

RISPOSTA IMMUNITARIA UMORALE E CELLULO-MEDIATA DOPO VACCINAZIONE SINGOLA VERSO PCV2 IN SUINI SUCCESSIVAMENTE ESPOSTI AD INFEZIONE SPONTANEA

HUMORAL AND CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSE IN PIGS VACCINATED WITH ONE DOSE OF A PCV2 VACCINE SUBSEQUENTLY EXPOSED TO NATURAL INFECTION

BORGHETTI P.¹, FERRARI L.¹, DE ANGELIS E.¹, MORGANTI M.¹, CALEFFI A.², GOZIO S.³, GUAZZETTI S.⁴, MARTELLI P.¹

¹Dipartimento di Salute Animale – Università degli Studi di Parma; ²Medico Veterinario – Mantova; ³ Intervet/Shering-Plough Animal Health – Boxmeer – The Netherlands; ⁴ ASL – Reggio Emilia

Parole chiave: maiale, PCV2, vaccinazione, immunità umorale, immunità cellulo-mediata.

Key words: pig, PCV2, vaccination, humoral immunity, cell-mediated immunity

RIASSUNTO

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la capacità immunogena di un vaccino monodose verso PCV2 allestito con subunità esprimente la proteina Cap in un sistema baculovirus sia in termini di sviluppo della risposta immunitaria umorale (anticorpi totali) che cellulo-mediata (cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche) durante il periodo post-vaccinale e dopo esposizione a infezione naturale in confronto con animali non vaccinati. E' stata condotta una prova di campo in doppio-cieco, randomizzata e con gruppo di controllo su suinetti di un allevamento di 900 scrofe a ciclo chiuso con anamnesi positiva per PMWS in soggetti di età superiore alle 15 settimane. Un totale di 411 suinetti è stato considerato per lo studio. All'inizio della prova (giorno dello svezzamento: 21 ± 3 giorni di età), 205 suinetti (Gruppo vaccinato) hanno ricevuto una dose di vaccino Porcilis PCV[®] per via intramuscolare (2 ml). Lo stesso volume di adiuvante (Diluvac forte) è stato somministrato a 206 suinetti (gruppo placebo-controllo). A trenta suinetti selezionati casualmente (20 dal Gruppo controllo, 10 dal gruppo vaccinato) è stato effettuato un prelievo di sangue a partire da 3 settimane di età per sedici tempi successivi fino alla 35[^] settimana (+32 settimane PV). Sui campioni di sangue sono state effettuate la determinazione degli anticorpi anti PCV2 mediante tecnica ELISA, degli anticorpi verso i principali patogeni responsabili di co-infezione (PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*), e delle cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche mediante tecnica ELISpot. A seguito della vaccinazione si osserva un rapido ed intenso incremento degli anticorpi anche nei soggetti con livelli medio alti di anticorpi di derivazione materna ($p < 0.01$); analogamente, la risposta immunitaria cellulare valutata come cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche si incrementa in maniera consistente e statisticamente significativa. Dopo infezione alti livelli di anticorpi negli animali vaccinati sono associati a ridotta o assente viremia e mancanza di segni clinici. Per quanto riguarda la risposta immunitaria cellulo-mediata emerge che l'intensità della secrezione di IFN- γ appare dipendente principalmente dalla stimolazione *in vitro* (nel nostro caso PCV2 intero), dalla carica virale e dalle potenzialità di replicazione *in vivo*, nonché dal tipo di isolato.

SUMMARY

The present study was aimed at investigating the antibody response and the PCV2 IFN- γ secretion (by ELISpot) after vaccination and exposure to a natural infection, under field

conditions. A double-blinded, randomised and controlled field trial was conducted in a 900 farrow-to-finish sow herd with a history of PMWS in pigs older than 15 weeks. A total of 411 piglets were enrolled in the study. At inclusion (weaning - 21 ± 3 days of age) 205 pigs (Group vaccinated) received a 2ml intramuscular dose of Porcilis PCV[®]. To act as controls, 206 pigs (Group control) were injected with 2mls of Diluvac Forte[®]. Thirty randomly selected piglets (20 controls and 10 vaccinated) were bled at 3 (inclusion /weaning /vaccination) and for 16 times until 35 weeks of age. The sera were tested with a blocking ELISA for the detection of PCV2-specific antibodies in porcine sera, and the titres expressed as log₁₀. Moreover, ELISA tests were performed on sera for the detection of antibodies to PRRSV and M. hyo. The levels of IFN- γ secreting cells (SC) in the peripheral blood of pigs were also determined. After vaccination, there was a rapid and remarkable PCV2-specific IFN- γ secretion, as well as a significant increase in antibodies ($p < 0.01$). After infection high levels of antibodies in the vaccinated animals were associated with a reduced or absent PCV2 viremia, and a lack of specific clinical signs. Moreover, it could be proposed that the intensity of IFN- γ secretion depends mainly on the *in vitro* stimulation (in this case, whole PCV2), on viral load and replication *in vivo* as well as the characteristics of the isolate.

INTRODUZIONE

Sin dagli anni '90 Circovirus tipo 2 del suino (PCV2) è considerato l'agente causale della Sindrome del Deperimento Multisistemico Post-svezzamento (PMWS), una delle principali patologie del suino (Allan et al., 1999). Oggigiorno PCV2 è stato associato ad altre patologie quali la sindrome dermatite-nefropatia del suino (PDNS), il complesso della patologia respiratoria del suino (PRDC), l'enterite e turbe riproduttive, complessivamente riferibile come patologie associate all'iniezione da Circovirus del suino (PCVD) (Segalés et al., 2005). Indagini epidemiologiche hanno mostrato che il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), il virus dell'influenza suina (SIV), parvovirus suino (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* sono i patogeni più comunemente coinvolti in questa sindrome in associazione tra loro e con PCV2 (Chae, 2004). Gli effetti del virus sul sistema immunitario del suino non sono stati ancora completamente delucidati. Lo sviluppo della PMWS è stata correlata ad uno stato di attivazione del sistema immunitario (Krakowka et al., 2001) oppure, è stato suggerito che l'infezione da PCV2 possa causare immunosoppressione (Darwing et al, 2004; Krakowka et al., 2002). Vari studi hanno riportato che l'infezione da PCV2 è in grado di indurre apoptosi delle cellule linfoidi portando così ad estensiva deplezione dei linfociti (Darwing et al, 2004).

Il controllo della PCVD si basa su strategie di gestione, controllo delle co-infezioni e sulla vaccinazione. Il primo vaccino commerciale per PCV2 reso disponibile, basato su virus inattivato con adiuvante, è stato registrato per l'utilizzo nei soli riproduttori (Reynaud et al., 2004). Ad oggi sono in uso tre vaccini commerciali per l'utilizzo in suinetti di 3-4 settimane o di maggior età. Due di questi vaccini si basano sulla proteina Cap espressa in un sistema a baculovirus (Fachinger et al., 2008; Fort et al, 2008), mentre un altro vaccino è costituito da virus chimerico contenente il genoma di un ceppo non patogeno di PCV1 in cui il gene per la proteina capsidica (ORF2-codificata) è stato sostituito con il corrispettivo di PCV2 (Fenaux et al, 2004). È stato dimostrato che l'induzione di una efficiente risposta immunitaria contro la proteina capsidica ORF2-codificata è il principale meccanismo di protezione (Blachard et al, 2003; Nawagitgul et al., 2000).

In condizioni di campo, tutti i vaccini commerciali per PCV2 sono stati in grado di ridurre la

mortalità e la percentuali di animali scarti nonché di migliorare significativamente l'incremento ponderale medio giornaliero (ADWG) in concomitanza alla riduzione della frequenza di co-infezioni negli allevamenti colpiti (Fachinger et al., 2008; King et al., 2008; Kixmoller et al., 2008; Horlen et al., 2008; Thacker et al., 2008; Desrosier et al., 2009). Inoltre, la vaccinazione verso PCV2 è in grado di ridurre l'intensità della viremia, la proporzione di animali infetti e le specifiche lesioni agli organi linfoidi virus-indotte. Al contrario, le conoscenze riguardanti il meccanismo mediante il quale si sviluppa la immunità protettiva sono ancora limitate e oggetto di studio (Fachinger et al., 2008; Fort et al., 2008; Horlen et al., 2008). Alcuni studi dimostrano l'importanza di risposte immunitarie sostenute sia da anticorpali totali e virus-neutralizzanti sia dalla componente cellulo-mediata (Fort et al., 2008; Kixmoller et al., 2008; Fort et al., 2009; Opriessnig et al., 2008a, 2008b).

La maggior parte delle ricerche pubblicate hanno caratterizzato la risposta immunitaria umorale a seguito di infezione da PCV2 sulla base della rilevazione di anticorpi totali anti-PCV2, mostrando la sierconversione sia in animali infetti subclinici (non-PMWS) che in animali infetti con PMWS conclamata (Rodriguez-Arrioja et al., 2002; Larochelle et al., 2003; Sibila et al., 2004; Grau-Roma et al., 2009). Al contrario, il ruolo, i meccanismi e i parametri di efficienza della risposta immunitaria cellulo-mediata in relazione al controllo dell'infezione da PCV2 e alle patologie ad essa associate non hanno ricevuto ancora una adeguata indagine, soprattutto in condizioni di campo. Da alcuni studi sperimentali è emerso che l'immunità cellulo-mediata valutata come numero di cellule secernenti (SC) IFN- γ PCV2-specifiche potrebbero essere responsabili della eliminazione virale parallelamente al ruolo agli anticorpi con attività virus-neutralizzante (Fort et al., 2009a, 2009b). Al contrario, tali aspetti sono ancora da indagare in condizioni di campo sia in animali vaccinati che non vaccinati, naturalmente infettati da PCV2, anche in corso di co-infezioni.

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la capacità immunogenica di un vaccino monodose verso PCV2 allestito con subunità esprimente la proteina Cap in un sistema baculovirus sia in termini di sviluppo della risposta immunitaria umorale (anticorpi totali) che cellulo-mediata (cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche) dopo vaccinazione e dopo esposizione a infezione naturale in confronto con animali non vaccinati.

MATERIALI E METODI

Animali. E' stata condotta una prova di campo in doppio-cieco, randomizzata e con gruppo di controllo su suinetti di un allevamento di 900 scrofe a ciclo chiuso con anamensi positiva per manifestazioni cliniche e relativa mortalità da PMWS in soggetti di età superiore alle 15 settimane. Un totale di 411 suinetti (maschi e femmine) è stato considerato per lo studio. All'inizio della prova (giorno dello svezzamento: 21 \pm 3 giorni di età), 205 suinetti (Gruppo vaccinato) hanno ricevuto una sola dose di vaccino Porcilis PCV[®] per via intramuscolare (2 ml). Lo stesso volume di adiuvante (Diluvac forte) è stato somministrato a 206 suinetti (gruppo placebo-controllo).

A trenta suinetti selezionati casualmente (20 controlli, 10 vaccinati) è stato effettuato un prelievo di sangue a 3 (selezione), 4 (1 settimana post-vaccinazione, PV), 5, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 26 e 35 settimane di età (+32 settimane PV).

Determinazione dei titoli degli anticorpi anti-PCV2. I titoli degli anticorpi anti-PCV2 nel siero sono stati determinati mediante blocking ELISA. In breve, i pozzetti delle piastre sono stati rivestiti O/N a 2-8°C con antigene di PCV2 da ORF2 (proteina Cap) espresso in baculovirus. Dopo opportuni lavaggi si è proceduto al blocco dei siti specifici e sono state aggiunte diluizioni seriali dei sieri da testare. Un campione di siero standard, un campione di siero positivo ed uno negativo sono stati analizzati un parallelo in ciascuna piastra. Dopo opportuni lavaggi è stato aggiunto anticorpo monoclonale biotinilato PCV2-specifico. La

reazione è stata evidenziata con metodo avidina coniugata con perossidasi (APO, DAKO A/S, Danimarca) con TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) come cromogeno. I dati sono stati elaborati ed i titoli anticorpali sono stati calcolati mediante programma Multi-calc con un valore di cut-off impostato al 50% di bloccaggio. Il valore di cut-off di estinzione è stato calcolato a partire dal campione di siero standard positivo e negativo ed i titoli sono stati espressi come \log_2 .

Rilevazione dei titoli anticorpali verso patogeni responsabili di co-infezione. La presenza di anticorpi anti-PRRS e i valori S/P sono stati determinati mediante kit ELISA commerciale (HerdChek* Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kit - IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) secondo le istruzioni del produttore. Gli anticorpi per *M. hyopneumoniae* sono stati valutati mediante kit ELISA commerciali (Herd Check Mycoplasma - IDEXX Laboratories). I risultati sono stati valutati sulla base dei valori di S/P definiti come: (OD campione – OD controllo negativo) / (OD controllo positivo – OD controllo negativo). Valori di S/P ≥ 0.4 sono considerati come positivi.

Determinazione delle cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche. I livelli di cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche nel sangue periferico sono stati determinati secondo Martelli *et al.* (2009). In breve, le PBMC sono state isolate mediante gradiente di densità in Histopaque-1.077[®] e seminate alla densità di 2×10^5 cellule/pozzetto in RPMI-1640 addizionato con 10% FBS (RPMI-1640) in piastre a 96 pozzetti (MultiScreen[®]_{HTS}-IP MSIPS4510 - Millipore) rivestite O/N a 4°C con 10 $\mu\text{g/ml}$ di anticorpo anti-IFN- γ (P2G10 - BD) e bloccate con RPMI-1640 per 2 ore a 37°C. Per la ri-stimolazione *ex vivo* è stata aggiunta una sospensione virale di PCV2 (isolato I12/11 – Boxmeer, The Netherlands) in RPMI-1640 per 20 ore a 37°C, 5% CO₂; la risposta lineare è stata testata tra 0.05 e 0.25 MOI. In tutti i campioni la vitalità delle PBMC è stata $>98\%$ (Trypan blu). Le piastre sono state quindi incubate per 1 ora a 37°C con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ di anticorpo anti-IFN- γ biotinilato (P2C11 - BD) e successivamente con anticorpo anti-biotina coniugato con perossidasi in PBS/0.5% BSA. Si è effettuata infine una incubazione con BCIP/NBT (BioRad) e la reazione è stata bloccata con acqua distillata. La frequenza di cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche è stata determinata mediante lettore ELISpot AID[®]. Come controllo negativo, 2×10^5 PBMC/pozzetto sono state incubate in assenza di stimolo. I valori di base delle cellule non stimolate sono stati sottratti ai rispettivi valori nelle cellule stimolate e la risposta cellulo-mediata è stata espressa come numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche per milione di PBMC (IFN- γ SC/10⁶ PBMC).

Analisi statistica. E' stato applicato un modello di regressione logistica ad effetto misto al fine di considerare la non-indipendenza delle misure ripetute sugli stessi soggetti e l'effetto della scrofa (effetto di nidiate). Nel modello, queste due variabili sono state trattate come "effetti casuali", mentre l'effetto dell'allevamento (due livelli), il sesso, il tempo e il trattamento e le loro interazioni sono state considerate come "effetti fissi". Il modello ha anche tenuto in considerazione la auto-correlazione degli errori per uno stesso suinetto, con un termine auto-regressivo. L'analisi è stata effettuata mediante "lme4" (Bates, D. M., & Sarkar, D. (2007). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes, R package version 0.999375-32).

RISULTATI

La somministrazione del vaccino verso PCV2 ha indotto un aumento di anticorpi specifici con un incremento di circa tre volte superiore rispetto ai titoli iniziali dopo tre settimane dalla vaccinazione ($p < 0.01$). Gli animali con i più alti livelli di anticorpi materni (MDA) al momento della vaccinazione hanno manifestato sierconversione anche se di entità inferiore

rispetto ai soggetti con livelli anticorpali materni più bassi. Negli animali di controllo gli anticorpi acquisiti passivamente sono gradualmente diminuiti e non sono più rilevabili a 9-12 settimane di età.

A tre settimane post-vaccinazione, il numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche ha mostrato un valore massimo di 120 IFN- γ SC/10⁶ PBMC nei soggetti vaccinati, mentre nei controlli tale risposta si è mantenuta a livelli prossimi a zero. A seguito dell'avvenuta infezione a 15-16 settimane di età (dati non mostrati), i livelli anticorpali sono oggetto di un significativo incremento e tali si mantengono sino alla fine dello studio (35 settimane di età) (Figura 1).

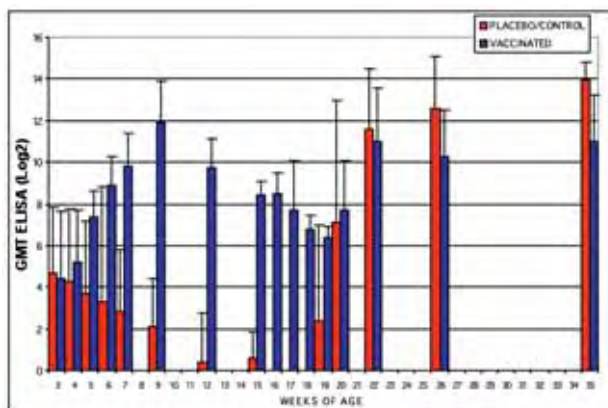


Fig. 1: Andamento dei titoli anticorpali ELISA anti-PCV2 nei suini vaccinati e nei suini di controllo.
Figure 1: Course of geometric mean of the ELISA titres in vaccinated and placebo/control pigs.

Per quanto attiene alle cellule secernenti IFN- γ contestualmente all'incremento dei titoli anticorpali si evidenzia un loro significativo aumento ($p < 0.01$) nel solo gruppo di controllo con valori massimi tra 19 e 20 settimane di età (196 – 244 IFN- γ SC) e il mantenimento di elevati livelli (140 IFN- γ SC) almeno sino a 26 settimane di età.

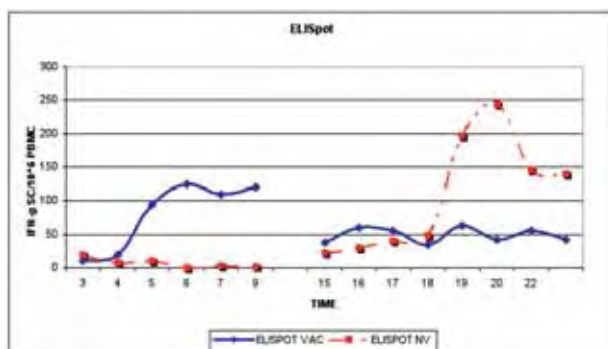


Fig. 2: Andamento del numero di cellule secernenti IFN- γ dopo vaccinazione e infezione. I livelli sono espressi come cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche su 10⁶ PBMC (IFN- γ SC/ 10⁶ PBMC).
Figure 2: Course of the number of IFN-g SC/10⁶ PBMC after vaccination and after infection.

Al contrario, l'infezione negli animali vaccinati e clinicamente protetti mostra un andamento variabile nel tempo con un transitorio aumento della risposta IFN- γ -mediata alla 19^a settimana mentre nelle settimane successive si è mantenuto pressoché costante con valori oscillanti tra 40 e 60 IFN- γ SC.

Per quanto attiene alle sieroprevalenze delle infezioni concomitanti di maggior rilievo (figura 3) si deve segnalare che l'infezione da PRRSV avviene già prima della nona settimana di età,

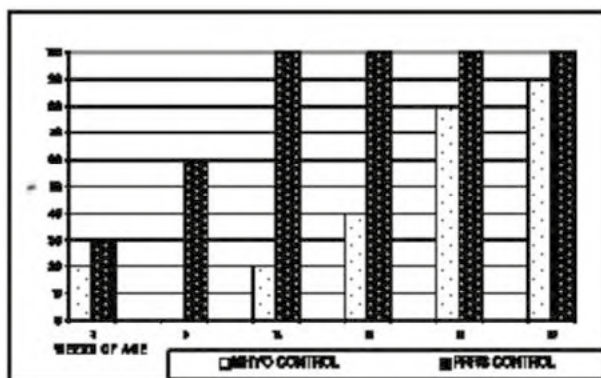


Fig. 3: Andamento delle sieroprevalenze verso M.hyo, PRRSV e PCV2.

Figure 3: Course of the seroprevalence to M. hyo, PRRSV and PCV2 infections.

tanto che a 12 settimane la prevalenza di infezione appare del 100%. Analogamente, titoli rilevabili verso *Mycoplasma hyopneumoniae* si evidenziano a 12 settimane con andamenti ad incrementare nei tempi successivi, testimoniando della diffusione graduale dell'infezione stessa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo studio di campo mettono in evidenza che le infezioni da PRRSV e M.hyo precedono ampiamente quella da PCV2 in quanto si realizzano già durante la fase post-svezzamento in soggetti di età inferiore o prossima alle 9 settimane. In particolare, a 12 settimane di età il 100% degli animali risulta sieropositivo verso PRRSV come effetto dell'avvenuta infezione. La cinetica degli anticorpi verso M. hyo, stante la sieroprevalenza del 20% circa osservata a 12 settimane con tendenza ad incrementare quasi linearmente nel tempo, autorizza a ritenere che questa infezione diffonda contestualmente a quella da PCV2. Poiché l'infezione da M.hyo inizia più precocemente rispetto a quella da PCV2 ed è caratterizzata da lenta diffusibilità, la maggior parte della popolazione si trova a subire la co-infezione di entrambi questi patogeni con una cinetica sovrapponibile.

Nelle condizioni del presente studio si può ritenere che la comparsa tardiva della malattia associata a PCV2 (16-18 settimane di età degli animali) e la relativa mortalità, veda comunque l'intervento di co-infezioni ad insorgenza più precoce o contemporanea che, nel caso di PRRSV, caratterizza tutto il periodo di osservazione.

Nel presente lavoro è stata analizzata la risposta immunitaria umorale, tramite la determinazione degli anticorpi totali misurati mediante la tecnica ELISA e la risposta immunitaria cellulare mediata mediante la determinazione del numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche tramite la tecnica ELISpot. A tale proposito si sottolinea che i valori di anticorpi ottenuti con la tecnica ELISA sono del tutto assimilabili con i titoli IPMA (dati non mostrati).

Dopo la vaccinazione, effettuata a 3 settimane di età, i risultati ottenuti evidenziano che il

vaccino induce la produzione di anticorpi e che, contestualmente, è registrabile un'intensa risposta IFN- γ -mediata PCV2-specifica.

Nei soggetti controllo, non vaccinati e sottoposti a trattamento placebo con il solo adiuvante, il declino degli anticorpi passivi colostrali (MDA) avviene in maniera costante e pressochè lineare nel tempo, cosicché tra la 9^a e la 12^a settimana di età detti anticorpi non sono più rilevabili. Analogamente a quanto riferito da Fort et al. (2008) il vaccino, con una singola somministrazione, si è dimostrato in grado di indurre una precoce e marcata sierconversione già due-tre settimane dopo l'intervento, superando la possibile interferenza degli anticorpi di derivazione materna. Inoltre, i soggetti con titolo ELISA maggiori di $8 \log_2$ al momento della vaccinazione, che nel caso in discussione rappresentano circa il 10% della popolazione campionata, non manifestano né una sierconversione post-vaccinale né un marcato declino anticorpale come evidenziabile invece nei soggetti non vaccinati mostranti gli stessi titoli iniziali. In questi soggetti, infatti, i titoli ELISA si mantengono pressochè costanti. Si deve comunque sottolineare che, in accordo con quanto riportato da Fort et al. (2008), anche i soggetti vaccinati che non mostrano sierconversione, risultano protetti nei confronti dell'infezione (riduzione della viremia) e delle manifestazioni cliniche e dell'eventuale *exitus*.

A seguito dell'infezione, la presenza di anticorpi negli animali vaccinati si accompagna ad assenza di manifestazioni cliniche riferibili alla malattia associata a PCV2 (PCVD) nonché a percentuali ridotte di soggetti viremici, nei quali le quantità di copie di genoma virale/ml di siero risultano costantemente inferiori a 10^6 (dati non mostrati). Al contrario, nei soggetti di controllo, accanto alla comparsa di manifestazioni cliniche specifiche e della mortalità correlata, l'infezione induce la comparsa di anticorpi che tendono ad incrementare per raggiungere valori massimi entro la terza settimana post-infezione. Successivamente al raggiungimento dei valori massimi i livelli anticorpali in entrambi i gruppi si mantengono costantemente elevati sino alla fine dello studio.

Le conoscenze sulla risposta immunitaria cellulare nei confronti dell'infezione da PCV2 sono ancora oggetto di approfondimento in quanto quelle attualmente disponibili si riferiscono a valutazioni effettuate in condizioni di infezione sperimentale.

In questo studio è descritto lo sviluppo della risposta IFN- γ SC sia nel periodo post-vaccinazione che durante il realizzarsi di infezione spontanea con induzione della relativa malattia. Tale valutazione è stata condotta in quanto lo studio dell'infezioni da PCV2 in condizioni sperimentali differisce da ciò che si realizza in condizioni di esposizione naturale, a motivo degli effetti conseguenti alle ben note e frequentemente registrate co-infezioni. Si deve rammentare che negli studi di laboratorio la mancata comparsa delle manifestazioni cliniche specifiche nei soggetti infettati sperimentalmente rappresenta una condizione particolare che non ricalca quanto si realizza in campo per effetto sia delle infezioni multiple che della presenza di co-fattori intrinseci ed estrinseci di esacerbazione della malattia. Inoltre, è stato evidenziato che in condizioni sperimentali, l'efficienza dell'immunità cellulare può variare significativamente in relazione ai carichi virali differenti utilizzati come inoculo ed alle caratteristiche del virus, dal momento che si ritiene possano esservi variazioni di patogenicità tra isolati diversi, nonché all'utilizzo di virus pieno o antigeni purificati nella metodica di laboratorio ELISpot utilizzata (Fort et al. 2008; 2009).

Dopo la somministrazione di una singola dose di vaccino si osserva l'attivazione di una risposta cellulare che si incrementa in maniera consistente fin dalla seconda settimana, mantenendosi elevata nel tempo. Nello stesso periodo il numero di IFN- γ SC nei soggetti di controllo risulta collocarsi su valori basali, prossimi allo zero.

Durante la fase di esposizione/infezione naturale, la risposta delle cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche mostra un andamento nettamente differente tra animali vaccinati e animali non vaccinati. Da 15 a 18 settimane di età, in entrambi i gruppi, tale risposta si mantiene a valori relativamente bassi comunque superiori negli animali vaccinati come residuo dell'attivazione primaria vaccinale. Viceversa, tra la diciottesima e la diciannovesima

settimana di età si assiste a sierconversione in entrambi i gruppi e, negli animali controllo non vaccinati, i valori delle cellule secernenti IFN- γ PCV2-specifiche subiscono un rapido e notevole incremento con mantenimento di valori elevati anche nelle successive settimane di osservazione. Nell'ultimo periodo tali elevati valori di IFN- γ SC PCV2 specifiche si associano ad una riduzione della percentuale di animali virologicamente positivi.

Quest'ultimo riscontro, in animali non vaccinati, infetti e con manifestazioni cliniche o subcliniche riconducibili a PCVD può essere comparabile, seppur con le dovute differenze in termini di "timing" e di gravità dell'infezione, con quanto osservato da Fort et al. (2009) in cui lo sviluppo della risposta IFN- γ -SC nei soggetti infetti anche con malattia subclinica comincia ad essere misurabile nella maggior parte degli animali tra 14 e 21 giorni post-infezione, in coincidenza con il calo del carico virale nel sangue. Tali Autori concludono che la risposta cellulare può contribuire alla clearance virale in associazione con lo sviluppo della risposta umorale PCV2 specifica.

Inoltre, i dati ottenuti negli animali non vaccinati clinici trovano concordanza con un altro lavoro di Fort et al, (2009) in cui si osserva che l'intensità della risposta cellulo-mediata può differire in relazione allo stimolo utilizzato *in vitro*. Infatti, negli animali vaccinati, infettati e non, le risposte alla proteina Cap sono simili o leggermente più alte rispetto a quando viene utilizzato il virus pieno come stimolo. Al contrario gli stessi Autori trovano che negli animali non vaccinati e infettati la risposta IFN- γ -SC ottenuta dopo stimolazione con virus "pieno" è più elevata rispetto a quella ottenuta con la proteina Cap. Queste evidenze suggeriscono che gli animali infetti, in cui il virus si sta replicando, possano rispondere intensamente anche ad altri componenti antigenici del virus.

Anche nel nostro studio in campo, l'elevata risposta IFN- γ SC PCV2 specifica negli animali clinici e con elevati livelli di carico virale, sono da riportare al tipo di re-stimolazione effettuata sui PBMC *in vitro* con virus pieno. Si può ritenere che la produzione di IFN- γ nei PBMC indotta da tale tipo di stimolo, coinvolgendo l'attivazione linfocitaria sia verso proteine antigeniche di tipo strutturale (Cap protein) ma soprattutto verso proteine legate alla replicazione virale (Rep protein), possa essere fortemente incrementata in animali in cui il virus sta replicando in maniera importante *in vivo*. Non è da escludere che la coinfezione in questi animali possa rappresentare un ulteriore cofattore di "iperattivazione" di tale risposta.

Viceversa, si può ragionevolmente ritenere che, negli animali vaccinati in cui vi è assenza di malattia e basso/assente livello di infezione e conseguente viremia, la re-stimolazione *in vitro* dei PBMC con virus PCV2 pieno, evidenzia solo una risposta variabile in un numero di per sé limitato di cellule linfocitarie riattivabili.

Si può quindi ipotizzare che l'intensità della risposta da cellule secernenti IFN- γ potrebbe dipendere fortemente dal tipo di stimolazione *in vitro* (nel caso specifico, struttura intera di PCV2) e dalla carica e replicazione virale nell'animale *in vivo*. Non è da escludere che tale parametro possa essere influenzato anche dal tipo di isolato. Appare pertanto auspicabile che ulteriori approfondimenti sulla risposta immunitaria cellulo-mediata durante l'infezione naturale tramite l'utilizzo anche di altri parametri (espressione *in vivo* di citochine e fenotipizzazione delle cellule linfocitarie IFN- γ secernenti) possano meglio delucidare i meccanismi che si associano al ruolo protettivo dell'immunità cellulo-mediata ed alle differenti evoluzioni cliniche della malattia da PCV2.

Irisultati delle prove di campo, oggetto del presente lavoro, dimostrano che la somministrazione di una singola dose del vaccino utilizzato induce sierconversione anche nei soggetti con livelli di anticorpi di derivazione materna (MDA). Nei soggetti con livelli elevati di MDA al momento della vaccinazione, che nel nostro caso e con la metodica sierologica utilizzato possono essere riferiti a titoli superiori a 8 log₂, pur non realizzandosi sierconversione il declino dell'immunità passiva si realizza più lentamente, facendo comunque in modo

che anche 15 settimane dopo la vaccinazione il grado di protezione conferito dal vaccino sia ottimale nel prevenire la viremia, le manifestazioni cliniche e le lesioni specifiche. Analogamente, si è dimostrato che anche la risposta immunitaria cellulo-mediata PCV2 specifica viene adeguatamente e prontamente indotta dalla singola vaccinazione intervenendo poi anche sui meccanismi di risposta durante l'infezione naturale.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.M., F. Mc Neilly, B.M. Meehan, S. Kennedy, D.P. Mackie and J.A. Ellis *et al.*, Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland, *Vet Microbiol* **66** (2) (1999), pp. 115–123. Bates, D. M., & Sarkar, D. (2007). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes, R package version 0.999375-32.
2. Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflec'h, M.A. Baudouard and P. Cordioli *et al.*, Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins, *Vaccine* **21** (31) (2003), pp. 4565–4575.
3. Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnaud, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec & A. Jesten. An ORF2 protein based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* **94** (2003), pp. 183-194.
4. Chae C., Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology, *Vet J* **168** (1) (2004), pp. 41–49.
5. Darwich L., J. Segalés and E. Mateu, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle, *Arch Virol* **149** (2004), pp. 857–874.
6. Desrosiers, R., Clark, E., Tremblay, D., Tremblay, R., & Polson, D. (2009). Use of a one-dose subunit vaccine to prevent losses associated with porcine circovirus type 2. *Journal of Swine Health and Production*, *17*(3), 148-154.
7. Fachinger V., R. Bischoff, S.B. Jedidia, A. Saalmuller and K. Elbers, The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex, *Vaccine* **26** (2008), pp. 1488–1499.
8. Fenaux M., T. Opriessnig, P.G. Halbur, F. Elvinger and X.J. Meng, A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs, *J Virol* **78** (12) (2004), pp. 6297–6303.
9. Fort M., M. Sibila, A. Allepuz, E. Mateu, F. Roerink and J. Segales, Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins, *Vaccine* **26** (2008), pp. 1063–1071.
10. Fort M., M. Sibila, E. Pérez-Martín, M. Nofrarias, E. Mateu and J. Segalés, One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model, *Vaccine* **27** (2009), pp. 4031–4037.
11. Fort, M., Fernandes, L. T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., et al. (2009). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *129*(1-2), 101-107.
12. Grau-Roma, L., Hjulsgaard, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enoe, C., Casal, J., Botner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J. & Larsen, L. E. 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol* **135**, 272-82.

13. Horlen K.P., S.S. Dritz, J.C. Nietfeld, S.C. Henry, R.A. Hesse and R. Oberst *et al.*, A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2, *J Am Vet Med Assoc* **232** (2008), pp. 906–912.
14. King D., P. DuBois, T. Painter, T. Holck, R. Edler and C. Johnson *et al.*, Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination, *Proceedings of the AASV Congress* (2008), pp. 159–162.
15. Kixmoller M., M. Ritzmann, M. Eddicks, A. Saalmuller, K. Elbers and V. Fachinger, Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2, *Vaccine* **26** (2008), pp. 3443–3451
16. Krakowka S., J.A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D.M. Rings and G. Allan, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2), *Vet Pathol* **38** (1) (2001), pp. 31–42.
17. Krakowka, J.A. Ellis, F. McNeilly, D. Gilpin, B. Meehan and K. McCullough *et al.*, Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection, *Viral Immunol* **15** (4) (2002), pp. 567–582.
18. Larochelle R., R. Magar and S. D’Allaire, Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome, *Can J Vet Res* **67** (2) (2003), pp. 114–120.
19. Martelli P., Gozio S, Ferrari L, Rosina S, De Angelis E, Quintavalla C, Bottarelli E, Borghetti P (2009). Efficacy of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine*, vol. 27; p. 3788-3799
20. Nawagitgul P., I. Morozov, S.R. Bolin, P.A. Harms, S.D. Sorden and P.S. Paul, Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, *J Gen Virol* **81** (Part 9) (2000), pp. 2281–2287.
21. Opriessnig T., A.R. Patterson, D.M. Madson, N. Pal and P.G. Halbur, Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination, *Vaccine* **27** (2009), pp. 1002–1007.
22. Opriessnig T., A.R. Patterson, J. Elsener, X.J. Meng and P.G. Halbur, Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2, *Clin Vaccine Immunol* **15** (2008), pp. 397–401.
23. Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D. M., Patterson, A. R., Pal, N., Carman, S., et al. (2008). Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *Journal of General Virology*, 89(10), 2482-2491.
24. Reynaud G., A. Brun, C. Charreyre, S. Desgouilles and P. Jeannin, Safety of a repeated overdose of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional pregnant filts and sows, *Proceedings of the 18th Congress International Pig Veterinary Society* (2004).
25. Rodriguez-Arrijoja G.M., J. Segales, M. Calsamiglia, A.R. Resendes, M. Balasch and J. Plana-Duran *et al.*, Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *Am J Vet Res* **63** (3) (2002), pp. 354–357
26. Segalés J., G.M. Allan and M. Domingo, Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev* **6** (2) (2005), pp. 119–142.
27. Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A. & Domingo, M. 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* **65**, 88-92.
28. Thacker B., Wilson W., Francisco C, Schuleter R. (2008) Circumvent PCV vaccine: performance evaluation and serological studies update. In: Proceedings of the AASV pag. 153-156.