

In the V group we saw a significant increase of PCV2 PCs over time. The amounts of PCV2-specific antibody-producing plasma cells increased from 9.37 ± 13.36 at 28 DPI to 18.76 ± 15.83 at 53 DPI. We conclude that vaccination prepared animals to better react to infection through an increase of the number of mucosal specific plasma cells preventing viremia and shedding.

Introduzione

Il PCV2 ha un ruolo ormai assodato nella eziologia delle porcine circovirus diseases (PCVDs). La via oro-fecale è una importante via di trasmissione (Rose et al., 2012) in queste malattie e, per tale motivo, l'efficienza della risposta immunitaria mucosale è cruciale sia nella protezione verso l'infezione che nel contrastare l'eliminazione (shedding) virale. I compartimenti del sistema immunitario delle mucose possono essere principalmente suddivisi in: a) siti induttivi e, b) siti effettori. Nei primi vengono captati gli antigeni provenienti dalla superficie della mucosa e sovrintendono la stimolazione e l'attivazione di linfociti B e T non immuni; nei siti effettori le cellule effettrici immuni svolgono la loro azione (Brandtzaeg et al., 2008). I siti induttivi dell'immunità mucosale sono costituiti dal tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) (Liebler-Tenorio et al., 2006), includendo, in teoria, anche i linfonodi locali/regionali drenanti la mucosa; i siti effettori sono invece costituiti da compartimenti istologicamente diversi, come la lamina propria delle varie mucose, dunque questi ultimi non dovrebbero essere inclusi nel termine MALT (Brandtzaeg, 2008). L'organizzazione del sistema immunitario a livello mucosale intestinale comprende tessuto linfoide non capsulato concentrato (placche del Peyer dell'ileo e del digiuno) (Burkey et al., 2009), che costituisce i siti induttivi di cui fa parte anche l'epitelio associato ai follicoli (Sato et al., 2005). Una componente non capsulata diffusa, che comprende cellule (linfociti, plasmacellule ma anche macrofagi, cellule dendritiche, mastociti) localizzate al di fuori delle placche del Peyer e risidenti nella lamina propria, rappresenta i siti effettori dove si avvia la risposta cellulo-mediata ed umorale (Tizard, 2009). Le plasmacellule (PCs) sono localizzate prevalentemente intorno alle cripte intestinali e costituiscono la componente secretoria del sistema mucosale adibito alla produzione di fattori umorali protettivi a livello di superficie mucosa. Per studiare l'immunità mucosale si possono valutare o quantificare le sottopopolazioni cellulari (mononucleati, neutrofili) o analizzare le molecole ad azione immunologica (citochine, immunoglobuline); non esiste una tecnica di riferimento (gold standard) per la valutazione dell'immunità secretoria. L'asse umorale mucosale può essere esaminato con le medesime tecniche adottate per i test sierologici. Un passaggio critico è il campionamento delle secrezioni, che può risentire della contaminazione ematica o sierica, dell'eccessiva diluizione o di altri contaminanti (ingesta o enzimi) (Guy, 2002). Il lavaggio della superficie mucosa può non consentire in maniera completa la raccolta delle componenti immunoglobuliniche contenute nel film mucoso che ne riveste la superficie, qualora quest'ultimo abbia elevata viscosità. In tali casi il raschiato della superficie mucosa assicura un campione più idoneo all'analisi rispetto al semplice lavaggio.

Nel lavoro vengono presentati i risultati della quantificazione, mediante analisi d'immagine, della frazione di PCs localizzate nella lamina propria di 3 tratti intestinali (duodeno, digiuno, ileo) produttori gli isotipi anticorpali IgG, IgA e IgM e di quelle secernenti immunoglobuline (Ig) anti-PCV2 nel confronto tra 2 gruppi di soggetti sperimentalmente infettati, uno vaccinato con Circovac® e l'altro non vaccinato.

Materiali e metodi

Da un precedente esperimento erano disponibili campioni di duodeno, digiuno e ileo di scrofe convenzionali vaccinate (V) con Circovac® o non vaccinate (NV) e sperimentalmente infettate con seme contenente una sospensione di PCV2. Per ogni gruppo (V e NV) erano disponibili i tessuti di 3 soggetti campionati a 28 e 53 giorni post-infezione (DPI).

	Anti IgG	Anti IgM	Anti IgA	Anti PCV2 Ig
Inibizione perossidasi endogene	3% H ₂ O ₂ in metanolo 30 min.			
Smascheramento antigenico	Pronase E 0,05%; pH 7,5; 37°C; 7 min.			Protease XIV 0,05%; 37°C; 15 min.
Sospensione virale	-----	-----	-----	10 ^{3,9} TCID ₅₀ / 25 microlitri, diluito 1:1, overnight 5±3°C
Preincubazione	PBS + 20% siero normale capra + 1% BSA		Blocking reagent (Dako)	----- -----
Anticorpo primario	Anticorpo policlonale anti IgG del suino da coniglio (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% siero normale capra; 12 ore 5±3°C	Anticorpo policlonale anti IgM del suino da coniglio (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% siero normale di capra; 12 ore 5±3°C	Anticorpo policlonale anti IgA del suino da capra (Novus Biologicals Europe); 1:4000 in PBS + 1% BSA; overnight 5±3°C	Anticorpo monoclonale F217 (Gordon Allan, Belfast, UK); 1:200 in PBS; 37°C per 2 ore
Sistema rivelatore	Sistema polimerico (Zymed ® Lab)		LSAB - perossidasi (DAKO)	Sistema polimerico (Zymed ® Lab)
Cromogeno	Diamminobenzidina 0,05%; 10 min a temperatura ambiente			
Colorazione di contrasto	Ematossilina di Papanicolau			

Tabella 1: Specifiche tecniche delle reazioni immunostochimiche per la individuazione di PCs produttrici di IgG, IgM ed IgA impiegando anticorpi policlonali rispettivamente anti isotipo G, M ed A del suino e specifiche tecniche della reazione sandwich per l'identificazione di PCs contenenti Ig specifiche per PCV2.

Table 1: Polyclonal antibodies and protocols for immunohistochemistry to swine IgG, IgM and IgA and sandwich immunohistochemical protocol for the detection of anti PCV2 antibody producing PCs.

I campioni di tessuto erano rappresentati da materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina da cui sono state tagliate al microtomo 5 sezioni seriali di 4 μ di spessore. Una sezione è stata colorata con ematossilina-eosina, 3 sezioni, rispettivamente, per l'indagine immunohistochimica con anticorpo anti-IgG, -IgA e -IgM di suino (Tabella 1). L'ultima è stata usata per la determinazione delle plasmacellule produttrici Ig specifiche per PCV2 sulla base di una tecnica proposta da Kipar et al. (1998). In specifico è stato messo a punto un metodo "sandwich" che prevedeva il pretrattamento delle sezioni con una sospensione di PCV2 seguita, dopo lavaggio, da una reazione immunohistochimica diretta verso il virus per mezzo dell'anticorpo monoclonale F217 anti-PCV2. Il virus in tale modo si poneva a ponte tra la plasmacellula secernente anticorpi specifici e l'anticorpo anti-PCV2 aggiunto (Tabella 1).

Per la determinazione della specificità di reazione anti-IgG, -IgM ed -IgA è stato utilizzato, come controllo positivo, tessuto linfoide di suino normale mentre come controllo negativo l'anticorpo primario era sostituito da un altro di irrilevante specificità. Per la stessa finalità, nella reazione sandwich tesa ad identificare le PCs contenenti Ig specifiche per PCV2, o veniva sostituito l'anticorpo primario con altro di irrilevante specificità o veniva omesso il passaggio di pretrattamento delle sezioni con la sospensione virale.

L'analisi quantitativa delle PCs è stata condotta secondo il metodo di Waly et al. (2001), valutando separatamente i conteggi eseguiti nei 3 strati o aree anatomico-funzionali della lamina propria intestinale: 1) lamina propria a livello del villo, 2) lamina propria a livello della parte superiore e 3) della parte inferiore della cripta (Figura 1). Per ogni area venivano acquisite da 3 a 6 immagini ed in ognuna la lamina propria è stata selezionata, misurata e la quantità di PCs contate. La densità di PCs nella lamina propria è espressa come numero di cellule/10000 μ^2 .

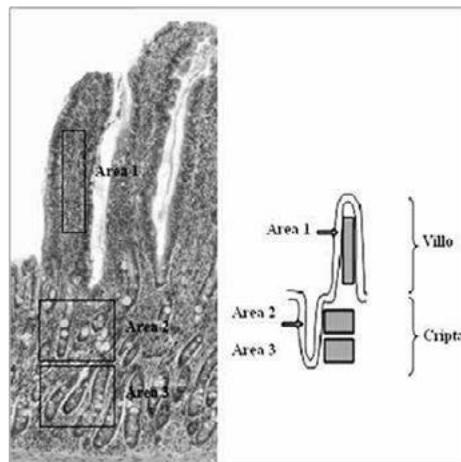


Figura 1. Rappresentazione delle 3 aree morfofunzionali della lamina propria in cui i conteggi delle PCs sono stati eseguiti: area 1 (lamina propria del villo); area 2 (lamina propria della parte superiore della cripta); area 3 (lamina propria della parte inferiore della cripta). Sulla destra lo schema proposto da Waly et al., 2001.

Figure 1. Schematic diagram of the 3 lamina propria areas used for the cell count: area 1 (lamina propria of the villus); area 2 (lamina propria of the upper part of the crypt); area 3 (lamina propria of the deep part of the crypt). On the right, the reference areas proposed by Waly et al., 2001.

In via preliminare, la normalità della distribuzione campionaria dei conteggi effettuati è stata verificata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov (K-S). Sulla base dei risultati di questo test, i successivi confronti sono stati condotti utilizzando i test *t* di Student, Mann-Whitney (M-W) o Kruskal-Wallis (K-W).

Risultati

Tutti i campioni esaminati erano esenti da patologia. Le PCs positive alla reazione immunostochimica presentavano colorazione marrone nel citoplasma. Una reazione immunostochimica specifica si rilevava anche, in particolare per IgA ed IgM, a livello del bordo luminale dell'epitelio delle cripte (Figura 2). Le PCs contenenti IgA sono state le più numerose, seguite da quelle contenenti IgG ed infine da con IgM. Considerando l'insieme delle 3 aree di lamina propria (area 1, 2 e 3) la quantità di PCs contenenti IgM, IgG o IgA non differiva tra i 2 gruppi a confronto (V vs NV); tuttavia, è stato costantemente osservato un significativo aumento del numero di PCs dall'area 1 (villo) all'area 3 (parte inferiore della cripta), c.d. gradiente verticale crescente. Inoltre è stato osservato, sempre per tutti gli isotipi ed in entrambi i gruppi, un decremento del numero di PCs dal duodeno all'ileo (c.d. gradiente orizzontale decrescente) (Figura 3). Con la metodica sandwich, utilizzata per identificare le PCs contenenti Ig specifiche per PCV2, si riscontrava una positività citoplasmatica non solo nelle plasmacellule (Figura 2) ma anche nei macrofagi interstiziali, in cellule endoteliali e nel bordo luminale dell'epitelio di alcune cripte. La reazione immunostochimica è stata considerata specifica in quanto la positività citoplasmatica era assente omettendo il passaggio della sospensione virale o sostituendo l'anticorpo primario. I conteggi sono comunque stati condotti includendo solo le plasmacellule positive. La distribuzione di PCs contenenti Ig specifiche per PCV2 manteneva il gradiente verticale ed orizzontale registrato per le PCs contenenti i diversi isotipi immunoglobulinici (Figura 3). Nei gruppi V e NV è stato osservato un profilo significativamente diverso nella quantità di PCs PCV2 specifiche fra i 2 diversi tempi di campionamento. Nel gruppo NV non è stata registrata nessuna variazione statisticamente significativa ($P=0.76$) di risposta mucosale nel tempo, il numero di PCs è rimasto invariato da 28 (media \pm dev. standard: $10,55 \pm 4,24$) a 53 ($10,06 \pm 5,01$) DPI. Nel gruppo V si è invece registrato un significativo incremento ($P=0,037$) di risposta specifica per PCV2 passando da 28 ($9,37 \pm 13,36$) a 53 ($18,76 \pm 15,83$) DPI (Figura 4).

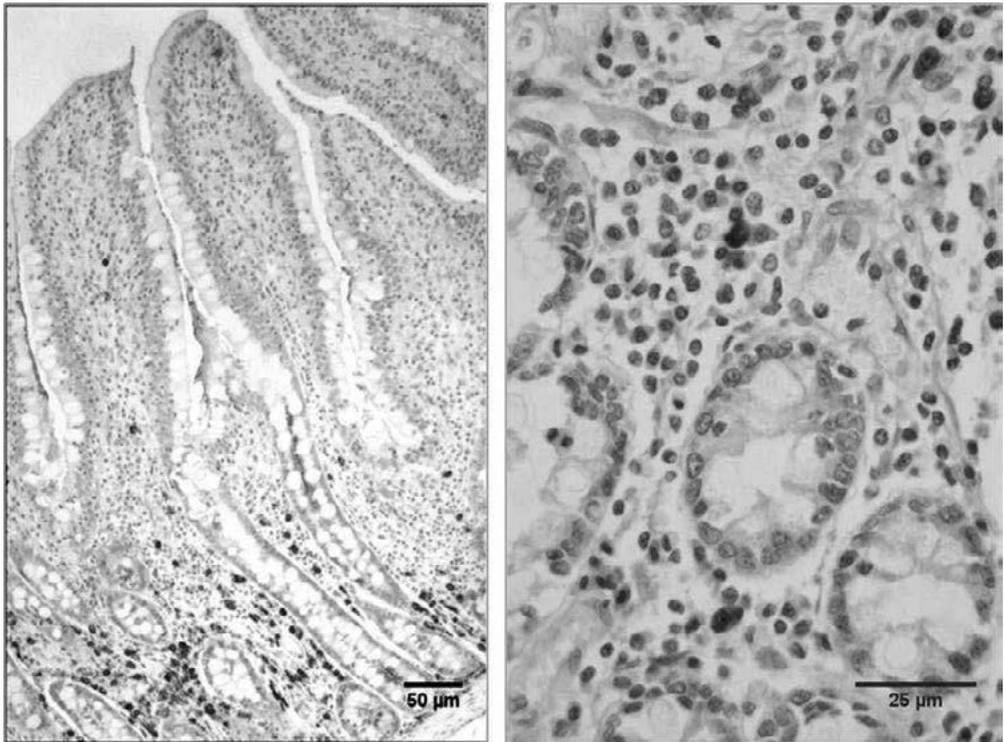


Figura 2. A sinistra: Suino. Intestino. Ileo. La foto mostra plasmacellule positive (citoplasma marrone) per IgA. E' presente positività anche del versante apicale delle cripte. Reazione immunoistochimica con anticorpo anti-IgA del suino (10x).

A destra: Suino. Intestino. Ileo. La foto mostra plasmacellule positive alla reazione sandwich (colore marrone del citoplasma) contenenti immununoglobuline anti-PCV2. Sono presenti anche plasmacellule negative (citoplasma azzurro). Reazione immunoistochimica con la tecnica sandwich (40x).

Figure 2. Left: Pig. Gut. Ileum. Immunohistochemical staining to swine IgA showing positive plasma cells (cytoplasm brown stained) and the apical staining of the crypts. Immunohistochemistry to swine IgA (10x).

Right: Pig. Gut. Ileum. Immunohistochemical staining showing PCs containing anti-PCV2 immunoglobulins (cytoplasm brown stained). PCs negative are also present in the field (40x).

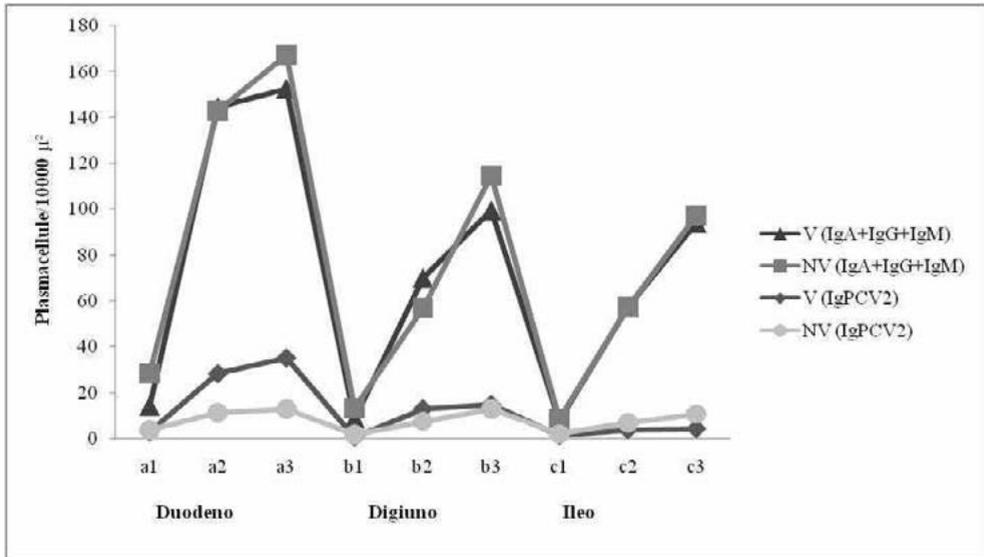


Figura 3: Gradiente verticale ed orizzontale dei valori medi di plasmacellule secernenti IgA+IgM+IgG e anticorpi specifici antiPCV2/10000 micron quadri di lamina propria per tratto intestinale, per gruppo (V e NV). Duodeno: a1= lamina propria (lp) villo; a2= lp parte superiore cripta; a3= lp parte inferiore cripta; digiuno: b1= lp villo; b2= lp parte superiore cripta; b3= lp parte inferiore cripta; ileo: c1= lp villo; c2= lp parte superiore cripta; c3= lp parte inferiore cripta.

Figure 3: Vertical and horizontal trends in each group (V=vaccinated ; NV=not vaccinated) of the mean IgA+IgM+IgG and anti PCV2 plasma cell density/10000 square micron of lamina propria. Duodenum: a1= villus lamina propria (lp); a2= cripta upper part lp ; a3= cripta lower part lp ; Jejunim: b1= villus lp; b2= cripta upper part lp ; b3= cripta lower part lp ; ileum: c1= villus lp; c2= cripta upper part lp ; c3= cripta lower part lp.

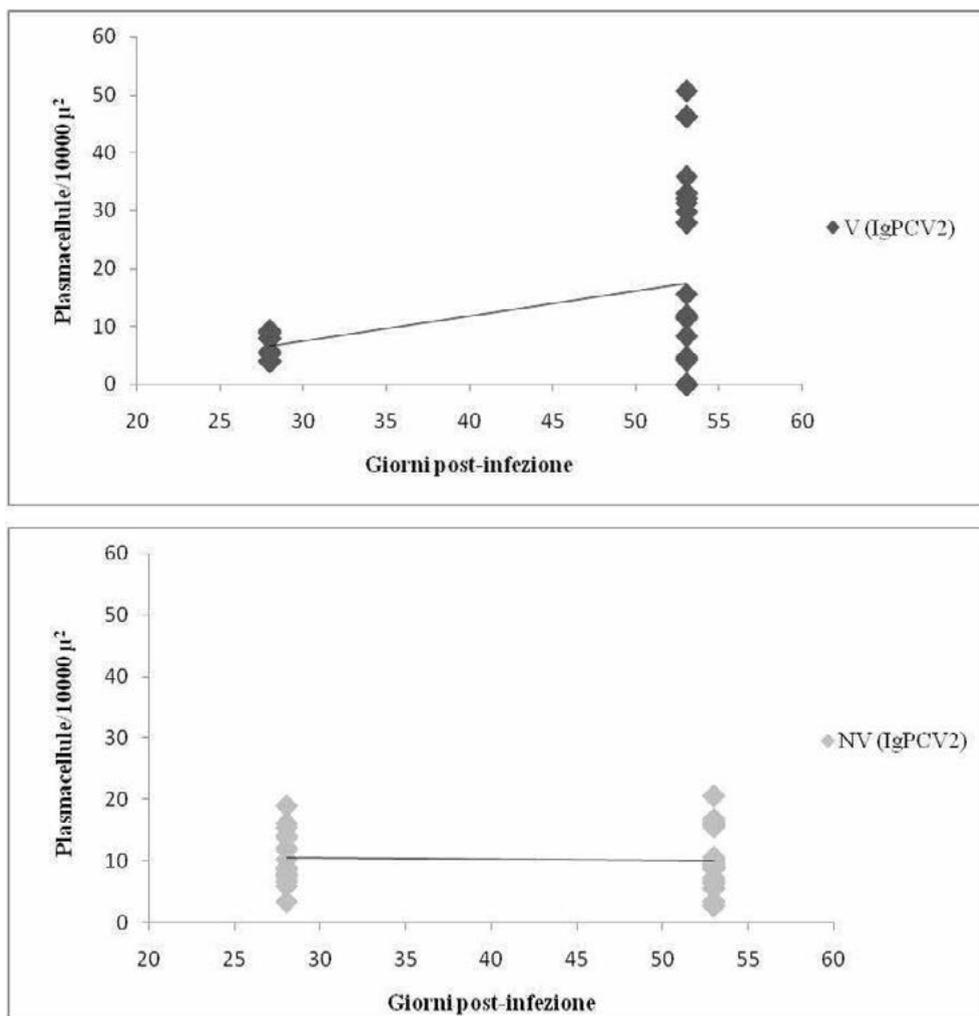


Figura 4. Confronto della densità delle plasmacellule contenenti anticorpi anti-PCV2 nella lamina propria dell'intestino tra i due gruppi V e NV in due successivi momenti di campionamento. Si rileva un aumento significativo del numero di plasmacellule specifiche nel gruppo V nel tempo.

Figure 4. Comparison between V and NV groups in 2 consecutive sampling times of the density of PCs producing PCV2-specific antibodies in the lamina propria. In the V group a significant increase of anti-PCV2 antibody bearing PCs is present over time.

Discussione

Il presente studio riporta informazioni relative alla distribuzione di PCs secernenti IgA, IgM e IgG nella lamina propria intestinale di suino, con particolare riferimento alla distribuzione delle cellule Ig-secernenti nella mucosa intestinale lungo l'asse villo-cripta (gradiente verticale) e dal duodeno all'ileo (gradiente orizzontale), nonché la predominanza delle IgA rispetto agli

altri due isotipi. I risultati ottenuti confermano quelli riportati in letteratura (Allen et al., 1973; Allen et al., 1977) che avevano esaminato mediante immunofluorescenza la mucosa intestinale di suini di 3 mesi senza dividerla in aree. Occorre tuttavia puntualizzare che la distribuzione da noi osservata è “tendenzialmente” simile a quanto rilevato da Allen et al. (1973; 1977) ma non uguale, probabilmente a causa della diversa impostazione dei lavori. Le informazioni disponibili in letteratura indicano che le plasmacellule della mucosa intestinale sono in maggioranza quelle contenenti IgA, IgM e solo poche sono quelle a contenuto di IgG (Stokes et al., 2000). A 4 settimane di vita, le IgM sono frequenti tanto quanto le IgA (Bianchi et al., 1999) ma, queste ultime superano in numero le IgM a partire da 12 settimane d’età (Allen et al., 1977; Bianchi et al., 1999), raggiungendo circa il 90% delle plasmacellule totali (Allen et al., 1977), mediante commutazione (c.d. shift isotipico) da IgM a IgA (Bianchi et al., 1999).

Complessivamente i dati ottenuti nel presente studio circa il gradiente verticale ed orizzontale delle PCs confermano quanto noto, e cioè che la distribuzione di PCs non è uniforme lungo i tratti del piccolo intestino (duodeno, digiuno, ileo) (Allen et al., 1973): nella lamina propria del duodeno è concentrato il maggior numero di cellule immunoglobulinose secernenti, circa 10 volte la quantità presente nel digiuno (Allen et al., 1973), indipendentemente dalla classe di immunoglobuline (Allen et al., 1973; Allen et al., 1977). Al contrario, il minor numero di esse è contenuto nella lamina propria dell’ileo e corrisponde circa alla metà delle cellule immunoglobulinose secernenti presenti nel digiuno. La distribuzione non è omogenea anche lungo l’asse villo-crypta: in suinetti lattanti è stato rilevato che sia le IgA sia le IgM sono molto più numerose nella lamina propria che circonda la cripta, mentre poche sono presenti a livello del villo (Allen et al., 1973).

L’originalità del presente lavoro è rappresentata dalla messa a punto della metodica ideata da Kipar et al. (1998), che aveva dimostrato la presenza di plasmacellule produttrici immunoglobuline specifiche verso il coronavirus felino nelle lesioni granulomatose della peritonite infettiva felina (FIP), suggerendo l’uso di una metodica sandwich che prevedesse l’utilizzo di una sospensione virale da far precedere ad una reazione immunoistochimica diretta verso il virus. La nostra finalità nella messa a punto del metodo era prevalentemente indirizzata a verificare un eventuale effetto del vaccino nel modificare la quantità di PCs contenenti immunoglobuline specifiche per PCV2. La metodica si è rivelata specifica in quanto la colorazione era assente con l’omissione della sospensione virale o con l’omissione dell’anticorpo primario anti-PCV2.

La presenza di PCs produttrici di Ig specifiche per PCV2 può essere la risposta locale alla presenza di PCV2 ma potrebbe rappresentare anche parte di una risposta sistemica: la vaccinazione potrebbe aver reclutato sottopopolazioni di linfociti destinati all’“homing” - per “homing” s’intende: l’arrivo di un linfocita, comunemente dal circolo sanguigno, in un organo linfatico o non linfatico (Bimczok et al., 2006) - mucosale intestinale. Infatti, è stato dimostrato che la secrezione di anticorpi a livello di mucosa può essere indotta da vaccini somministrati per via parenterale (Bouvet et al., 2002). Poichè, nel corso della sperimentazione durante la quale sono stati prelevati i tratti di intestino esaminati nella presente indagine, si erano registrati, a parità di condizione immunitaria nel momento della fecondazione con seme infetto, una frequenza di viremia e shedding virale significativamente inferiore nel gruppo dei soggetti V rispetto a quelli NV, ci siamo posti il problema di indagare la risposta mucosale intestinale come elemento eventualmente influenzabile dalla vaccinazione e in grado di prevenire o ridurre la viremia e lo shedding virale.

Tenendo conto delle già citate criticità dell’indagine dell’immunità mucosale secretoria, la tecnica proposta si mostra oggettiva. Inoltre, essendo una tecnica quantitativa fornisce dati confrontabili con altri parametri siero-epidemiologici (viremia, shedding). Dai dati

ottenuti nei soggetti vaccinati si è osservata la capacità, dopo infezione e nel tempo, di modulare positivamente la quantità di PCs produttrici di Ig verso PCV2. Verosimilmente questa capacità di potenziare la difesa di mucosa, in una malattia a ciclo oro-fecale, è uno dei fenomeni biologico che contribuiscono a spiegare la minor frequenza di viremia e la riduzione dello shedding virale riscontrato nei soggetti vaccinati.

Conclusioni

La metodologia proposta per l'analisi d'immagine tesa a quantificare le PCs nella lamina propria dell'intestino ed i risultati ottenuti dalla quantificazione delle PCs producenti isotipi immunoglobulinici IgA, IgM e IgG possono essere considerati dati di riferimento in un intestino di suino morfologicamente normale ed essere quindi la base futura per il confronto con situazioni patologiche. Il metodo sandwich può essere proposto come metodica di affiancamento o alternativa ad altre oggi in uso per la stima dell'immunità umorale mucosale. Da sottolineare, seppure registrato su soggetti diversi del gruppo V, l'effetto "booster-like" del vaccino che, a livello di mucosa intestinale, induce, in due momenti successivi post infezione, un incremento significativo del numero di PCs producenti Ig specifiche per PCV2.

Bibliografia

Allen W.D., Porter P. (1973) "The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity". *Immunology* 24 (3), 493-501.

Allen W.D., Porter P. (1977) "The relative frequencies and distributions of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity". *Immunology* 32 (5), 819-824.

Bianchi A.T.J., Scholten J., MoonenLeusen B.H.W.M., Boersma W.J.A. (1999) "Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing". *Dev Comp Immunol.* 23 (6), 511-520.

Bimczok D., Rothkötter H.J. (2006) "Lymphocyte migration studies." *Vet Res.* 37, 325-338.

Bouvet J-P, Decroix N., Pamonsinlapatham P. (2002) "Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination?" *Trends Immunol.* 23 (4), 209-213.

Brandtzaeg P., Kiyono H., Pabst R., Russel M.W. (2008) "Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue". *Mucosal Immunol.* 1 (1), 31-37.

Burkey T.E., Skjolaas K.A., Minton J.E. (2009) "Board invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract". *J Anim Sci.* 87 (4), 1493-1501.

Guy B. (2002) "Evaluation of events occurring at mucosal surfaces: techniques used to collect and analyze mucosal secretion and cells". *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (4), 753-762.

Kipar A., Bellmann S., Kremendahl J., Köhler K., Reinacher M. (1998) "Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65 (2-4), 243-257.

Liebler-Tenorio E.M., Pabst R. (2006) "MALT structure and function in farm animals". *Vet Res.* 37 (3), 257-280.

Rose N., Opriessing T., Grasland B., Jestin A. (2012) "Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2)". *Virus Res.* 164(1-2), 78-89.

Sato A., Iwasaki A. (2005) "Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity". *Cell Mol Life Sci.* 62(12), 1333-1338.

Stokes C.R., Bailey M. (2000) "The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation?" *J Biotechnol.* 83 (1-2), 51-55.

Tizard Ian R. (2009) "Veterinary Immunology: an introduction", 8a ed., St Louis, Missouri, Saunders Elsevier.

Waly N., Gruffydd-Jones T.J., Stokes C.R., Day M.J. (2001) "The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats". *J Comp Pathol.* 124 (2-3), 172-182.