

# IDENTIFICAZIONE DI FENOTIPO LINFOCITARIO CITOTOSSICO E PRODUZIONE DI INTERFERONE- $\gamma$ MEDIANTE MARCATURA INTRACELLULARE NEL SUINO

## *IDENTIFICATION OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTE PHENOTYPE AND INTERFERON- $\gamma$ PRODUCTION BY INTRACELLULAR STAINING IN SWINE*

LUCA FERRARI, ELENA DE ANGELIS, PAOLO MARTELLI,  
PAOLO BORGHETTI.

*Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.*

**Parole Chiave:** marcatura intracellulare, interferone-gamma (IFN $\gamma$ ), citotossicità, linfociti.

**Key Words:** intracellular staining, interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), cytotoxicity, lymphocytes.

**Riassunto.** Scopo del presente studio è stato l'ottimizzazione della tecnica di marcatura intracellulare di IFN $\gamma$  associata alla marcatura di antigeni di superficie (CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , TCR $\gamma/\delta$ , CD16) per l'identificazione di cellule ad attività citotossica innata e specifica mediante citofluorimetria a flusso a seguito di stimolazione policlonale (aspecifica) con PMA/Ionomicina e monoclonale (virus-specifica) con antigene vaccinale di Aujeszky's Disease Virus (ADV). L'ottimizzazione delle fasi della metodica, ossia attivazione *in vitro*, marcatura di superficie e fissazione, permeabilizzazione e marcatura intracellulare di IFN $\gamma$ , hanno permesso l'identificazione di cellule produttrici IFN $\gamma$  per tutti gli antigeni citotossici indagati e la quantificazione delle cellule responsive in animali di differente età. Inoltre, sono state identificate e quantificate le cellule responsive ad ADV a differenti tempi dalla 1a e 2a vaccinazione.

Le condizioni sperimentali ed i risultati ottenuti possono quindi sostenere l'utilizzo di tale metodica in associazione con altre tecniche immunologiche sensibili e specifiche quali il saggio ELISpot per determinare lo stato di reattività del sistema immunitario di animali soggetti a protocolli di vaccinazione o per monitorare la risposta immunitaria a seguito di infezioni in cui quella cellulo-mediata risulta fondamentale per favorire l'eliminazione del patogeno.

**Abstract.** Aim of the present study was the optimization of intracellular staining of IFN $\gamma$  associated with staining of surface antigens (CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , TCR $\gamma/\delta$ , CD16) for identification of innate and acquired cytotoxic immune cells by using flow cytometry following polyclonal PMA-ionomycin (non-specific) and monoclonal Aujeszky's Disease Virus (ADV)-specific (vaccine *Porcilis® Begonia*) stimulation. The optimization of *in vitro* activation, surface staining and fixation, permeabilization and IFN $\gamma$  intracellular staining allowed the identification of IFN $\gamma$  producing cells for all the cytotoxic cell subsets investigated and the quantification of responsive cells in pigs of different age. Furthermore, ADV-specific responsive cells were detected and quantified after the 1st and 2nd vaccination.

On the basis of the experimental conditions and results obtained, intracellular staining of IFN $\gamma$  can be used together with other immunological techniques characterized by high sensibility and specificity such as the ELISpot assay to determine the reactivity status of the immune system in vaccinated animals or to monitor the immune response following infections where the cell-mediated response is fundamental to trigger viral clearance.

## INTRODUZIONE

La possibilità di ottenere informazioni sempre più specifiche sulla reattività del sistema immunitario ha portato allo sviluppo di tecniche per l'identificazione simultanea di molteplici parametri cellulari. L'analisi mediante citofluorimetria a flusso è stata quindi sfruttata sempre più per identificare specifiche sottopopolazioni immunitarie, oltre che per l'espressione di caratteristici antigeni di superficie, anche per la capacità di secernere mediatori della risposta immunitaria quali citochine. In particolare, la risposta delle cellule immunitarie circolanti nel sangue può fornire un quadro di come l'organismo animale stia reagendo a un determinato antigene, sia esso di natura policlonale (es. mitogeni, tossine) o monoclonale (proteine virali, virus, vaccini); nel suino, cellule ad attività citotossica come le cellule Natural Killer (NK), i linfociti T citotossici CD8+ (LTC), i linfociti T  $\gamma/\delta$  (LT $\gamma/\delta$ ) e le cellule memoria (CD4+CD8+) sono le principali sottopopolazioni responsabili della produzione di interferone-gamma (IFN $\gamma$ ) oltre che altre citochine. Per questo, la marcatura intracellulare di IFN $\gamma$ , associata alla rivelazione mediante citofluorimetria a flusso di marcatori di superficie che identifichino tali sottopopolazioni, può essere sfruttata per la caratterizzazione della cinetica e del profilo di espressione di IFN $\gamma$  da parte di cellule del sistema immunitario all'interno di una popolazione cellulare eterogenea (Prussin et al., 1995) e per la caratterizzazione funzionale di tali popolazioni linfocitarie in specifiche malattie (Jung et al., 1993). Lo studio dei meccanismi d'azione delle cellule ad attività citotossica innata e specifica che partecipano alle difese immunitarie dell'organismo può essere approfondito mediante la rivelazione di citochine intracellulari quali IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Sipos et al., 2005).

La valutazione della reattività cellulare *in vitro* caratterizzata dalla produzione di IFN $\gamma$  può essere ricondotta sia ad una risposta ad antigeni che inducono una risposta policlonale o aspecifica, quali PHA, PMA e ionomicina, PWM, oppure ad antigeni che inducono una risposta monoclonale, derivante dalla "memorizzazione" *in vivo* di specifici determinanti antigenici; in quest'ultima categoria di antigeni ricadono proteine virali o strutture virali intere con le quali l'animale può venire a contatto *in vivo*. La caratterizzazione e quantificazione di cellule a fenotipo citotossico produttori IFN $\gamma$  nella specie suina può rivestire un ruolo importante nel seguire la maturazione del sistema immunitario, la reazione ad una vaccinazione, o determinare come il sistema immunitario del suino stia reagendo ad uno stato di infezione. La tecnica di marcatura intracellulare può essere inoltre accoppiata alla tecnica ELISpot, contraddistinta da una sensibilità a livello di singola cellula, in modo da permettere l'identificazione fenotipica delle frazioni cellulari coinvolte nella produzione di IFN- $\gamma$  e la comprensione di come le cellule si attivino (Lopez

Fuertes et al., 1999; Diaz et al., 2005). Nonostante le importanti informazioni ottenibili, ancora limitate sono le applicazioni in campo veterinario relativamente a tale tecnica sia nel suino (Rodriguez-Carreño et al., 2002; Charerntantanakul et al., 2005; Suradhat et al., 2005), che in altre specie domestiche quali il bovino (Walravens et al., 2002) e il cavallo (Paillot et al., 2004). Data l'importanza della risposta Th1 mediata e sostenuta dall'IFN $\gamma$  ricercata mediante vaccinazione per patogeni virali quali Aujeszky's Disease Virus (ADV), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Porcine Circovirus type 2 (PCV2) e le patologie ad essi associate, lo sviluppo e l'applicazione di questa metodica può fornire informazioni fondamentali al fine di progettare vaccini che possano stimolare in modo ottimale l'immunità cellulo-mediata oltre che umorale per una protezione maggiore dell'animale.

## MATERIALI & METODI

### Campioni

I campioni di sangue sono stati prelevati da suini in fase di accrescimento, di età compresa tra 80 e 120 giorni e da suini all'età di macellazione (10 mesi). L'analisi su tali campioni è stata effettuata sia direttamente su sangue intero (100  $\mu$ l), sia dopo isolamento delle cellule mononucleate periferiche (PBMC) mediante soluzione Histopaque-1077<sup>®</sup>. Sono state inoltre isolate PBMC derivanti da sangue di suini vaccinati contro la Malattia di Aujeszky da 4 settimane (88 giorni) e dopo 1 (95 giorni) e 2 (102 giorni) settimane dalla seconda vaccinazione mediante vaccino attenuato gE-/TK- (*Porcilis<sup>®</sup> Begonia - Intervet*). In entrambi i casi sono stati condotti esperimenti sia su cellule isolate che su cellule dopo scongelamento (-80°C).

### Marcatura di superficie e di IFN $\gamma$ intracellulare

PBMC di suino ( $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) sono state sottoposte a trattamenti differenti di incubazione (4, 20, 48 ore) e stimolazione *in vitro* (4, 20 ore) con PMA (5, 25, 50 ng/ml) e Ionomicina (1  $\mu$ M) oppure con vaccino vivo attenuato (ADV gE-/TK-) *Porcilis<sup>®</sup> Begonia* (24, 48 ore; 0.5 MOI), in presenza di Brefeldina-A (BFA, 10  $\mu$ g/ml). Alla fine del periodo di stimolazione, le cellule sono state sottoposte a marcatura di superficie per 15 min. con anticorpi anti-CD8 $\alpha$ -FITC (76-2-11 - Southern Biotech), anti-CD8 $\beta$  (BPG164A - VMRD) + anti-IgG<sub>2a</sub> (M32201 - Caltag Labs), anti-TCR $\gamma/\delta$  (PGBL22A - VMRD) + anti-IgG<sub>1</sub> (M32001 - Caltag Labs) e anti-CD16-FITC (G7 - Serotec), fissate (15 min.) e permeabilizzate (20 min.) con soluzioni Fix&Perm<sup>®</sup> (Caltag Labs) o PFA 4% + Saponina 0.1%. Durante la fase di permeabilizzazione le PBMC sono state marcate a livello intracellulare con anticorpo anti-IFN $\gamma$ -PE (P2G10 - BD Pharmingen) per 15 min. e quindi analizzate mediante citofluorimetro Epics<sup>®</sup> XL-MCL (Beckman-Coulter).

### Analisi statistica

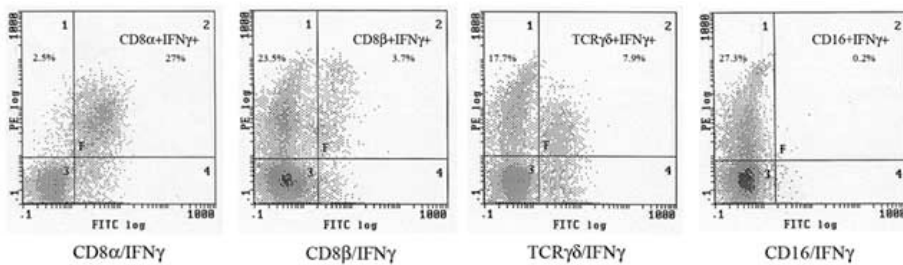
I dati sono stati analizzati mediante Test t di Student e Test di Student a dati appaiati ed espressi come media  $\pm$  deviazione standard dalla media (significatività per  $p < 0.05$ ).

## RISULTATI

L'utilizzo di PBMC isolate da campioni di sangue derivanti da suini in accrescimento (80-120 giorni) e di 10 mesi ha permesso di evidenziare, in generale, maggiori percentuali di cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  totali e ad alta espressione ( $\text{IFN}\gamma^{\text{high}}$ ) rispetto alle analisi condotte su sangue intero. Inoltre non sono state riscontrate differenze significative nei parametri fisici cellulari e di fluorescenza tra campioni processati direttamente e dopo scongelamento (la cui vitalità è stata confermata almeno pari al 99% mediante *Trypan Blue*).

La stimolazione effettuata per 4 ore ha permesso di evidenziare cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  esponenti  $\text{CD8}\alpha$ ,  $\text{CD8}\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma/\delta$  e  $\text{CD16}$ . Trattamenti più prolungati (24 – 48 ore) hanno inibito l'espressione di  $\text{CD16}$ , ma hanno permesso di identificare maggiori frazioni di cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  positive per gli altri antigeni di superficie indagati e non hanno indotto citotossicità o inibizione dell'attività metabolica.

Si è osservato come la quasi totalità di cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  siano  $\text{CD8}\alpha^+$  mentre siano identificabili frazioni variabili di cellule sia negative che positive per gli altri antigeni indagati ( $\text{CD8}\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma/\delta$  e  $\text{CD16}$ ) produttori  $\text{IFN}\gamma$  (Fig.1).

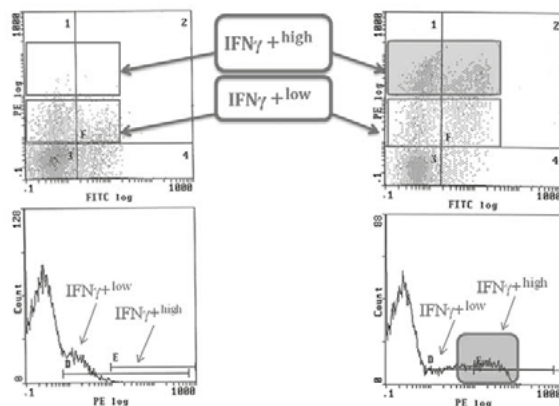


**Fig. 1: Confronto dell'espressione degli antigeni di superficie  $\text{CD8}\alpha$ ,  $\text{CD8}\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma/\delta$  e  $\text{CD16}$  (FITC) e della produzione di  $\text{IFN}\gamma$  (PE) in PBMC di suino a seguito di stimolazione policlonale con PMA e ionomicina.**

**Fig. 1: Comparison of expression of surface antigens  $\text{CD8}\alpha$ ,  $\text{CD8}\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma/\delta$  e  $\text{CD16}$  (FITC) and  $\text{IFN}\gamma$  production (PE) in swine PBMC after polyclonal stimulation with PMA and ionomycin.**

Per quanto riguarda i trattamenti di fissazione e permeabilizzazione, l'utilizzo delle soluzioni del kit commerciale Fix&Perm<sup>®</sup> ha permesso la rivelazione di percentuali di cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  totali più elevate rispetto ai campioni trattati con PFA 4% e Saponina 0.1%.

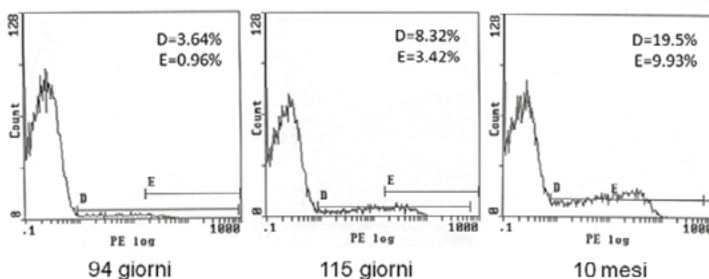
La fissazione e la permeabilizzazione dei campioni con Fix&Perm<sup>®</sup> hanno permesso inoltre l'identificazione di una frazione di cellule a bassa espressione ( $\text{IFN}\gamma^{\text{low}}$ ) ed una frazione ad alta espressione ( $\text{IFN}\gamma^{\text{high}}$ ) (Fig.2): tale profilo è risultato maggiormente evidente nelle sottopopolazioni  $\text{CD8}\alpha^+$  e  $\text{CD8}\beta^+$  ed in misura inferiore nelle sottopopolazioni  $\text{TCR}\gamma/\delta^+$  e  $\text{CD16}^+$ .



**Fig.2: Effetto di differenti soluzioni di fissazione e permeabilizzazione sulla rivelazione di cellule  $IFN\gamma^+$ . PBMC di suino fissate (PFA o FIX<sup>®</sup>) e permeabilizzate (SAP o PERM<sup>®</sup>) dopo stimolazione con PMA e Ionomicina. PFA: Paraformaldeide 4%; SAP: Saponina 0.1%.**

**Fig.2: Effect of different fixation and permeabilisation solutions on the detection of  $IFN\gamma^+$  cells. Swine PBMC fixed and permeabilized after stimulation with PMA and ionomycin. PFA: paraformaldehyde 4%; SAP: saponin 0.1%.**

Per quanto riguarda le modificazioni delle sottopopolazioni  $IFN\gamma^+$  in funzione dell'età degli animali, si è osservato che in suini di età compresa tra 80 e 120 giorni vi è un graduale incremento della percentuale di cellule  $IFN\gamma^+$  totale e  $IFN\gamma^{\text{high}}$ ; la percentuale di PBMC produttori  $IFN\gamma$  (cellule  $IFN\gamma^+$  totali) negli animali al macello (10-13 mesi) è risultata notevolmente superiore rispetto agli animali in accrescimento considerati complessivamente ( $p < 0.05$ ), così come sono risultate aumentate le frazioni doppio positive  $CD8\beta^+IFN\gamma^+$  e  $TCR\gamma\delta^+IFN\gamma^+$  ( $p < 0.05$ ). Contemporaneamente all'aumento della popolazione totale  $IFN\gamma^+$  ( $5.00 \pm 2.24\%$  vs  $20.90 \pm 4.84\%$ ;  $p < 0.05$ ), si è registrato anche un aumento della frazione cellulare  $IFN\gamma^{\text{high}}$  (E,  $1.72 \pm 2.02\%$  vs  $7.28 \pm 2.06\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig.3).

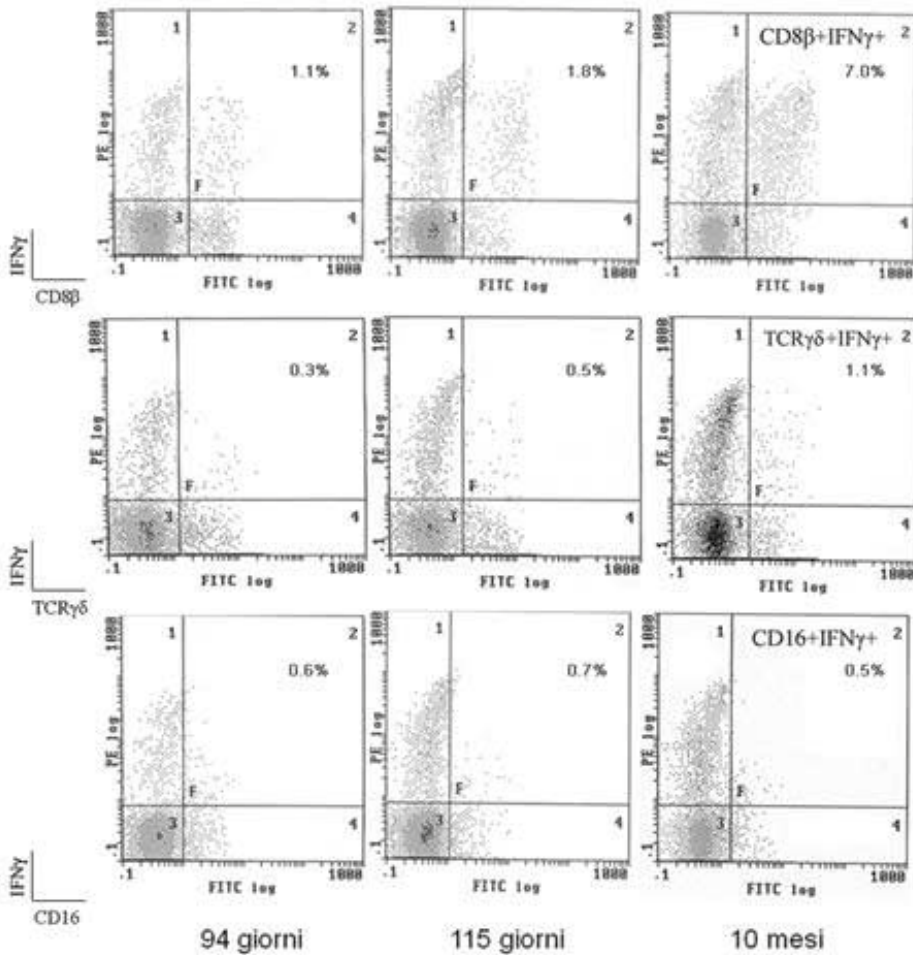


**Fig.3: Livelli di cellule  $IFN\gamma^+$  in funzione dell'età. D: cellule  $IFN\gamma^+$  totali; E: cellule  $IFN\gamma^+$  ad alta espressione ( $IFN\gamma^{\text{high}}$ ) in un suino rappresentativo.**

**Fig.3: Levels of  $IFN\gamma^+$  cells at different ages. D: total  $IFN\gamma^+$  cells; E:  $IFN\gamma^{\text{high}}$  cells in one representative pig.**

In particolare, utilizzando il kit Fix&Perm®, si è potuto evidenziare un incremento della frazione di cellule  $CD8\beta+IFN\gamma+$  dal  $1.34\pm 0.39\%$  al  $7.56\pm 1.78\%$  e della frazione  $TCR\gamma\delta+IFN\gamma+$  dal  $0.49\pm 0.26\%$  al  $1.40\pm 0.38\%$ . La frazione  $CD16+IFN\gamma+$  invece non ha mostrato una modificazione significativa ( $0.70\pm 0.30\%$  vs  $0.44\pm 0.20\%$ ), ma si è ridotto il rapporto tra cellule  $CD16+IFN\gamma+$  e cellule  $IFN\gamma+$  totali ( $14.88\pm 6.93\%$  vs  $3.60\pm 3.94\%$ ;  $p<0.05$ ) (Fig.4).

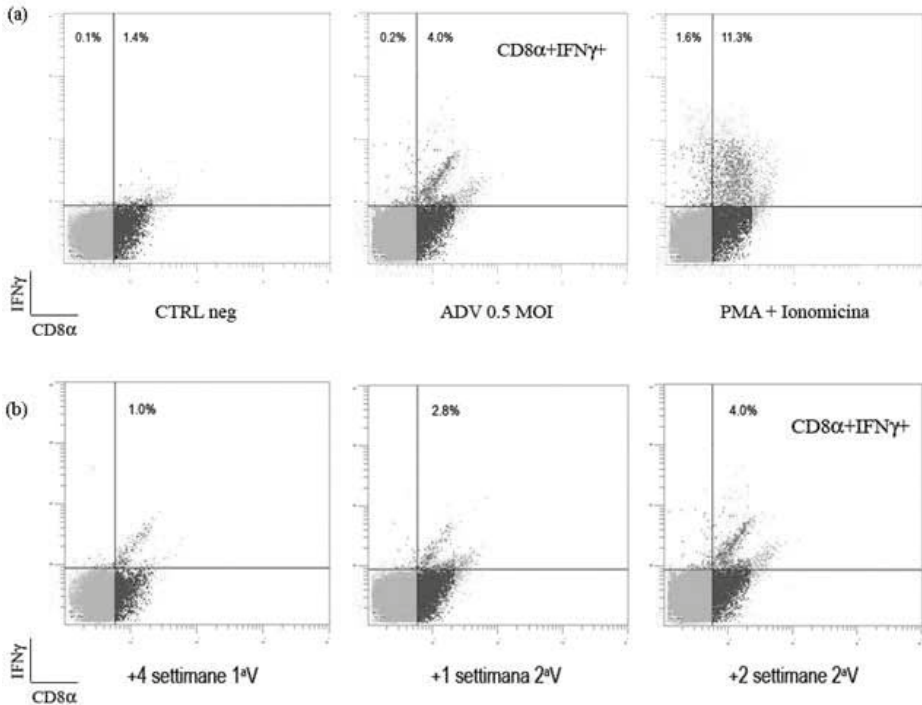
Stesso andamento, è stato riscontrato per tutte le sottopopolazioni utilizzando PFA e saponina, ad eccezione della rivelazione delle cellule  $IFN\gamma^{high}$ , non evidenziabili.



**Fig.4: Livelli di cellule  $CD8\beta+IFN\gamma+$ ,  $TCR\gamma\delta+IFN\gamma+$  e  $CD16+IFN\gamma+$  in funzione dell'età in un suino rappresentativo.**

**Fig.4: Levels of  $CD8\beta+IFN\gamma+$ ,  $TCR\gamma\delta+IFN\gamma+$  e  $CD16+IFN\gamma+$  cells at different ages in one representative pig.**

La stimolazione *in vitro* mediante PMA e Ionomicina è stata quindi sfruttata come condizione di controllo positivo in campioni di PBMC derivanti da suini vaccinati contro la Malattia di Aujeszky con vaccino vivo attenuato *Porcilis® Begonia*. La stimolazione con un quantità di 0.5 MOI di vaccino per 24 ore ha permesso l'identificazione di cellule CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + ADV-specifiche; inoltre monitorando animali vaccinati a distanza temporale dalla prima (60 giorni) e seconda (88 giorni) vaccinazione, si è potuto evidenziare la comparsa e un successivo incremento della frazione di suddette cellule doppio positive. La frazione di cellule CD8 $\alpha$ + non producenti IFN $\gamma$  non è apparsa invece sensibilmente influenzata (Fig.5).



**Fig. 5: (a) Quantificazione di cellule ADV-specifiche CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + dopo stimolazione *in vitro* per 24 ore con vaccino Porcilis® Begonia dopo 2 settimane dalla seconda vaccinazione (mostrate anche le risposte di cellule non stimulate e stimulate con PMA/ionomicina); (b) quantificazione di cellule ADV-specifiche CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + dopo la 1<sup>a</sup> (60 giorni, 1<sup>a</sup>V) e 2<sup>a</sup> (88 giorni, 2<sup>a</sup>V) vaccinazione.**

*Fig. 5: (a) Quantization of ADV-specific CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + cells after *in vitro* stimulation for 24 hrs with Porcilis® Begonia vaccine 2 weeks after the 2<sup>nd</sup> vaccination (also shown the responses of unstimulated and PMA/ionomycin-stimulated cells); (b) quantization of ADV-specific CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ + cells after the 1<sup>st</sup> (60 days, 1<sup>a</sup>V) and 2<sup>nd</sup> (88 days, 2<sup>a</sup>V) vaccination.*

La stimolazione con antigene vaccinale di ADV per un periodo di 48 ore ha permesso l'identificazione di cellule produttrici  $\text{IFN}\gamma$  ma l'intensità del segnale (cellule  $\text{IFN}\gamma^+$  e  $\text{CD8}\alpha^+\text{IFN}\gamma^+$ ) è apparsa sensibilmente ridotta (dato non mostrato).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L' $\text{IFN}\gamma$  è una citochina pleiotropica che gioca un ruolo fondamentale nell'infiammazione e nella risposta immunitaria; potenzia l'attività microbica dei macrofagi e la capacità di processare e presentare antigeni ai linfociti T. Inoltre regola lo *switch* isotipico delle IgG nei linfociti B ed inibisce la proliferazione delle cellule Th2, favorendo l'indirizzamento Th1.

La produzione di  $\text{IFN}\gamma$  è coinvolta anche nelle fasi di risposta ad un'infezione primaria in modo da indurre e stimolare una risposta infiammatoria più efficace e sostenere la risposta immunitaria specifica al fine di eliminare il patogeno.

Sebbene la rivelazione della produzione di tale citochina a livello intracellulare e di antigeni di superficie mediante citofluorimetria a flusso è una procedura ampiamente sperimentata in ambito umano, in immunologia suina i protocolli e i dati presenti in letteratura relativi alle applicazioni di questa metodica sono limitati e forniscono risultati variabili e a volte discordanti.

Nel presente studio si sono quindi ottimizzate condizioni per l'identificazione di  $\text{IFN}\gamma$  intracellulare e marcatori di citotossicità innata e specifica quali  $\text{CD8}\alpha$ ,  $\text{CD8}\beta$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta$  e  $\text{CD16}$ .

Le PBMC si sono rivelate il campione più idoneo per l'identificazione delle sottopopolazioni indagate e non soggette a citotossicità da mantenimento *in vitro* o particolarmente sensibili al congelamento/scongelamento.

Tra le marcature testate, la rilevazione della catena  $\alpha$  del CD8, per l'identificazione delle cellule doppio positive  $\text{CD8}\alpha^+\text{IFN}\gamma^+$ , è apparsa ottimale e contraddistinta da un segnale intenso. La popolazione  $\text{CD8}\alpha^+$  è infatti costituita da più sottopopolazioni tra le quali cellule a fenotipo citotossico naturale (cellule NK  $\text{CD3}^-\text{CD8}\alpha^+\text{CD16}^+$ ), parzialmente specifico (linfociti T  $\gamma\delta$   $\text{TCR}\gamma\delta^+\text{CD8}\alpha^+$ ) e MHC-ristretto (cellule  $\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha^{\text{low}}$  memoria e linfociti T citotossici  $\text{CD4}^-\text{CD8}\alpha^{\text{high}}\beta^+$ ). Il CD8 è espresso nei linfociti T come omodimero  $\alpha\alpha$  (cellule memoria e cellule NK) o come eterodimero  $\alpha\beta$  (CTL, linfociti T citotossici). È stato dimostrato che la densità della molecola sulla membrana cellulare consente di distinguere i linfociti T citotossici,  $\text{CD3}^+\text{CD16}^-$ , dalle cellule NK,  $\text{CD3}^-\text{CD16}^+$ , essendo i primi ad alta densità di  $\text{CD8}\alpha$  ( $\text{CD8}\alpha^{\text{high}}$ ) e la seconda popolazione a bassa densità di  $\text{CD8}\alpha$  ( $\text{CD8}\alpha^{\text{low}}$ ). La sottopopolazione di cellule  $\text{CD8}\alpha$  comprende inoltre una elevata percentuale di cellule memoria a fenotipo  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  produttrici di  $\text{IFN}\gamma$ .

Analogamente la marcatura degli antigeni di superficie  $\text{CD8}\beta$  e  $\text{TCR}\gamma\delta$  è risultata agevole, mentre la marcatura dell'antigene  $\text{CD16}$ , relativa allo stato di attivazione delle cellule NK tra i linfociti, è apparsa fortemente influenzata dal tempo di incubazione e/o stimolazione (4 ore vs 20, 48, 72 ore).

Nelle nostre condizioni, la stimolazione per 4 ore sembra essere il trattamento più adatto per identificare la popolazione di cellule  $\text{CD16}^+$ ; per periodi di stimolazione più lunghi, in animali adulti, si verifica generalmente una diminuzione della percentuale di cellule  $\text{CD16}^+$  mentre in animali giovani il fenomeno non si è manifestato.



I dati presenti in letteratura suggeriscono infatti, che l'antigene può essere esposto per un breve periodo di tempo sulla superficie della cellula dopo attivazione ed internalizzato e/o rilasciato all'esterno della cellula successivamente (Moldovan et al., 1999; Middelhoven et al., 2001).

La stimolazione diretta per 4 ore con PMA e Ionomicina in presenza di Brefeldina A è risultata una condizione più adatta nei campioni di animali di 10 mesi in quanto animali più giovani, in cui le sottopopolazioni IFN $\gamma$ <sup>+</sup> sono meno rappresentate, forniscono un segnale più intenso con una stimolazione più prolungata.

Anche nelle nostre condizioni l'utilizzo delle soluzioni commerciali Fix&Perm<sup>®</sup>, rispetto alla combinazione di PFA e saponina, ha permesso di ottenere i risultati migliori relativamente alla frazione cellulare IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, sia sotto il profilo qualitativo che quantitativo come sostenuto in letteratura (Zelnickova et al., 2007; Gerner et al., 2008).

Le analisi su PBMC di suino hanno mostrato differenze nella percentuale di cellule IFN $\gamma$ <sup>+</sup> tra animali in accrescimento e animali di 10 mesi, con maggiori valori a favore di quest'ultimi. Tale dato è in linea con risultati ottenuti da Rodriguez-Carreño e coll. (2002) riportanti percentuali del 34.2 $\pm$ 5.7% di cellule IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in suini di 3 anni rispetto al 13.2 $\pm$ 5.8% in animali di 6 mesi.

L'aumento registrato in funzione dell'età ha interessato in particolare le sottopopolazioni doppio positive CD8 $\beta$ +IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e TCR $\gamma\delta$ +IFN $\gamma$ <sup>+</sup>. Il cambiamento della percentuale di cellule che producono IFN $\gamma$  in dipendenza dell'età dell'animale riflette un cambiamento qualitativo e quantitativo delle frazioni contenute nelle PBMC e dell'intero sistema immunitario. Esso infatti acquisisce nel tempo una sempre maggior competenza dovuta all'aumento in particolare di cellule effettrici citotossiche (CD8 $\beta$ +IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) che potrebbero appartenere a una popolazione memoria. Infatti, l'aumento della percentuale totale di cellule IFN $\gamma$ <sup>+</sup> osservato può essere ragionevolmente ricondotto ad un aumento della popolazione di cellule memoria CD4+CD8+ [alte produttrici di IFN $\gamma$  se stimolate (Zuckermann et al., 1999)], linfociti T citotossici (CTL) e in minor misura, linfociti T helper 1, linfociti T  $\gamma\delta$  e cellule NK.

La stimolazione per 24 ore con ADV ha permesso di evidenziare cellule a fenotipo CD8 $\alpha$ +IFN $\gamma$ <sup>+</sup> ADV-specifiche. Un'incubazione più prolungata ha indotto un abbassamento del segnale ragionevolmente riconducibile a un possibile effetto citopatico del virus. Le percentuali di cellule ADV-specifiche produttrici di IFN $\gamma$  osservate sono paragonabili a quelle osservate a seguito di stimolazione con virus erpetico analogo nella specie equina (EHV-1; Paillot et al., 2005) e sottolineano una specifica e più ristretta attivazione monoclonale.

L'associazione della metodica di marcatura intracellulare con la determinazione delle cellule secernenti IFN $\gamma$  mediante tecnica ELISpot potrà consentire una identificazione ottimale del fenotipo delle cellule responsive nella valutazione dell'efficienza della risposta immunitaria sia in condizioni di infezione che di vaccinazione. Si segnala inoltre che tale metodica, nel presente lavoro ottimizzata utilizzando ADV, può essere estesa, con le finalità sopra indicate, allo studio della risposta immunitario in corso di altre infezioni del suino.

## Bibliografia

1. Charentantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E., Roth J.A. (2006) Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109, 99-115.
2. Diaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E. (2005) Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of PRRSV. *J. Gen. Virol.*, 86, 1943-1951.
3. Gerner W., Käser T., Pintaric M., Groiss S., Saalmüller A. (2008) Detection of intracellular antigens in porcine PBMC by flow cytometry: a comparison of fixation and permeabilisation reagents. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 251-259.
4. Jung T., Schauer U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 159, 197-207.
5. Lopez Fuertes L., Doménech N., Alvarez B., Ezquerro A., Domínguez J., Castro J.M., Alonso F. (1999) Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection, *Virus Res.*, 64, 39-41.
6. Middelhoven P.J., Van Buul J.D., Hordijk P.L., Roos D. (2001) Different proteolytic mechanisms involved in FcγRIIIb shedding from human neutrophils, *Clin. Exp. Immunol.*, 125, 169-175.
7. Moldovan I., Galon J., Maridonneau-Parini I., Roman Roman S., Mathiot C., Fridman W.H., Sautès-Fridman C. (1999) Regulation of production of soluble Fcγ receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol. Lett.*, 68, 125-132.
8. Paillot R., Daly J.M., Juillard V., Minke J.M., Hannant D., Kydd J.H. (2005) Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1. 23, 4531-4543.
9. Prussin C. e Metcalfe D.D. (1995) Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods*, 188, 117-120.
10. Rodriguez-Carreño M.P., López-Fuertes L., Revilla C., Ezquerro A., Alonso F., Domínguez J. (2002) Phenotypic characterization of porcine IFN-γ-producing lymphocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 259, 171-179.
11. Sipos W., Willheim M., Hofbauer G., Pietschmann P. (2005) Evaluation of the suitability of monoclonal antibodies for flow cytometric intracellular cytokine detection in porcine peripheral blood lymphocytes. *J. Vet. Med.* 52: 55-60.
12. Suradhat S., Sada W., Buranapraditkun S., Damrongwatanapokin S. (2005) The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulation following exposure to classical swine fever virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 197-208.

13. Walravens K., Wellemans V., Weynants V., Boelaert F., deBergeyck V., Letesson J.J., Huygen K., Godfroid J. (2002) Analysis of the antigen-specific IFN- $\gamma$  producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84: 29-41.
14. Zelnickova P., Faldyna M., Stepanova H., Ondracek J., Kovaru F. (2007) Intracellular cytokine detection by flow cytometry in pigs: fixation, permeabilization and cell surface staining. *J. Immunol. Methods*, 327, 18-29.
15. Zuckermann F.A. e Husmann R.J. (1996) Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T-cells. *Immunol.*, 87, 500-512.