

CINETICA DELLO SVILUPPO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA IN SUINI SOTTOPOSTI AD INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS DELLA PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME (PRRS)

TIME-COURSE OF THE IMMUNE RESPONSE IN PIGS AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYNDROME VIRUS (PRRSV)

DOTTI S., FERRARI M., LOMBARDO T., MARTINELLI N., RAZZUOLI E., VILLA R., AMADORI M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: immunità, PRRSV, IgA

Key words: immunology, PRRSV, IgA

Riassunto. Scopo di questo lavoro è stato confrontare lo sviluppo temporale dell'immunità umorale e cellulo-mediata in animali *specific pathogen free* (SPF) sottoposti ad infezione sperimentale con il virus della PRRS (tipo I); in particolare, sono stati analizzati anticorpi IgM-IgG, interferon (IFN)- α sierico, IFN- γ sierico ed IgA salivari. Tali parametri sono stati valutati al fine di evidenziare possibili differenze nello sviluppo e nella cinetica della risposta immunitaria nei confronti del virus della PRRS. Gli animali sono stati inoculati con l'agente eziologico per via endonasale due volte, a distanza di 35 giorni l'una dall'altra, per un'osservazione totale di 60 giorni. Una prima analisi dei risultati emersi da questo lavoro ha permesso di evidenziare la presenza di una corretta stimolazione della componente umorale della risposta immunitaria, come già dimostrato in studi precedenti, mentre la risposta virus-specifica in IFN- γ e IFN- α risultava essere assente. Per quanto riguarda le IgA specifiche a livello salivare, è stato evidenziato un andamento altalenante, che non sembra rispecchiare dal punto di vista temporale quello degli anticorpi sierici. Questi dati, da approfondire in studi ulteriori, serviranno a finalizzare le metodiche descritte all'utilizzo nelle condizioni di campo.

Abstract. The aim of this study was to compare the time-course of the humoral and cell-mediated immune response in specific pathogen free (SPF) animals to a PRRS virus experimental infection. In particular, serum IgM-IgG antibody, IFN- α , IFN- γ and mucosal IgA were analyzed. These parameters were evaluated to highlight possible differences in the development of the immune response to PRRSV. Animals were inoculated with PRRS virus by the endonasal route twice, 35 days apart over a total period of 60 days. Data showed a correct humoral response, as demonstrated by others, whereas neither IFN- γ nor IFN- α virus-specific responses were detectable. On the other hand, specific mucosal IgA antibody was fluctuating and its time-course was different from that of serum IgG. These data, to be confirmed in further studies, will be finalized to employ the relevant diagnostic methods on field samples.

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle numerose ricerche volte all'approfondimento delle conoscenze nei riguardi del virus della *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* (PRRS), uno dei temi principali è rappresentato dalla risposta immunitaria; questo argomento rappresenta da sempre uno dei punti meno chiari per comprendere la patogenesi e la reazione dell'ospite nei confronti del virus. La risposta di tipo umorale è quella di più semplice indagine mediante tecniche diagnostiche

routinarie, mentre quella cellulo-mediata è più complessa da indagare sia dal punto di vista delle metodiche di laboratorio utilizzate, che delle difficoltà di interpretazione. Inoltre, di recente, si è cercato di indagare anche altri aspetti connessi alla risposta immunitaria, data la carenza di informazioni e di successi ottenuti nel controllo di questa patologia. Tale approccio ha previsto la valutazione degli anticorpi mucosali (IgA) e la ricerca del virus della PRRS anche nel fluido salivare degli animali (2, 4).

Scopo di questo lavoro è stato valutare la risposta immunitaria di suini *specific pathogen free* (SPF) sottoposti ad infezione sperimentale con PRRSV; in particolar modo, è stato analizzato lo sviluppo della risposta immunitaria umorale e di quella mucosale rispetto alle possibili differenze dal punto di vista della precocità e della durata. Inoltre, è stata analizzata la risposta degli stessi soggetti ad un secondo contatto con virus omologo. Tale ricerca è risultata particolarmente utile al fine della messa a punto di una metodica ELISA atta a valutare la presenza di IgA specifiche contro il virus della PRRS e per un confronto nello sviluppo della risposta umorale e cellulo-mediata.

MATERIALI E METODI

12 suini SPF di circa 40 giorni di vita sono stati sistemati nell'unità di isolamento di IZSLER (Brescia) e suddivisi in due gruppi: 10 animali rappresentavano i soggetti dell'infezione (gruppo 1) e 2 quelli di controllo (gruppo 2), stabulati in ambienti separati. Tutti i suini sono stati controllati per una settimana prima di procedere con la prova sperimentale al fine di consentire l'acclimatamento al nuovo ambiente. Quindi, il gruppo 1 è stato sottoposto ad infezione con il virus della PRRS; l'inoculo era rappresentato da un isolato di campo di tipo I e titolato su MARC-145 (pari a 10^5 TCID₅₀/ml). Ai soggetti è stato somministrato per via endonasale un quantitativo di 2 ml di virus, mentre il medesimo quantitativo di PBS è stato inoculato ai soggetti di controllo. Al giorno 35 post-inoculo, i soggetti del gruppo 1 sono stati nuovamente infettati con il medesimo virus e il gruppo 2 è stato inoculato con PBS con le medesime modalità.

Gli animali sono stati monitorati per un totale di 60 giorni sia dal punto di vista clinico, sia da quello delle indagini di laboratorio. A tal fine, è stata controllata l'eventuale presenza di segni clinici ed una volta sacrificati è stato effettuato l'esame necroscopico di tutti i soggetti. Le indagini hanno previsto di valutare il siero (Real Time RT-PCR, IFN- α , IFN- γ , IgM-IgG), il plasma (IFN- γ come risposta al virus *in vitro*) e la saliva (IgA).

I prelievi ematici e salivari sono stati effettuati con cadenza settimanale dal T0 al T60 mediante l'utilizzo di provette con e senza litio-eparina per il sangue e salivetten® per la saliva. I campioni sono stati trattati in laboratorio per il recupero rispettivamente di siero, plasma e fluido orale. La presenza di IgM e di IgG è stata valutata mediante l'utilizzo di kits del commercio: *LSI PRRS/SDRP-Lissieu, France*; ed *Herdcheck IDEXX Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kit*; l'analisi è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore. Il siero è stato utilizzato anche per rilevare la presenza di RNA virale mediante RT-*Real Time* PCR (2) e sottoposto a test ELISA per la quantificazione di IFN- γ (2). La valutazione di quest'ultima citochina è stata eseguita anche su campioni di sangue intero previo contatto del medesimo con PRRSV, PBS e MARC-145 per 20 ore a 37°C e 5% di CO₂. La lettura della piastra si eseguiva con spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm. I campioni erano considerati positivi se l'OD corrispondente al sangue intero stimolato con il virus della PRRS era maggiore rispetto a quello non stimolato (PBS) e a quello considerato come stimolo aspecifico (MARC-145), con un valore di riferimento positivo di 50 mOD di differenza. L'analisi per valutare la presenza di IFN- α sierico è stata effettuata utilizzando un anticorpo primario (mAb F17, 4 μ g/ml) e un anticorpo secondario (mAb biotinitato Mab-K9 1 μ g/ml); la reazione si rivelava mediante l'utilizzo di streptavidina HRP-coniugata e ortho-phenilenediamina. La lettura veniva eseguita mediante spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 492 nm.

La saliva degli animali è stata valutata per Ab IgA anti-PRRSV tramite metodica ELISA; il test è

stato compiuto previo contatto dei campioni di saliva sia con virus della PRRS purificato sia con solo tampone in fase solida, al fine di evidenziare eventuali segnali di tipo aspecifico. La metodica prevedeva di evidenziare IgA PRRSV-specifiche mediante l'impiego di coniugato anti-IgA suine HRP e di ortho-phenilenediamina al fine di effettuare la lettura a 492 nm. Il risultato è espresso come differenza della media ottenuta dai campioni messi a contatto con l'antigene e la media di quelli senza il medesimo. Il valore di riferimento è pari a 20 mOD.

I due animali di controllo sono stati sottoposti alle medesime analisi indicate per il gruppo 1.

RISULTATI

L'esame clinico degli animali del gruppo 1 ha evidenziato un lieve abbattimento del sensorio e disappetenza nei primi giorni dell'infezione sperimentale. Non è stata riscontrata sintomatologia respiratoria.

Le analisi in Real Time RT-PCR del siero degli animali del gruppo 1 hanno evidenziato la presenza di RNA riconducibile a PRRSV in tutti i soggetti a partire dal T7, con una negativizzazione al T14 (tranne 1 animale). Tutti gli animali sono risultati negativi fino al T35; al secondo contatto con il virus omologo è stata riscontrata positività al T35 di un solo animale prima del secondo contatto col virus, mentre sono risultati tutti negativi in tempi successivi fino al termine della prova. All'esame necroscopico non sono state riscontrate lesioni a carico dell'apparato respiratorio e di altri organi, nonostante dalle indagini di laboratorio sia emerso che amigdale, linfonodi polmonari ed inguinali erano positivi in real Time RT-PCR, mentre tutti i polmoni sono risultati negativi.

Per quanto riguarda la risposta umorale, si è evidenziata la presenza di IgM al T7 in 2 soggetti, con una graduale conversione verso IgG a partire dal T14 che si è completata al T21 ed è perdurata fino al termine della prova (T60).

La valutazione dell'immunità cellulo-mediata ha consentito di verificare livelli di IFN- γ , con un aumento di tali valori a partire dal T7 (risposta aspecifica), con un andamento altalenante fino al T28; il secondo contatto con il virus omologo non ha comportato nessuna risposta negli animali e lo stesso risultato è stato riscontrato anche nei prelievi successivi.

L'analisi della presenza di IFN- α sierico negli animali infettati ha messo in luce una mancata stimolazione di questa citochina durante tutta la prova.

La saliva recuperata dai tamponi ottenuti da ciascun soggetto ha evidenziato la positività di due soggetti al T7 (valori > a 60 mOD), sette al T14, con una successiva negativizzazione al T21. Al secondo contatto cinque animali positivi al T42, sette al T49, con un ritorno entro i limiti di rilevabilità del test al T60.

Gli animali del gruppo 2 non hanno presentato ipertermia e segni clinici di malattia durante tutta la durata della prova sperimentale e sono risultati negativi a tutte le prove di laboratorio eseguite.

DISCUSSIONE

Le analisi compiute hanno evidenziato negli animali del gruppo 1 la presenza del virus a livello sierico e la sua localizzazione nelle amigdale, confermando quanto descritto da altri autori (4). La comparazione tra l'immunità umorale (IgG) e quella cellulo-mediata (IFN- γ e IFN- α), ha messo in luce una totale sieroconversione degli animali infettati a partire dal T7 che si è completata al T14 e mantenuta fino alla fine della prova; tale capacità di risposta non si è estrinsecata a livello cellulare, in quanto i soggetti hanno presentato livelli plasmatici di IFN- γ di tipo aspecifico verso PRRSV. Ciò implica che gli animali riconoscevano "l'aggressione" da parte di un agente esterno con un meccanismo non specifico per il virus PRRS, probabilmente riferibile a cellule "Natural Killer" (CD3-, CD8 α^{\dim} nel suino); soprattutto, tale risposta non si è sviluppata nei successivi prelievi ematici ed è rimasta assente dopo il secondo contatto con il medesimo virus. Anche per IFN- α è stata dimostrata una mancanza di risposta nei confronti dell'infezione, anche dopo il T35.

L'ulteriore indagine per la valutazione delle immunoglobuline mucosali (IgA) a livello salivare, specifiche per PRRSV, ha evidenziato che vi è stata una risposta con un andamento altalenante al primo contatto (aumento al T14), con valori superiori a 20 mOD a partire da T7 dopo la seconda infezione, che si sono mantenuti anche nei prelievi successivi. Tale andamento è differente rispetto a quello dell'immunità umorale sierica, dove, come scritto precedentemente, gli animali hanno una cospicua e stabile risposta in IgG; questa diversa cinetica anticorpale, che andrà ulteriormente approfondita ed indagata, potrebbe essere spiegata da una possibile alterazione da parte del virus non solo della risposta cellulo-mediata, ma anche di quella mucosale, nell'ambito dei meccanismi patogenetici che consentono al virus di dispiegare la sua attività patogena.

CONCLUSIONI

La PRRS è una malattia che presenta molti lati oscuri, non essendo totalmente chiarita l'effettiva interazione tra l'ospite e il virus e in che modo quest'ultimo agisca sul sistema immunitario del suino. Una migliore comprensione di tali meccanismi sarebbe pertanto di notevole utilità sia ai fini della prevenzione che del controllo della malattia (5). A tale fine, le infezioni sperimentali presentano il vantaggio di poter monitorare gli animali in tempo reale senza che vi siano condizioni alteranti la prova; tuttavia, esse non rispecchiano pienamente tutte quelle situazioni di campo cui gli animali sono sottoposti durante il loro ciclo produttivo (6). Quindi, la scelta di eseguire una prova di questo tipo è stata dettata dalla necessità di paragonare la risposta immunitaria di tipo umorale (IgM-IgG), quella cellulare (IFN- γ e IFN- α) e quella mucosale (IgA) e di verificare l'eventuale differenza nell'evoluzione di queste. Tali analisi sono state particolarmente utili anche al fine della messa a punto di metodiche ELISA per la valutazione delle differenti risposte. Attualmente, le possibilità di indagare in modo efficace la risposta cellulo-mediata sono limitate a pochi laboratori. Anche per questo motivo un'ulteriore approfondimento di tali metodiche sarebbe particolarmente utile e di fondamentale importanza per riuscire ad impiegare al meglio i *tests* a disposizione.

Questi dati rappresentano un primo approccio per una valutazione più ampia delle problematiche immunologiche nell'ambito di PRRS, che dovranno essere ulteriormente convalidati da prove di campo (3, 6).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Diaz de Arce H., Artursson K., L'Haridon R., Perers A., La Bonnardiere C., Alm G.V. (1992). "A sensitive immunoassay for porcine interferon-alpha". *Vet. Immunol. Immunopathol.* **30**, 319-327.
- 2) Dotti S., Villa R., Sossi E., Guadagnini G., Salvini F. Ferrari M., Amadori M. (2010) "Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs", doi:10.1016/j.rvsc.2010.06.011
- 3) Gradassi M., Pavesi R., Boniotti B., Nassuato C., Giovannini S., Giacomini E., Bellini S., Pacciarini M., Alborali L. (2010) "PRRSV in campioni di fluido orale: studio longitudinale in condizioni di campo". in: XXXVI "Meeting Annuale Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, Montichiari, 25-26 Marzo", Italia, 225-231.
- 4) Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?". *Virus Res.* **1-2**, 170-6.
- 5) Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Evans RB, Zimmerman JJ "Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions". (2008) *J Vet Diagn Invest.* **2**, 156-63.
- 6) Prickett JR, Zimmerman JJ. (2010) "The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine". *Anim Health Res* **2**:207-16.