

# MODULAZIONE DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE E IMMUNITARIE IN PBMC DI SUINI VACCINATI E NON VACCINATI ESPOSTI A INFEZIONE NATURALE DA CIRCOVIRUS TIPO 2 DEL SUINO (PCV2)

## *MODULATION OF PRO-INFLAMMATORY AND IMMUNE CYTOKINES IN PBMC OF VACCINATED AND UNVACCINATED PIGS EXPOSED TO PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) NATURAL INFECTION*

FERRARI L., MORGANTI M., BORGHETTI P., DE ANGELIS E., MARTELLI P.

*Dipartimento di Salute Animale - Università degli Studi di Parma*

**Parole chiave:** suino, circovirus tipo 2 (PCV2), vaccinazione, infezione, citochine pro-infiammatorie e immunitarie, PBMC.

**Key words:** pig, porcine circovirus type 2 (PCV2), vaccination, infection, pro-inflammatory and immune cytokines, PBMC.

**Riassunto.** Nel presente studio si è valutata la modulazione di citochine pro-infiammatorie (IL-8, TNF- $\alpha$ ) e immunitarie (IFN- $\gamma$ , IL-10) in PBMC di suini vaccinati contro PCV2 con dose singola di un vaccino basato su proteina virale Cap e in suini non vaccinati esposti a infezione naturale. La risposta citochinica negli animali non vaccinati-infetti è stata valutata in relazione al manifestarsi di evidente sintomatologia clinica riconducibile alla sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento (PMWS). I suinetti di un allevamento a ciclo chiuso con anamnesi positiva per PMWS in soggetti di età superiore a 15 settimane sono stati svezzati a  $21 \pm 3$  giorni di età; gli animali del gruppo vaccinato hanno ricevuto una dose di vaccino Porcilis PCV<sup>®</sup> in adiuvante per via intramuscolare (2 ml) mentre lo stesso volume di solo adiuvante è stato inoculato negli animali del gruppo controllo. Sono stati prelevati campioni di sangue prima dell'insorgenza della viremia per PCV2 (16 settimane di età) e successivamente all'avvenuta infezione e comparsa delle manifestazioni cliniche di PMWS (19 e 22 settimane di età). La modulazione citochinica, come livelli di espressione genica mediante real-time PCR, è stata valutata in suini vaccinati (PCV2-vac), suini non vaccinati spontaneamente infettati in assenza di PMWS (Ctrl) e suini non vaccinati infettati che hanno sviluppato PMWS (Ctrl-PMWS+). I livelli di IL-8 sono apparsi più elevati nei soggetti controllo-PMWS+ in fase precoce e più ridotti in fase più tardiva, segnale di uno stato infiammatorio precoce più intenso ed una risposta innata successiva meno efficiente. I livelli di TNF- $\alpha$ , così come di IFN- $\gamma$ , legati ad una risposta innata e adattativa, si sono mostrati più elevati nel gruppo vaccinato ad entrambi i tempi post-infezione. Nel gruppo controllo-PMWS+, bassi livelli di IFN- $\gamma$  a 19 settimane di età sono risultati associati a livelli elevati di IL-10, come condizione predisponente l'insorgenza della PMWS. I risultati sostengono la differente modulazione del profilo citochinico in animali vaccinati ed animali non vaccinati in relazione alla infezione e alla comparsa della patologia associata. Gli animali vaccinati affrontano l'infezione mostrando maggiore reattività cellulare legata all'IFN- $\gamma$  e l'assenza di effetti regolatori negativi legati all'espressione di IL-10, così come l'assenza di stati infiammatori intensi a seguito della infezione.

**Summary.** In the present study the modulation of pro-inflammatory (IL-8, TNF- $\alpha$ ) and

immune (IFN- $\gamma$ , IL-10) cytokines was evaluated in PBMC of pigs vaccinated against PCV2 with a single dose-vaccine based on the viral Cap protein and in unvaccinated pigs exposed to natural infection. The cytokine response in unvaccinated-infected animals was evaluated with regards to evident clinical signs related to post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In a farrow-to-finish herd with a positive history for PMWS in animals aged older than 15 weeks, at weaning (21 $\pm$ 3 days of age) a group of animals (vaccinated group) were inoculated with one dose of Porcilis PCV<sup>®</sup> vaccine + adjuvant by the intramuscular route (2 ml) whereas the same volume of adjuvant only was administered to the control animals. Blood samples were collected before the onset of PCV2 viremia (16 weeks of age), after infection and after the onset of the clinical signs referred to PMWS (19 and 22 weeks of age, respectively). Cytokine modulation was assessed in vaccinated (PCV2-vac), unvaccinated spontaneously infected/PMWS-free (Ctrl) and unvaccinated infected/PMWS-affected (Ctrl-PMWS+) pigs as gene expression levels by real-time PCR. IL-8 levels were higher in Ctrl-PMWS+ pigs early after infection and lower at the later stage, testifying a stronger early inflammatory status and subsequent less efficient innate responsiveness. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels, evidence of innate and adaptive responses, were higher in the PCV2-vac group at both time points. In the Ctrl-PMWS+ group, a lower IFN- $\gamma$  level at 19 weeks of age was associated with high levels of IL-10, as a condition correlated with the onset of the disease. Overall, the results show a different cytokine modulation in vaccinated and unvaccinated-infected pigs also developing PMWS. Vaccinated pigs cope with infection showing stronger cellular reactivity related to IFN- $\gamma$  and absence of a negative regulatory effects due to increase of IL-10 expression, as well as absence of intense inflammatory status following infection.

## INTRODUZIONE

Circovirus tipo 2 (PCV2) è l'agente eziologico della sindrome multisistemica da deperimento post-svezzamento del maiale (PMWS), patologia multifattoriale ampiamente diffusa negli allevamenti suinicoli che rappresenta una delle manifestazioni cliniche delle cosiddette patologie associate a PCV2 (Porcine Circovirus Associated Diseases, PCVD). Oltre a procedure gestionali, la principale strategia per la prevenzione ed il controllo delle patologie associate all'infezione da PCV2 è la vaccinazione. Tra i vaccini sviluppati, è stato dimostrato sia a livello sperimentale sia in campo che i vaccini basati sulla proteina virale capsidica (Cap) sono efficaci in quanto tale proteina costituisce uno dei determinanti antigenici maggiormente immunogenici (Blanchard et al., 2003; Fenaux et al., 2004; Fort et al., 2009a, 2009b; Pérez-Martin, 2010). L'efficacia vaccinale si associa a sierconversione verso PCV2 (comparsa di anticorpi neutralizzanti virus-specifici) e alla riduzione della replicazione virale; sempre maggiori prove sia in condizioni di infezione sperimentale che naturale supportano il coinvolgimento della risposta cellulare nel controllo dell'infezione e dell'evoluzione delle patologie associate (Fenaux et al., 2004; Kixmoller et al., 2008; Fort et al., 2009a, 2009b; Steiner et al., 2009; Pérez-Martin et al., 2010; Martelli et al., 2011).

L'attivazione del sistema immunitario e di risposte specifiche verso il virus o verso componenti virali è tutt'oggi oggetto di studio soprattutto in relazione alla determinazione di correlazioni tra determinanti genetici/antigenici e protezione clinica; informazioni riguardanti la componente cellulare hanno mostrato come la risposta proliferativa PCV2-specifica a seguito di stimolazione *in vitro* è attribuibile sia a linfociti T CD4+ che CD8+ specifici verso la proteina Cap (Wang et al., 2007, Steiner et al., 2009). Anche la produzione di citochine pro-infiammatorie e immunitarie durante l'infezione da PCV2 è di recente studio in soggetti infetti asintomatici e in soggetti affetti da PMWS, in particolar modo a seguito di stimolazione *in vitro* con antigeni virali o sostanze mitogene. Tali indagini

sono state effettuate in tessuti linfoidi primari e secondari (Darwich et al., 2003b; Zhang et al., 2010), polmone (Chae e Choi, 2010) e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) (Kekarainen et al., 2008a, 2008b, 2010; Shi et al., 2010) ma i risultati sono apparsi spesso non univoci, probabilmente per la variabilità delle condizioni in cui sono state determinate.

Nonostante ciò, una caratteristica ritrovata in vari modelli di infezione e di PMWS (soprattutto nei casi di evidente immunosoppressione) è rappresentata dall'incremento dei livelli di espressione o secrezione di IL-10 associati all'insorgenza e sviluppo della patologia, così come di riduzione di IFN- $\gamma$ , citochina fondamentale nella risposta antivirale (Darwich et al., 2003a; Stevenson et al., 2006; Crisci et al., 2010).

Il presente studio ha come scopo la valutazione della reattività cellulare valutata come livelli di espressione genica di alcune delle principali citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ ) e immunitarie (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4) in PBMC di suini vaccinati con singola dose di vaccino basato su proteina Cap di PCV2 in adiuvante e animali non vaccinati successivamente esposti ad infezione naturale da PCV2 anche in relazione alla comparsa di sintomatologia specifica della PCVD (malattia associata all'infezione da Circovirus).

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Lo studio di campo è stato condotto in doppio-cieco e in modo random in suinetti di un allevamento a ciclo chiuso con anamnesi positiva per manifestazioni cliniche e relativa mortalità da PMWS in soggetti di età superiore a 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 PCV2-vac) hanno ricevuto una singola dose di vaccino Porcilis PCV<sup>®</sup> per via intramuscolare (2 ml). Uno stesso volume di solo adiuvante è stato somministrato a 206 suinetti di controllo.

La risposta citochinica è stata valutata in tre gruppi di animali: 1) animali (N = 5) non vaccinati e spontaneamente infettati che hanno manifestato evidente sintomatologia riconducibile a PMWS (Controlli PMWS+: Ctrl-PMWS+) 2) animali non vaccinati (N = 15), spontaneamente infettati da PCV2 che non hanno sviluppato la PMWS (Controlli: Ctrl); 3) animali vaccinati (N = 10) con singola dose di vaccino per via intramuscolare (PCV2-vac) che non si sono infettati e che non hanno sviluppato la malattia.

Lo stato di malattia (PMWS+) è stato determinato attraverso l'attribuzione di uno score clinico basato sulla valutazione del grado di deperimento e l'ingrossamento dei linfonodi inguinali, in associazione a positività in qPCR per PCV2 nel siero con quantità di copie di genoma virale/ml superiore a 10<sup>7</sup> (Martelli et al., 2011).

La presenza di co-infezioni e la quantificazione di titoli anticorpali verso PRRSV, *M. hyopneumoniae*, ADV, A. pleuropneumoniae e virus dell'influenza suina (SIV) sono stati determinati mediante kit specifici in commercio come ampiamente descritto da Martelli et al. (2011).

Sono stati effettuati prelievi di sangue a 16 settimane di età (fase immediatamente precedente l'insorgenza della viremia da PCV2), a 19 e 22 settimane rispettivamente dopo la comparsa dell'infezione e a malattia conclamata nei soggetti appartenenti al gruppo (PMWS+).

### **Isolamento di PBMC di suino ed estrazione di RNA totale.**

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state separate ed isolate mediante gradiente di densità in soluzione Histopaque-1077<sup>®</sup> e la successiva estrazione di RNA totale cellulare è stata effettuata mediante soluzione TRI-reagent<sup>®</sup> (Ambion) secondo le istruzioni riportate dal produttore. Il grado di purezza e la concentrazione sono state determinate mediante spettrofotometria UV (260/280 nm). L'RNA totale estratto (1  $\mu$ g) è

stato retro-trascritto in DNA complementare (cDNA) con kit High-capacity cDNA Reverse Transcription® kit (Applied Biosystems).

### Quantificazione dell'espressione genica in PBMC mediante real-time PCR.

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato come DNA stampo per la real-time PCR. La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore StepOne™ (Applied Biosystems, StepOne software v. 2.1). Il cDNA (20 ng, 1 ng/μl) è stato amplificato in duplicato con Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG® (Invitrogen) e primer specifici per le citochine di suino a concentrazioni ottimizzate secondo dati in letteratura (von der Hardt et al., 2002; Royae et al., 2004; Meissonnier et al., 2008) e utilizzando il software Primer Express (Tab. 1). Il gene housekeeping GAPDH è stato scelto come controllo endogeno secondo Fisher et al. (2006) e Ferrari et al. (2010). Le reazioni di PCR hanno previsto uno step iniziale a 95°C per 20" e 40 cicli costituiti da denaturazione a 90°C per 3" e annealing/estensione a 60°C per 30" (protocollo "PCR Fast" - Applied Biosystems). Il segnale dovuto all'incorporazione di SYBR® Green è stato acquisito alla fine di ciascuno step di estensione. Un controllo negativo (assenza di cDNA) è stato aggiunto in ciascun set di reazioni. Un'analisi mediante curva di denaturazione (gradiente da 60°C a 95°C) è stata effettuata per valutare l'amplificazione specifica del gene indagato e l'assenza di prodotti aspecifici (es. dimeri di primer) al termine di ogni reazione. I risultati sono stati analizzati mediante metodo del delta-delta-Ct (Shi et al., 2010), e i livelli di espressione di ciascuna citochina normalizzati con i livelli di GAPDH ed espressi come quantità relative sono stati calcolati rispetto al livello di espressione in animali vaccinati per PCV2 non infetti in una fase molto precoce del periodo post-esposizione (accertata assenza di infezione da PCV2).

Gene	Sequenza primer (forward - reverse)
<b>IL-8</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'
	<i>rev</i> 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'
<b>TNF-α</b> (Meissonnier et al., 2008)	<i>for</i> 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'
	<i>rev</i> 5'-GGCGACGGGCTTATCTGA-3'
<b>IFN-γ</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-TGGTAGCTCTGGGAACTGAATG-3'
	<i>rev</i> 5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'
<b>IL-10</b> (Royae et al., 2004)	<i>for</i> 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'
	<i>rev</i> 5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAGAAA-3'
<b>GAPDH</b> (Primer Express)	<i>for</i> 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'
	<i>rev</i> 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'

**Tab. 1:** Sequenze primer delle citochine pro-infiammatorie (IL-8, TNF-α) e immunitarie (IFN-γ, IL-10) indagate. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno.

### **Analisi statistica.**

L'analisi statistica volta ad evidenziare differenze significative tra i gruppi di animali esposti ad infezione da PCV2 e in relazione al tempo sperimentale indagato è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) e test di Dunnet. Il grado di significatività è stato definito per  $p < 0.05$ .

### **RISULTATI**

Lo studio ha previsto la valutazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie e immunitarie in PBMC di suini vaccinati verso PCV2 e di suini non vaccinati che hanno manifestato o meno la patologia associata all'infezione.

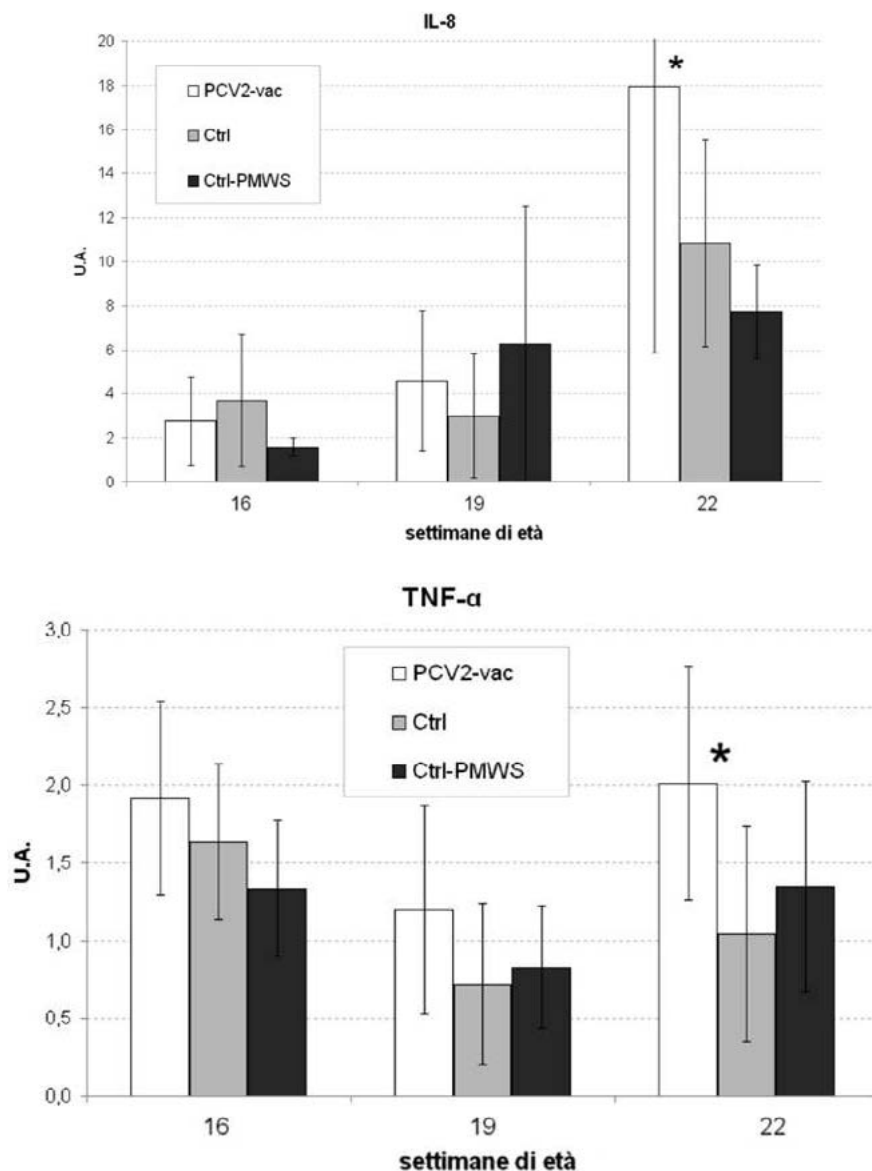
Nel periodo in cui è avvenuta l'infezione naturale si sono potute evidenziare modificazioni significative dell'espressione genica delle citochine indagate.

I livelli di espressione genica di IL-8 hanno evidenziato una tendenza ad incrementarsi nel tempo, con valori più elevati negli animali vaccinati a 22 settimane di età rispetto ai due gruppi controllo ( $p < 0.05$ ; Fig. 1).

L'espressione di TNF- $\alpha$  è risultata più elevata negli animali vaccinati a 19 settimane e soprattutto a 22 settimane di età ( $p < 0.05$ ; Fig. 1).

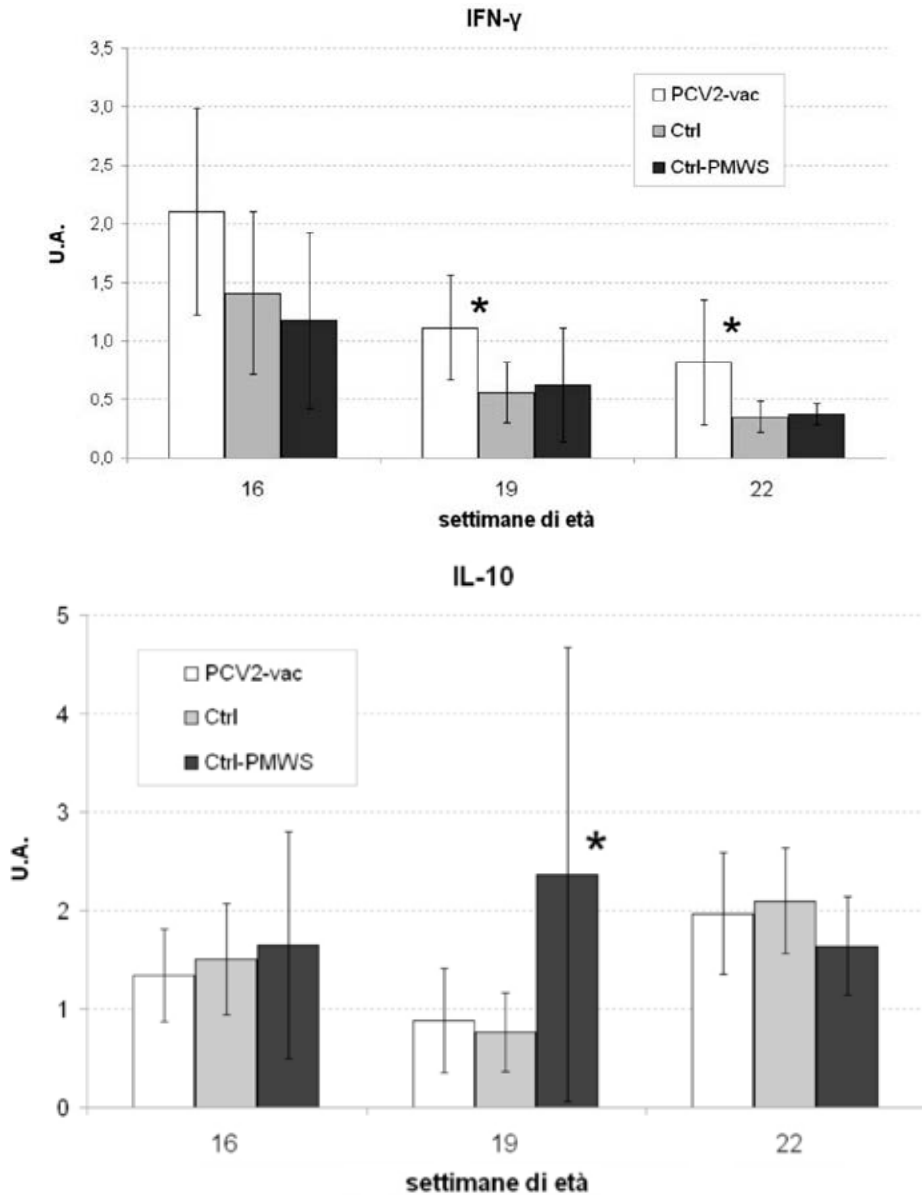
I livelli di IFN- $\gamma$  sono risultati statisticamente più elevati negli animali vaccinati-esposti (PCV2-vac) a 19 e 22 settimane di età ( $p < 0.05$ ) in confronto con i livelli di IFN- $\gamma$  sia negli animali controllo che hanno sviluppato la PMWS (Ctrl-PMWS+) sia negli animali che non hanno manifestato la patologia (Ctrl) (Fig. 2).

Il livello di espressione di IL-10 è risultato significativamente più elevato nel gruppo Ctrl-PMWS+ a 16 settimane PV ( $p < 0.05$ ) in confronto con gli animali del gruppo PCV2-vac e Ctrl (Fig. 2).



**Fig. 1:** *Espressione genica delle citochine pro-infiammatorie IL-8 e TNF- $\alpha$  in PBMC di suini vaccinati (PCV2-vac) e non vaccinati in assenza (Ctrl) o presenza (Ctrl-PMWS) di PMWS esposti a infezione naturale da PCV2. I dati sono mostrati come valori medi  $\pm$  deviazione standard. U.A.: unità arbitrarie. (\*):  $p < 0.05$*

**Fig. 1:** *Gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL-8 and TNF- $\alpha$  in PBMC of vaccinated (PCV2-vac) and unvaccinated PMWS-free (Ctrl) or PMWS-affected (Ctrl-PMWS) pigs exposed to PCV2 natural infection. Data are shown as mean values  $\pm$  standard deviation. U.A.: arbitrary units. (\*):  $p < 0.05$*



**Fig. 2:** Espressione genica delle citochine immunitarie IFN- $\gamma$  e IL-10 in PBMC di suini vaccinati (PCV2-vac) e non vaccinati in assenza (Ctrl) o presenza (Ctrl-PMWS) di PMWS esposti a infezione naturale da PCV2. I dati sono mostrati come valori medi  $\pm$  deviazione standard. U.A.: unità arbitrarie. (\*):  $p < 0.05$

**Fig. 2:** Gene expression of the immune cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 in PBMC of vaccinated (PCV2-vac) and unvaccinated PMWS-free (Ctrl) or PMWS-affected (Ctrl-PMWS) pigs exposed to PCV2 natural infection. Data are shown as mean values  $\pm$  standard deviation. U.A.: arbitrary units. (\*):  $p < 0.05$

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente studio sono stati analizzati i cambiamenti dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie e immunitarie in suini vaccinati per PCV2 mediante vaccino basato su proteina virale Cap ed in animali non vaccinati, successivamente esposti ad infezione naturale in relazione all'insorgenza di manifestazioni cliniche riconducibili a PMWS. Informazioni sull'attivazione di mediatori immunitari quali le citochine e sulle sottopopolazioni cellulari coinvolte nella loro produzione in scenari di infezione singola e/o co-infezioni sono alla base del miglioramento delle strategie e dei protocolli vaccinali finalizzati al controllo delle problematiche associate.

Gli animali considerati nello studio sono stati monitorati nel periodo post-esposizione e successiva infezione naturale con prelievi di sangue e relative indagini molecolari effettuati a 16, 19, 22 settimane di età.

La modulazione dell'espressione di una citochina pro-infiammatoria come l'IL-8 negli animali del gruppo non vaccinato che hanno manifestato PMWS può essere riconducibile ad uno stato infiammatorio precoce più pronunciato legato all'insorgenza dell'infezione mentre, successivamente, la riduzione di tale citochina può testimoniare una risposta difensiva innata meno efficiente. Questi dati sono in accordo con quanto descritto in letteratura a seguito di ristimolazione *in vitro* di PBMC (Darwich et al., 2003a). Viceversa, si può considerare che gli animali vaccinati, in cui la reattività immunitaria verso PCV2 si è mantenuta efficiente (presenza di anticorpi PCV2-specifici e di cellule secernenti IFN- $\gamma$ ; dati non mostrati, Martelli et al., 2011), in seguito all'infezione non necessitano di attivare meccanismi infiammatori precoci mentre nelle fasi di infezione più avanzata mostrano capacità pro-infiammatoria più elevata rispetto agli animali non vaccinati. In questi ultimi tale espressione potrebbe essere modulata in senso negativo dall'infezione. In altre parole, negli animali vaccinati, ciò potrebbe testimoniare una maggior reattività della risposta innata con replicazione virale assente o minima. I valori ottenuti in fase avanzata di infezione (22 settimane di età) trovano corrispondenza nel riscontro di livelli ridotti di IL-8 nei tessuti linfoidi con il progredire della patologia e l'aumento delle lesioni stesse (Darwich et al., 2003b).

I livelli di TNF- $\alpha$  si sono mantenuti inferiori nei due gruppi non vaccinati. Tale comportamento, che conferma una ridotta efficienza della risposta immunitaria infiammatoria/innata, potrebbe trovare una spiegazione patogenetica soprattutto nel ruolo esercitato dalla co-infezione sostenuta da PRRSV, virus in grado di inibire/ritardare la risposta legata a tale citochina (Borghetti et al., 2010), più che dall'infezione singola da PCV2 (Shi et al., 2010).

Le citochine immunitarie antagoniste, IFN- $\gamma$  e IL-10, hanno mostrato livelli opposti nella fase precoce della infezione da PCV2; in particolare, gli animali del gruppo Ctrl-PMWS+ hanno mostrato livelli di IL-10 significativamente maggiori rispetto agli altri due gruppi e, pur con ampia variabilità individuale, si deve segnalare la presenza di valori molto elevati in alcuni animali. Al contrario, ad entrambi i tempi post-esposizione 19 e 22 settimane di età, i livelli di IFN- $\gamma$  si sono mantenuti su livelli superiori negli animali vaccinati-esposti.

Tali risultati confermano come anche nelle condizioni di infezione naturale da PCV2 ed in presenza di co-infezioni, la modulazione citochinica coinvolga alterati livelli di IL-10 come possibile fattore predisponente l'insorgenza della PMWS (Stevenson et al., 2006). Rispetto ad altre citochine infatti, l'aumento dell'espressione e produzione di IL-10 sia a livello tissutale che nelle PBMC è una evidenza che si riscontra sia in studi sperimentali di infezione singola da PCV2 che in casi di co-infezione da PCV2 e PRRSV (Shi et al., 2010; Kekarainen et al., 2008b).

L'aumento di IL-10 negli animali non vaccinati potrebbe anche essere correlabile ai livelli più ridotti delle citochine pro-infiammatorie indagate oltre che dei livelli di IFN- $\gamma$  come quadro di regolazione immunosoppressiva negli animali con PMWS (Shi et al., 2010). L'IL-10 durante l'infezione da PCV2 e l'insorgenza delle patologie associate è prodotta principalmente da cellule della linea monocitaria-macrofagica e dendritica ma anche cloni di cellule T, resi anergici dalla prolungata stimolazione antigenica, potrebbero essere responsabili della produzione di tale



citochina; infatti PCV2 è in grado di indurre rilascio di IL-10 dalle PBMC e a livello tissutale (Darwich et al., 2003a; Kekarainen et al., 2008b; Crisci et al., 2010).

La valutazione della risposta mediata da IFN- $\gamma$  riveste un ruolo chiave in quanto tale citochina è responsabile della regolazione ed amplificazione della risposta antivirale. I livelli più elevati di IFN- $\gamma$  negli animali vaccinati sostengono la maggior reattività in animali in cui l'infezione è contrastata in modo rapido ed efficace tanto da non determinare riscontro di viremia come osservato nella presente ricerca (dati non mostrati, Martelli et al., 2011).

I quadri di associazione tra titoli virali nel siero e incremento dell'espressione di IFN- $\gamma$  nonché della frequenza di cellule secernenti IFN- $\gamma$ , sottolineano l'importanza dell'attivazione cellulare a fianco della risposta umorale anticorpale nella limitazione della replicazione di PCV2 (Meerts et al., 2005; Fort et al., 2009a, 2009b; Martelli et al., 2011). Livelli di espressione ridotta di IFN- $\gamma$  sono stati riscontrati sia in PBMC (Darwich et al., 2003a; Sipos et al., 2004; Shi et al., 2010) che nei tessuti linfoidi (Darwich et al., 2003b) di animali affetti da PMWS. Anche in questo caso l'effetto osservato può essere la risultante della sinergia data dalle co-infezioni (Shi et al., 2010).

Il profilo dell'espressione genica di IFN- $\gamma$  nelle PBMC è apparso di senso opposto rispetto a quanto osservato per i livelli di cellule secernenti tale citochina quantificati mediante tecnica ELISpot (Martelli et al., 2011): in entrambi i gruppi di animali controllo, la minor espressione di IFN- $\gamma$  è associata a livelli fortemente più elevati di cellule secernenti IFN- $\gamma$ . Il comportamento opposto in relazione alle due metodiche utilizzate può essere messo in relazione al fatto che le cellule secernenti IFN- $\gamma$  sono state quantificate a seguito di ri-stimolazione con ceppo virulento di PCV2 mentre l'espressione genica può essere la risultante della presenza di co-infezioni. Inoltre, animali vaccinati possono necessitare di un numero minore di cellule secernenti per contrastare l'infezione in quanto più efficaci in termini di capacità e cinetica di secrezione in relazione al loro stato di memorizzazione rispetto agli animali che non sono stati vaccinati.

I risultati del presente studio sostengono la differente modulazione del profilo citochinico in animali vaccinati con vaccino basato sulla proteina Cap di PCV2 ed animali non vaccinati in cui diffonde l'infezione e compare la patologia associata. Gli animali vaccinati affrontano l'infezione mostrando maggiore reattività cellulare legata all'IFN- $\gamma$  ed assenza di effetti regolatori negativi legati all'espressione di IL-10, così come l'assenza di stati infiammatori intensi a seguito dell'esposizione ed infezione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Blanchard P., Mahe D., Cariolet R., Keranflec'h A., Baudouard M.A., Cordioli P. et al. (2003) Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins, *Vaccine* 21, 4565-4575.
2. Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Franceschi V., Bottarelli E., Martelli P. (2010) Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (in stampa).
3. Chae J.S. e Choi K.S. (2010) Proinflammatory cytokine expression in the lung of pigs with porcine circovirus type 2-associated respiratory disease. *Res Vet Sci* (in stampa).
4. Crisci E., Ballester M., Dominguez J., Segalés J., Montoya M. (2010) Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol.* 136, 305-310.
5. Darwich L., Balasch M., Plana-Durán J., Segalés J., Domingo M., Mateu E. (2003a) Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol.* 84, 3453-3457.

6. Darwich L., Pié S., Rovira A., Segalés J., Domingo M., Oswald I.P., Mateu E. (2003b) Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* **84**, 2117-2125.
7. Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F. e Meng X.J. (2004) 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**, 6297-6303.
8. Ferrari L., Borghetti P., Gozio S., De Angelis E., Ballotta L., Smeets J., Blanchaert A., Martelli P. (2011). Evaluation of the immune response induced by intradermal vaccination by using a needle-less system in comparison with the intramuscular route in conventional pigs. *Res Vet Sci* **90**, 64-71.
9. Fisher, T., Buttner, M., Rziha, H.J. (2006). T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization. *Immunol* **101**, 378-387.
10. Fort M., M. Sibila, E. Pérez-Martin, M. Nofrarias, E. Mateu and J. Segalés. (2009a) 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**, 4031-4037.
11. Fort M., Fernandes L.T., Nofrarias M., Díaz I., Sibila M., Pujols J., et al. (2009b). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet Immunol Immunopathol*, **129**, 101-107.
12. Kekarainen T., Montoya M., Dominguez J., Mateu E., Segalés J. (2008a) Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol*. **124**, 41-49.
13. Kekarainen T., Montoya M., Mateu E., Segalés J. (2008b) Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* **89**, 760-765.
14. Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J., Allan G.M. (2010) Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol*. **136**, 185-193.
15. Kixmoller M., M. Ritzmann, M. Eddicks, A. Saalmuller, K. Elbers and V. Fachinger. (2008) Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* **26**, 3443-3451
16. Martelli P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Guazzetti S., Caleffi A., Borghetti P. (2011) One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet Microbiol* (in stampa).
17. Meerts P., Van Gucht S., Cox E., Vandebosch A., Nauwynck H.J. (2005) Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol*. **18**, 333-341.
18. Meissonnier G.M., Pinton P., Laffitte J., Cossalter A.M., Gong Y.Y., Wild C.P., Bertin G., Galtier P., Oswald I.P. (2008). Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**, 142-149.
19. Pérez-Martin E., Gómez-Sebastián S., Argilaguet J.M., Sibila M., Fort M., Nofrarias M., Kurtz S., Escribano J.M., Segalés J., Rodríguez F. (2010) Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine*. **28**, 2340-2349.
20. Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K. (2004). Deciphering the involvement of innate immune

- factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 199-216.
21. Shi K.C., Guo X., Ge X.N., Liu Q., Yang H.C. (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 140, 155-160.
  22. Steiner E., Balmelli C., Gerber H., Summerfield A., McCullough K. (2009) Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res* 5, 45.
  23. Stevenson L.S., McCullough K., Vincent I., Gilpin D.F., Summerfield A., Nielsen J., McNeilly F., Adair B.M., Allan G.M. (2006) Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 19, 189-195.
  24. von der Hardt K., Kandler M.A., Popp K., Schoof E., Chada M., Rascher W., Dotsch J. (2002). Aerosolized adrenomedullin suppresses pulmonary transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta gene expression in vivo. *Eur J Pharmacol* 457, 71-76.
  25. Wang X., Jiang P., Li Y., Jiang W., Dong X. (2007) Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 121, 215-224.
  26. Zhang H., Lunney J.K., Baker R.B., Opriessnig T. (2010) Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfectd with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Vet Immunol Immunopathol* (in stampa).