di 0,5 mL. Nel gruppo di controllo, l’antigene PCV2 era sostituito da tampone PBS.

Produzione e controllo di PCV2 per infezione sperimentale

Lo stesso ceppo DV6503 di PCV2b è stato nuovamente amplificato mediante propagazione delle cellule persistentemente infette cellule PK-15 sopra descritta.

Il PCV2 infettante per l’infezione sperimentale dei suini vaccinati è stato quantificato sulla base di una diluizione limite accertata in Real-time PCR (ultima diluizione del virus corrispondente ad un abbassamento significativo del “ciclo soglia”). Sulla base di tale risultato, il titolo infettante è stato calcolato mediante saggio di Reed & Muench (dati non mostrati).

Sperimentazione animale

E’ stata ottenuta l’autorizzazione ministeriale alla sperimentazione animale n. 230/2018 del 14/3/2018 ai sensi dell’art. 31 del D.lgs 26/2014.

Venti suinetti di ibrido commerciale “Goland” sono stati trasportati alle stalle autorizzate di IZSLER a 28 giorni di vita dopo lo svezzamento. Gli animali provenivano da 3 distinte nidiate, come risultava da apposita marca auricolare. Gli animali sono stati sottoposti a visita clinica e stabulati in 4 diverse stalle d’isolamento con idonei arricchimenti ambientali (paglia e catenelle pensili). Gli animali sono stati fatti acclimatare al nuovo ambiente e dopo 2 giorni è stato eseguito un prelievo di sangue per valutare la persistenza degli anticorpi materni anti-PCV2 mediante saggio ELISA. Sulla base dei titoli anticorpali, gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi: A, B, C, D equilibrando opportunamente il titolo medio di anticorpi materni e garantendo la presenza di suini delle tre nidiate in ciascun gruppo.

Dopo ulteriore acclimatamento e stabilizzazione, i gruppi sono stati inoculati con i vaccini PCV2 sopra descritti (dose di 0,5 mL per via intramuscolare profonda nella regione del collo) (Tabella 1).

Dopo 21 giorni, è stato prelevato nuovamente il sangue per valutare il profilo della risposta anticorpale e dell’immunità cellulo-mediata (rilascio di interferon-gamma e di interleuchina-10 dopo stimolazione con PCV2 inattivato).

Dopo altri 5 giorni tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 2 ml di PCV2 ceppo DV6503, corrispondenti a 200.000 dosi infettanti mediane 50% calcolate come sopra descritto.

Sono stati effettuati prelievi di sangue al giorno 21 post vaccinazione (PV) e ai giorni 7, 14, 21, 35 post infezione (PI) sperimentale.

Saggio di rilascio di IFN- γ e interleuchina (IL)-10 PCV2 specifico

Il sangue eparinato è stato distribuito in 3 repliche da 0.5 ml in piastra Costar a 48 pz e incubato, rispettivamente, con: 50 μ L di terreno RPMI 1640, PCV2 inattivato BPL e

criolisato PK-15 inattivato BPL. La piastra è stata incubata 16-20 ore a 37°C in 5% CO₂. Successivamente, il plasma è stato raccolto ed è stato trasferito in piastrina ELISA per la determinazione di IFN-gamma suino come precedentemente descritto (Dotti et al. 2013). Dopo misurazione della densità ottica (DO), il campione viene considerato: **positivo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 è superiore o uguale a 0.05 OD; **negativo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 risulta essere inferiore o uguale a 0.019 OD; infine il campione viene considerato **debolmente positivo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 risulta essere compreso tra 0.020 e 0.049 OD. La medesima procedura di analisi e valutazione è stata adottata per il saggio di rilascio di interleuchina 10 (IL-10).

Risposta anticorpale

Gli anticorpi dei suini anti-PCV2 sono stati determinati mediante Elisa Competitiva (IZSLER, MP 04/110 rev 0 – 2012).

PCV2 DNA in siero

La quantificazione del DNA di PCV2 è stata effettuata su campioni di siero tramite Real-Time PCR quantitativa (IZSLER, MP 09/106 rev 0 – 2011). I risultati sono stati espressi come copie genomiche PCV2/ml di siero.

Analisi statistica

Le differenze di titolo anticorpale e di pesi tra gruppi e all'interno dei gruppi sono state analizzate mediante analisi della varianza per misure ripetute. Le prevalenze di reattori IFN-gamma+ e IL-10+ all'interno dei gruppi sono state analizzate con il test esatto di Fisher. La correlazione nei singoli suini tra risposta IFN-gamma e risposta IL-10 è stata analizzata mediante il test di Pearson. Il livello di significatività è stato collocato a $P < 0,05$. Sono state altresì riconosciute tendenze a $P < 0,1$ (GraphPad Prism, Version 3).

RISULTATI

Valutazione clinica

L'infezione sperimentale non ha causato alcun sintomo clinico negli animali. Si sono tuttavia osservate notevoli differenze di accrescimento ponderale tra i diversi suini all'interno di ciascun gruppo, ma non tra gruppi distinti per dose di Ag PCV2 (ANOVA, $P > 0,05$).

Viremia PCV2

Tutti gli animali sono risultati negativi in termini di presenza di copie genomiche di PCV2 il giorno dell'infezione sperimentale. L'analisi in PCR real-time quantitativa ha confermato la presenza di DNA di PCV2 ai giorni 14, 21, 35 post infezione sperimentale, inizialmente nei gruppi di controllo (gruppo D). Al contrario, i soggetti vaccinati sono risultati protetti dall'infezione da PCV2, tranne due animali dei gruppi 50 e 150 ng/dose, i quali hanno mostrato viremia transitoria (Tabella 2). Nessun animale del gruppo a 450 ng/dose ha sviluppato viremia.

Risposta anticorpale

Nel giorno della vaccinazione erano ancora presenti livelli modesti di anticorpi materni, bilanciati nei diversi gruppi. La presenza di tali anticorpi non ha interferito con l'infezione da PCV2 negli animali di controllo in termini di viremia post-infezione sperimentale.

I suini hanno manifestato siero-conversione dopo vaccinazione, significativamente superiore nel gruppo 450 ng rispetto agli altri gruppi (ANOVA, $P < 0,05$). Tuttavia, sui singoli animali il titolo anticorpale non si è rivelato predittivo di protezione verso la viremia (picchi viremici associati a picchi del titolo anticorpale). Dopo l'infezione sperimentale, gli anticorpi ELISA hanno avuto un periodo di sviluppo diverso. Fino al giorno 14 PI, i suini vaccinati hanno mantenuto livelli anticorpali superiori (vedi Figura 1, ma $P > 0,05$). Dal giorno 14 dopo infezione sperimentale in poi, i livelli di Ab ELISA si sono uniformati nei gruppi e sono rimasti elevati fino al giorno 35 PI con differenti fluttuazioni (Figura 1). Già a 21 giorni post infezione non si sono osservate differenze di sieroconversione tra suini vaccinati e di controllo ($P > 0,05$).

Risposta IFN- γ

Rilascio di IFN- γ specifico per PCV2 è stato analizzato in tutti gli animali (Tabella 2). Tutti i suini hanno mostrato un risultato negativo all'inizio dell'esperimento, prima della vaccinazione. Al giorno 21 post vaccinazione, quindi prima dell'infezione sperimentale, la risposta dei soggetti vaccinati era chiaramente diversa da quella dei controlli ed è stata una risposta predittiva di protezione contro la viremia. Inoltre, tutti i soggetti viremici erano IFN-gamma negativi e con titolo anticorpale $\leq 1:100$ a tre settimane dalla vaccinazione, a testimonianza di una stimolazione non efficace del sistema immunitario. In particolare, si è notato che alcuni suini dei gruppi vaccinati A/B/C sono risultati positivi al rilascio di IFN- γ a tre settimane dalla vaccinazione, ma non a 7 giorni dalla infezione sperimentale, data in cui tutti gli animali sono invece risultati negativi all'analisi (tendenza, $P < 0,1$). I suini del gruppo D (gruppo di controllo) sono rimasti negativi in tutti i punti temporali analizzati, prima e dopo infezione sperimentale. In tutti i gruppi vaccinati la frequenza di risposta nel periodo 21 giorni PCV – 35 giorni PI è risultata significativamente superiore a quella dei controlli ($P < 0,01$).

Risposta IL-10

Risposte IL-10 a vaccinazione e infezione sono state osservate in tutti i gruppi ai diversi tempi. Il gruppo 50 ng ha manifestato una prevalenza di risposta significativamente più elevata rispetto al gruppo controllo ($P < 0,05$) a differenza degli altri gruppi vaccinati. Una differenza numerica ($P = 0,11$) è stata osservata nella frequenza di reattori viremici IL-10+, rispetto ai suini viremici IL-10 negativi. Infine, considerando i valori numerici assoluti della risposta svincolati dalle soglie di positività, abbiamo osservato una significativa correlazione positiva ($P < 0,01$) tra risposta IFN-gamma e risposta IL-10 nei suini controllo, ma non nei suini vaccinati. In tali animali l'indice di correlazione è risultato anzi negativo ai dosaggi 150 e 450 ng.

DISCUSSIONE

Le analisi condotte hanno evidenziato come l'infezione sperimentale non abbia causato alcun sintomo clinico negli animali, a conferma dell'assoluta necessità di un potente stressore infettante o non infettante associato a PCV2 per indurre malattia. Inoltre, abbiamo potuto notare differenze notevoli nello stesso gruppo in un parametro produttivo quale il peso (± 20 kg alla macellazione all'interno dei gruppi), per cui a parità di condizioni alimentari si è notata una discrepanza significativa nella crescita. Perciò la protezione virologica (blocco della viremia) indotta dal vaccino non ha sempre corrisposto a parametri produttivi omogenei (incremento ponderale).

Un altro aspetto dedotto dall'analisi dei risultati è che i suini non hanno manifestato siero-

conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano pertanto presenti solo livelli medio-bassi residui di anticorpi materni. Inoltre i suini hanno risposto al vaccino e alla successiva infezione sperimentale con la produzione di anticorpi ELISA proporzionale al dosaggio antigene. Ci riserviamo di ricontrollare nel prossimo futuro i sieri con un saggio di neutralizzazione di PCV2, per poter meglio integrare le osservazioni di cui sopra.

Un ulteriore aspetto riguarda il saggio di rilascio di IFN- γ . Questo saggio su sangue intero si è confermato come procedura affidabile e pratica per valutare l'efficacia dei vaccini PCV2, in accordo con i nostri risultati precedenti (Zanotti et al., 2015). Infatti, a conferma di ciò, la risposta cellulo-mediata a PCV2 è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione della risposta IFN-gamma PCV2-specifica.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato determinare la correlazione tra dose Ag PCV2 e risposta del sistema immunitario. Questo potrebbe essere in effetti un fattore cruciale alla base dell'induzione di immunità protettiva indotta dai vaccini PCV2. Al fine di determinare la massa di antigene PCV2, è stato adottato un sistema di purificazione e quantificazione ed il relativo modello di vaccinazione / infezione sperimentale da PCV2 (Zanotti, Amadori, 2015), per confrontare l'effetto immunizzante di tre differenti dosi di antigene di PCV2 inattivato nello stesso adiuvante. Nelle nostre condizioni sperimentali, le tre dosi (450-150-50 ng/dose) dell'antigene inattivato PCV2 e l'adiuvante commerciale Circovac sono state in grado di indurre a diverso livello una risposta immunitaria protettiva nei suini.

I risultati fin qui ottenuti potrebbero essere utili per i produttori di vaccini in vista di una migliore standardizzazione dei controlli della produzione dei vaccini PCV2 e della loro efficacia. Tale standardizzazione sarebbe inoltre funzionale all'adozione di una politica di riconoscimento dei lotti di produzione del vaccino sulla base della corrispondenza a criteri definiti, nell'ambito del sistema di qualità del processo produttivo.

L'affinamento dei parametri di valutazione ed utilizzo dei vaccini PCV2 ha una notevole importanza per la sicurezza alimentare nella produzione primaria, in quanto la corretta immunizzazione dei suini verso PCV2 produce risultati globalmente positivi per le aziende suinicole. Tale vaccino è alla base di una riduzione dei casi di malattia sostenuti anche da altri agenti microbici (Kixmoller et al., 2008) e del corrispondente fabbisogno di antibiotici in allevamento. Inoltre, la riduzione dei casi di malattia di cui sopra contribuisce globalmente alla condizione di benessere negli allevamenti suinicoli.

CONCLUSIONI

1. In accordo con i nostri dati precedenti, l'infezione sperimentale non ha causato alcun sintomo clinico negli animali, a conferma dell'assoluta necessità di un potente stressore infettante o non infettante associato a PCV2 per indurre malattia.
2. I suini non hanno manifestato siero-conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano pertanto presenti solo livelli medio-bassi residui di anticorpi materni.
3. In accordo con i nostri risultati precedenti (Zanotti et al., 2015), la risposta cellulo-mediata a PCV2 è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione

della risposta IFN-gamma PCV2-specifica. Tale risposta costituisce pertanto un parametro importante di controllo dell'efficacia dei vaccini PCV2.

4. I suini hanno risposto al vaccino e alla successiva infezione sperimentale con la produzione di anticorpi ELISA proporzionale al dosaggio antigene, a differenza di quanto osservato nel nostro studio precedente (Zanotti et al., 2015) in cui era stato impiegato un ceppo PCV2a a differente dosaggio.
5. I risultati fino ad ora ottenuti potrebbero essere utili per i produttori di vaccini in vista di una migliore standardizzazione dei controlli della produzione dei vaccini PCV2 e della loro efficacia. In tal senso, 500 ng/ dose circa di antigene PCV2 (virione inattivato) sarebbero da considerarsi dose minima efficace per una soddisfacente immunizzazione dei suini.

RICONOSCIMENTI

Lo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente IZSLER codice PRC2016013. Gli autori desiderano ringraziare la Signora Cinzia Mantovani (IZSLER, Laboratorio Benessere Animale, Biochimica Clinica e Immunologia Veterinaria) per la preziosa collaborazione tecnica fornita allo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Dotti S, Guadagnini G, Salvini F, et al. Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. *Res Vet Sci* 2013;94:510–517.
2. Kixmoller M, Ritzmann M, Eddicks M, et al. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008;26:3443-3451.
3. Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, et al. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res* 2006;2:6.
4. Tribble, B. R., M. Kerrigan, N. Crossland, M. Potter, K. Faaberg, R. Hesse and R. R. Rowland, 2011: Antibody recognition of Porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18, 749-757.
5. Zanotti C, Martinelli N, Lelli D, Amadori M. 2015. Correlates of Protection Following Vaccination with Inactivated Porcine Circovirus 2 Vaccines. *Viral Immunol.* 2015 Dec;28(10):600-8.
6. Zanotti C, Amadori M., 2015. A simple method for measuring porcine circovirus 2 whole virion particles and standardizing vaccine formulation. *Biologicals.* 2015 Mar;43(2):79-83.

Tabella 2. Saggio di rilascio di IFN- γ . I gruppi A, B, C hanno manifestato positività nel saggio IFN- γ a tre settimane dalla vaccinazione, ma non 7 giorni dopo infezione sperimentale, data in cui tutti gli animali sono risultati negativi all'analisi. I suini del gruppo D (gruppo di controllo) sono rimasti negativi in tutti i punti temporali, prima e dopo infezione sperimentale. I risultati sono espressi come mOD di differenza rispetto al controllo negativo (stimolazione con criolisato di cellule PK-15). p.i. : post infezione. * viremia PCV2 presente.

	Suino	T0	T 21 Post Vaccinazione	T 7 p.i.	T 14 p.i.	T 21 p.i.	T 35 p.i.
450 ng PCV2, GRUPPO A	5	NEG	NEG	NEG	56	77	NEG
	17	NEG	112	NEG	36	NEG	NEG
	18	NEG	57	NEG	64	NEG	NEG
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	35	NEG
	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
150 ng PCV2, GRUPPO B	10	NEG	NEG	NEG	25	NEG	NEG
	12	NEG	20	NEG	29	NEG	NEG
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	19	NEG	NEG	NEG	NEG*	29	NEG
	20	NEG	50	NEG	98	54	NEG
50 ng PCV2, GRUPPO C	11	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG*
	7	NEG	141	NEG	NEG	115	NEG
	8	NEG	NEG	NEG	44	31	NEG
	9	NEG	52	NEG	30	39	148
	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
CONTROLLO, GRUPPO D	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*

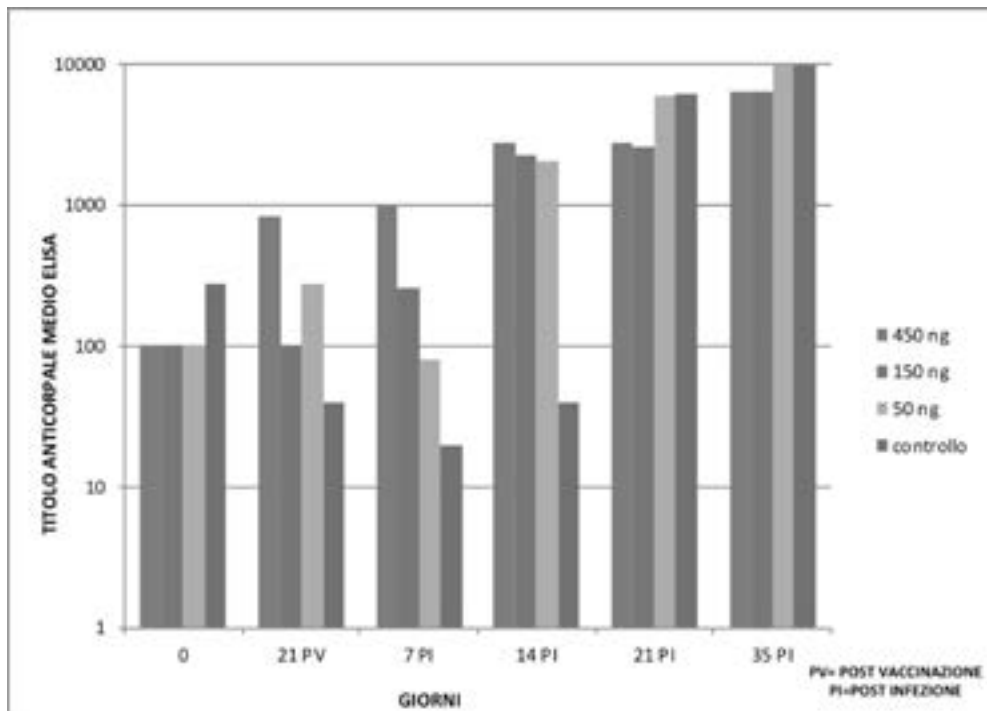


Figura 1. Titolo anticorpale anti-PCV2 misurato in ELISA. I suini non hanno manifestato siero-conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano quindi presenti solo livelli medio-bassi di anticorpi materni residui (T0). I suini hanno risposto al vaccino (21 PV) e alla successiva infezione sperimentale (7, 14, 21, 35 PI) con la produzione di titoli anticorpali ELISA, superiori nei suini vaccinati (differenza numerica) nelle prime due settimane post infezione.