



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICO-VETERINARIE
CICLO XXIX

**VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA DELLA RISPOSTA
IMMUNITARIA INNATA E CELLULO MEDIATA NEL SUINO IN
CORSO D'INFEZIONE NATURALE DA *MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE***

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Attilio Corradi

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Benedetta Passeri

Dottorando:
Dott. Nicola Martinelli

Riassunto

Il *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) è il principale agente causale della polmonite enzootica del suino. 49 suini con lesioni polmonari, provenienti da 5 diversi allevamenti sono stati campionati al macello. Per ogni animale è stata effettuata una valutazione delle lesioni polmonari secondo il metodo. Inoltre, da alcune carcasse, sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo per rilevare i Toll like recptor 4. MH è stato ricercato dai campioni di polmone tramite RT-PCR. Le sezioni di polmone incluso in paraffina sono state valutate istologicamente, classificandole da 0 a 4, per reattività dei BALT, gravità della disepitelizzazione bronchiale e bronchiolare, e infiammazione subacuta. Tecniche di immunistochimica sono state eseguite usando anticorpi commerciali anti-MAC387 per rivelare i macrofagi, antiCD3 per i linfociti T, anti-CD79 α per i linfociti B, Foxp3 per rilevare i Treg. La presenza di cellule immunopositive è stata classificata da 0 a 4 a seconda della quantità di cellule colorate per i linfociti T e B e per i macrofagi. I Treg sono stati contati individualmente nei BALT. I Toll like receptor sono stati evidenziati nel tessuto adiposo congelato utilizzando un anticorpo commerciale anti-TLR4 su sezioni di 5 μ m. La media dello score istologico è variata da 0,14 a 1,98. Alla RT-PCR sono risultati positivi 32 campioni mentre 17 sono risultati negativi. Nei polmoni si evidenziava una polmonite catarrale bronco-interstiziale con aumento di volume del tessuto linfoide peribronchiale, peribronchiolare e perivascolare. 10 campioni mostravano un'infiammazione subacuta e, 22, lesioni indotte da MH senza apparenti infezioni secondarie. Le cellule MAC387 positive erano numerose nelle lesioni polmonari (classificate come 4) con una grave infiammazione subacuta, mentre le cellule B, T e Treg erano poco rappresentate. Al contrario, i linfociti T erano molto presenti nei BALT iperplastici (classificati 3 e 4) da MH. I linfociti B erano poco rappresentati nelle infiammazioni subacute, mentre nei BALT con aumento di volume indotto da MH sono stati classificati da 2 a 3. L'espressione dei TLR4 è stata valutata su 20 campioni, utilizzando una classificazione semi-quantitativa basata su diffusione e intensità della colorazione in quattro livelli: assente, moderata, media, intensa su 4 campi visivi. In questo studio, si rielva che i Treg sono molto rari nei BALT iperplastici, suggerendone una minor attività nel ruolo di mantenere una bassa attivazione del sistema immunitario. I macrofagi sono numerosi nell'infiammazione subacuta, mente sono meno nei BALT iperplastici da MH, suggerendo una minor apoptosi cellulare nei centri dei follicoli.

L'analisi semi-quantitativa dell'espressione dei TLR4 nel tessuto adiposo del mediastino effettuata in questa ricerca, tende a confermare quanto riscontrato in medicina umana: i soggetti che presentano una maggior infiammazione presentano anche una più alta intensità di colorazione rispetto a quelli con minor infiammazione; ulteriori studi sono comunque necessari per confermare quest'ipotesi.

Immunohistochemical evaluation of cell mediated and innate immune response in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*

Abstract

Mycoplasma hyopneumoniae (MH) is the main causative agent of enzootic pneumonia of pigs. 49 pigs, presenting lung lesions, from 5 different herds were sampled at slaughterhouses. Lung lesions were individually. Mediastinal adipose tissue was sampled from some carcasses to reveal Toll like receptors 4. MH was locally RT-PCR detected from each lung lesion. Paraffin sections of lungs were histologically evaluated with a score, ranging from 0 to 4, for BALT, severity of bronchi, bronchiolar disepithelization and subacute inflammation. Immunohistochemistry was carried out using commercial antibodies anti-MAC387 to detect macrophages, anti-CD3 for T-cells, anti-CD79 α for B-cells, Foxp3 for regulatory T-cells. The amount of antigen detected was scored from 0 to 4 based on the number of positive T, B and macrophages. T-reg cells were individually counted in BALT. To detect Toll-like receptors in mediastinal adipose tissue immunohistochemistry was carried out using a commercial antibody anti-TLR4 on frozen 5 μ m section. The average histological lung score ranged from 0.14 to 1.98. Results of RT-PCR were 32 positive and 17 negative samples. Lungs showed catarrhal bronco-interstitial pneumonia with increased volume of peribronchial, peribronchiolar and perivascular lymphoid tissue. 10 samples showed subacute inflammation and 22 showed lesions MH induced without secondary apparent bacteria irruption. MAC387 positive cells were numerous in lung lesions (scored 4) affected by severe subacute inflammation while B, T and Treg cells were poorly represented. On the contrary, T cells were numerous in hyperplastic BALT MH induced (scored 3 to 4). B cells were scarcely represented in subacute inflammation, while in MH induced BALT lesions were scored from 2 to 3.

The expression of TLR4 was evaluated on 20 samples, using a semi-quantitative classification according to the spread and intensity of staining on four levels: absent, mild, medium, intensive on four, 4 magnifications fields.

This study shows that Treg cells are very rare in hyperplastic BALT, suggesting a less active role of Treg cells in maintaining a low activation of immune system. Macrophages are numerous in subacute inflammation, while less in MH BALT, suggesting a low grade of apoptosis of cells of the follicle center.

Semi-quantitative analysis of the presence of TLR4 in mediastinal fat tissue, carried out in this research, tends to confirm data shown in human medicine: those subjects who showed an more severe inflammation showed a high stain intensity than those with mild inflammation; further studies are needed to confirm this hypothesis.

Sommario

INTRODUZIONE.....	5
TOLL LIKE RECEPTORS.....	6
GENERALITÀ.....	6
PRIMA IDENTIFICAZIONE	7
STRUTTURA E LOCALIZZAZIONE DEI TLR.....	8
ELEMENTI RICONOSCIUTI DAI TLR.....	9
TLR4.....	12
TLR NEL SUINO.....	14
RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'INFEZIONE DA <i>MYCOPLASMA</i>	
<i>HYOPNEUMONIAE</i>	16
PARTE SPERIMENTALE	20
INTRODUZIONE	20
MATERIALI E METODI	26
<i>Prelievo dei campioni</i>	26
<i>Istologia</i>	27
<i>Immunoistochimica</i>	27
RISULTATI.....	28
CONCLUSIONI	41
ABBREVIAZIONI.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

INTRODUZIONE

Il sistema immunitario può essere definito come l'organo deputato a difendere l'integrità di un organismo dagli attacchi di altri microrganismi; dal suo funzionamento e dalla sua integrità dipende la salute di ogni mammifero.

Lo studio del sistema immunitario è andato di pari passo con le conoscenze in campo microbiologico. Le prime significative scoperte sono state fatte verso la fine dell'800 con l'individuazione dei microrganismi come causa di malattia. Nei tempi moderni le scoperte in campo dell'immunità hanno permesso di rendere inoffensive diverse malattie e di eliminarne altre.

L'allevamento del suino in Italia ricopre una notevole importanza socio-economica. Attualmente sono allevati più di 8 milioni di suini in circa 120 mila aziende garantendo così la materia prima per la produzione di salumi e insaccati di notevole pregio.

Il suino è inoltre ritenuto l'animale destinato a diventare la fabbrica di organi di ricambio per l'uomo. Le sperimentazioni effettuate fin ad ora hanno permesso di impiantare cuore, polmoni e reni su primati non umani. Sebbene in Italia questa ricerca sia stata fermata dal decreto legislativo 4 marzo 2014 n. 26, si prevede che entro il 2020 lo xenotrapianto di polmoni suini su uomo sarà nella fase dei clinical trials grazie agli enormi sforzi economici per lo sviluppo di questa tecnologia effettuati soprattutto negli USA (Reardon S., 2015).

La conoscenza dei meccanismi con i quali il sistema immunitario si muove per eliminare gli agenti infettivi, oltre alla conoscenza dei microrganismi stessi, è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi metodi per combattere lo sviluppo e la diffusione di nuove e vecchie malattie. In particolare, alle conoscenze in campo immunologico è strettamente legato lo sviluppo di vaccini sempre più efficaci e sicuri (Murtaugh M.P., 2014).

In questo lavoro si è voluto descrivere le più recenti conoscenze sul sistema immunitario del suino con particolare riferimento ai toll like receptor (TLR) e alla risposta all'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*. Nella parte sperimentale è stata investigata la risposta immunitaria a seguito d'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* con tecniche immunoistologiche nel suino.

TOLL LIKE RECEPTORS

Generalità

La difesa dell'ospite dall'invasione di agenti microbici è affidata al sistema immunitario che consiste di due componenti: l'immunità innata e l'immunità acquisita.

Entrambe le componenti riconoscono i microrganismi invasori come non-self innescando la risposta immunitaria al fine di eliminarli. Ad oggi, la maggior parte degli studi ha esaminato in modo indipendente entrambe le componenti, ma l'interesse principale di ricerca è stato puntato sull'immunità acquisita. Nell'immunità acquisita, i linfociti B e T utilizzano recettori antigenici come le immunoglobuline o i recettori delle cellule T per identificare elementi non-self. I meccanismi con i quali questi recettori individuano antigeni estranei sono stati intensamente analizzati e i maggiori meccanismi come la clonalità, la diversità e la memoria sono stati caratterizzati a fondo. Tuttavia, questi recettori sono presenti solo nei vertebrati, di conseguenza non si comprende pienamente il meccanismo di riconoscimento dei non-self negli organismi meno evoluti (Takeda e Akira, 2005). Una parziale risposta a questo quesito è stata data quando, alla fine degli anni '90, fu individuato il recettore *Toll* come essenziale per la difesa contro i funghi nel moscerino *Drosophila*. Un anno dopo, nei mammiferi un omologo del recettore *Toll* (denominato poi TLR4) è stato individuato come induttore dell'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria (Medzhitov, 1997).

I sistemi difensivi innati sono diversi. La prima barriera contro l'invasione di organismi esterni è rappresentata dalla cute e dalle mucose. Un'importante azione di difesa è poi svolta dalle cellule aventi la funzione fagocitaria, come i granulociti neutrofili, i monociti circolanti e le cellule macrofagiche del sistema reticolo-endoteliale. I neutrofili hanno un'azione rapida ed efficiente che si esaurisce con la distruzione del materiale estraneo, senza che quest'ultimo sia coinvolto nella risposta immunitaria; al contrario i macrofagi si mobilitano e, non solo distruggono i microrganismi fagocitati, ma li processano e ripresentano i loro antigeni alle altre cellule del sistema immunitario, innescando così tutti i meccanismi delle difese specifiche.

Prima identificazione

Nel 1985, Christiane Nüsslein-Volhard del Max Planck Institute a Tübingen (Germania) analizzava le mutazioni dei moscerini della frutta e notò una strana larva nella quale la porzione ventrale del corpo era sottosviluppata. Il suo commento spontaneo fu "*Das war ja toll!*" che significa "com'è notevole!"; il nome *Toll* fu così attribuito al gene mutato. Alla proteina prodotta dal gene *Toll* fu attribuita la proprietà di causare ventralizzazione e la normale funzionalità del *Toll* è necessaria per la polarità dorsoventrale nella mosca. Dieci anni dopo la scoperta del *Toll*, Lemaitre B. e coll. scoprirono che il *Toll* non solo controlla la polarità dorsoventrale ma ha anche un ruolo nella difesa dell'organismo contro le infezioni fungine in *Drosophila*: senza il recettore *Toll* le mosche non sopravvivono alle infezioni fungine (Lemaitre B. *et al.*, 1996). L'attivazione del *Toll* innesca la cascata NF- κ B che attiva la difesa contro i miceti.

Medzhitov R. e Janeway C. all'Università di Yale nel 1997 annunciarono la clonazione di un omologo nei mammiferi al recettore *Toll* denominato Toll-like receptor (TLR) (Medzhitov R. *et al.*, 1997). Dall'identificazione del primo recettore TLR, il TLR4, diverse proteine sono state strutturalmente correlate al TLR4 e quindi denominate TLR. Attualmente, i recettori Toll-like comprendono una vasta famiglia di proteine che conta 12 membri (Kumar H. *et al.*, 2009). I TLR riconoscono diverse molecole associate a patogeni (PAMP) derivate da virus, batteri, funghi e protozoi.

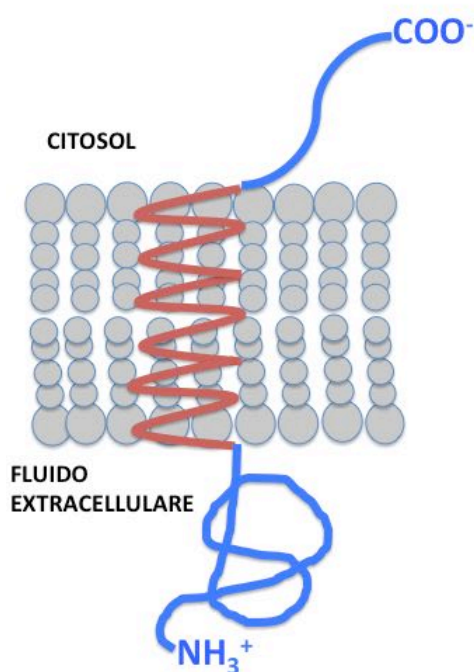


Figura 1. Schema proteine transmembrana di tipo 1

Struttura e localizzazione dei TLR

I TLR sono glicoproteine transmembrana di tipo 1 (Fig.1). Il dominio extracellulare N-terminale è costituito da circa 16-28 ripetizioni ricche di leucina (LRR), e ogni LRR si compone di 20-30 aminoacidi con il motivo conservato "LxxLxxL". Il dominio intracellulare C-terminale è conosciuto come Toll/IL-1 (TIR), che mostra omologia con quello del recettore IL-1. Questo dominio è necessario per l'interazione e il reclutamento di varie molecole per attivare il percorso di segnalazione. Recentemente è stato individuata la struttura cristallina di diversi TLR con il ligando. È stato dimostrato che questi complessi formano eterodimeri quali TLR1-TLR2, TLR4-MD2 o un omodimero come TLR3-TLR3 dopo associazione con i loro rispettivi

ligandi e formano una struttura a ferro di cavallo. È stato dimostrato che questa struttura è essenziale per il legame con il ligando e per il passaggio del segnale a valle.

I TLR sono espressi in comparti cellulari diversi. Il TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 (espresso solo nei topi) sono espressi sulla superficie cellulare, mentre TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 sono espressi in vescicole intracellulari come endosomi e reticolo endoplasmatico. I TLR intracellulari sono trasportati alle vescicole intracellulari mediante UNC93B1, una proteina transmembrana, che si localizza nel reticolo endoplasmatico della cellula (Kim Y.M. *et al.*, 2008).

Parecchi studi hanno rilevato la presenza dei diversi TLR in molti tessuti. Nel cane, i TLR2 sono stati individuati in monociti del sangue, linfonodi, polmoni, fegato, milza, pancreas, piccolo intestino, intestino crasso e pelle tramite real time-PCR (RT-PCR) (Ishii *et al.*, 2006). Le differenze di localizzazione tissutale dei TLR4 tra suino, bovino e cane riscontrate da Wassef e coll. (2004) nei diversi organi suggeriscono una distribuzione differente nelle diverse specie; differenze di distribuzione dei TLR3 sono state evidenziate anche tra macrofagi alveolari di differenti specie (Sacco *et al.*, 2011). La distribuzione tissutale dei TLR, soprattutto di quelli coinvolti nel riconoscimento dei batteri, è coerente con una funzione di vigilanza dei siti d'ingresso nell'organismo, permettendo il riconoscimento precoce d'invasione microbica (Alvarez *et al.*, 2008).

Elementi riconosciuti dai TLR

I TLR possono riconoscere diversi componenti della parete della cellula batterica come i lipolisaccaridi dei batteri gram negativi, riconosciuti dai TLR4, i peptidoglicani da batteri gram positivi, riconosciuti da TLR2, il lipoarabinomannan (LAM) dei micobatteri, riconosciuto dai TLR2, i diacil e triacil lipopeptidi dei batteri, micobatteri e micoplasmi, riconosciuti dai TLR2/1 e TLR2/6, la flagellina di batteri flagellati, riconosciuta da TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001; Uematsu *et al.*, 2006) e il DNA genomico batterico ricco di DNA CpG non metilato, riconosciuto dai TLR9.

Diversamente dagli altri TLR, nel topo, i TLR5 non sono espressi nelle cellule dendritiche convenzionali e nei macrofagi (Uematsu *et al.*, 2006). Gewirtz e coll. riportano che i TLR5 sono espressi nella faccia basolaterale, ma non nell'apice delle cellule epiteliali intestinali, suggerendo che la flagellina è riconosciuta quando i batteri passano attraverso l'epitelio (Gewirtz *et al.*, 2001). L'espressione di TLR5 nelle cellule epiteliali intestinali del topo non è alta (Uematsu *et al.*, 2006). D'altra parte, il TLR5 è espresso principalmente sulle cellule della lamina propria intestinale CD11c⁺ (Uematsu *et al.*, 2006). Sebbene il TLR5 induce la risposta immunitaria contro i batteri flagellati, i topi TLR5-deficienti sono resistenti all'infezione orale da *Salmonella typhimurium*. Il trasporto di *S. typhimurium* dal tratto intestinale ai linfonodi mesenterici è debole in topi TLR5-deficienti. Questi risultati suggeriscono che *S. typhimurium* utilizzi i TLR5 dei CD11c⁺ della lamina propria per attuare l'infezione sistemica (Uematsu *et al.*, 2006). α and ϵ *Proteobacteria*, including *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*, variano il sito di riconoscimento della flagellina senza perdere la motilità flagellare. Questa modificazione può essere responsabile della persistenza dell'infezione sulla superficie della mucosa (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

Con l'interazione tra vari componenti batteriche i TLR inducono la produzione di citochine infiammatorie e, in specifiche condizioni, di interferoni di tipo I. Gli streptococchi del gruppo B, che residuano nel fagosoma, inducono un interferone TLR7- dipendente di tipo I, suggerendo che l'RNA batterico prodotto nel compartimento lisosomiale possa essere riconosciuto dai TLR7 (Mancuso G. *et al.*, 2009). Anche spirochete di *Borrelia burgdorferi*, che causano la malattia di Lyme nell'uomo, sono riconosciute dai TLR1 e dai TLR2 (Dennis V.A. *et al.*, 2009).

Il DNA batterico è un potente stimolatore dell'immunità. Questa risposta è mediata dai siti CpG non metilati. Nei vertebrati, la frequenza molto ridotta dei

siti CpG e la metilazione dei residui di citosina dei siti portano ad una inibizione dell'attività immunostimolatoria. Studi su topi TLR9-deficienti hanno mostrato che il riconoscimento dei siti CpG non metilati è mediato dai TLR9 (Hemmi *et al.*, 2000).

Le proteine dell'envelope di virus come il virus respiratorio sinciziale (RSV) e il virus del tumore mammario murino (MMTV) sono riconosciuti dai TLR4. L'RSV induce la produzione di citochine infiammatorie e chemiochine attraverso i TLR2 e i TLR9 (Murawski M.R. *et al.*, 2009). I TLR9 sono attivati diversi virus a DNA delle famiglie herpesvirus (Lund J. *et al.*, 2003), adenovirus (Zhu J. *et al.*, 2007), poxvirus (Samuelsson C. *et al.*, 2008) e torquetenovirus (Rocchi J. *et al.*, 2009). I TLR2 si sono rilevati coinvolti nel riconoscimento del virus del morbillo, del citomegalovirus umano e dell'Herpes simplex virus di tipo 1 (Bieback K. *et al.*, 2002; Compton T. *et al.*, 2003; Kurt-Jones E.A. *et al.*, 2004). Un analogo sintetico dell'RNA a doppia catena, l'acido polinosina-deossicitidilico, un potente induttore dell'interferoni di tipo I (Alexopoulou L. *et al.*, 2001). I topi TLR3-deficienti sono suscettibili all'infezione da citomegalovirus del topo (Tabeta K. *et al.*, 2004). D'altra parte, topi TLR3-deficienti mostrano maggior resistenza all'infezione da virus della West Nile Disease. Questo flavivirus a singola catena di RNA innesca la risposta infiammatoria via TLR3, che porta ad una distruzione della barriera emato-encefalica, seguita da un'intensa infezione (Wang T. *et al.*, 2004). Ciò suggerisce che il virus West Nile utilizzi i TLR3 per penetrare efficientemente nell'encefalo. TLR7 e il TLR8 umano sono in grado di riconoscere ssRNA ricco di guanosina o uridina proveniente da virus come il virus HIV, il virus della stomatite vescicolare e il virus dell'influenza (Diebold S.S. *et al.*, 2004; Heil F. *et al.*, 2004).

Attualmente, i TLR10 non sono stati collegati ad uno specifico legando, inoltre la loro attività sembra essere inibitoria in particolare sulla produzione di IL-1 β , TNF- α , e IL-6 (Oosting M. *et al.*, 2014).

TLR	Localizzazione	Molecole associate a patogeni	Citochina indotta	Localizzazione tissutale*
TLR1	Membrana cellulare (superficie cellulare)	Triacil lipopeptidi (batteri e micobatteri)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.)	Ubiquitari Monociti/macrofagi, Cellule dendritiche mieloidi, Mastociti, Linfociti B
TLR2	Membrana cellulare (superficie cellulare)	Peptidoglicani (batteri Gram-positivi) Lipoarabinomannano (micobatteri) Emoagglutinina (virus del morbillo) Fosfolipomannano (<i>Candida albicans</i>) Glicosil-fosfatilinositolo (<i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.)	Monociti/macrofagi, Cellule dendritiche mieloidi, Granulociti, Mastociti, Cellule epiteliali epatiche, bronchiali, tubulari, Cervello, Cuore, Polmone, Milza
TLR3	Endosoma	ssRNA virus (WNV), dsRNS virus (Reovirus), virus respiratorio sinciziale, citomegalovirus murino	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.), IFN tipo I	Cellule dendritiche, Linfociti B, Placenta, Pancreas
TLR4	Membrana cellulare (superficie cellulare)	LPS (batteri Gram-negativi), Mannano (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i>), Glicoinositolo fosfolipidi (<i>Trypanosoma cruzi</i>), proteine dell'envelope (RSV e MMTV)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.), IFN tipo I	Monociti/macrofagi, Cellule dendritiche mieloidi, Mastociti, Epitelio intestinale, Milza, Linfociti T, Granulociti
TLR5	Membrana cellulare (superficie cellulare)	Flagellina (batteri flagellati)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.)	Monociti/Macrofagi, Cellule dendritiche, Epitelio intestinale, Ovaia, Prostata, Leucociti periferici
TLR6	Membrana cellulare (superficie cellulare)	Diacil lipopeptidi (micoplasmi), Zimosano (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), Acido lipoteicoico (batteri Gram-positivi)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.)	Monociti/macrofagi, Mastociti, Linfociti B, Timo, Milza, Polmoni
TRL7	Endosoma	ssRNA virus (VSV, influenzavirus)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.), IFN tipo I	Monociti/Macrofagi, Cellule dendritiche, Linfociti B, Polmoni, Placenta, Tonsille, Linfonodi, Milza
TRL8	Endosoma	ssRNA da RNA virus	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.), IFN tipo I	Monociti/Macrofagi, Cellule dendritiche, Mastociti, Polmoni, Placenta, Milza, Linfonodi, Midollo osseo
TRL9	Endosoma	dsDNA virus (HSV, MCMV), siti CpG di batteri e virus, Emozoina (<i>Plasmodium malariae</i>)	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.), IFN tipo I	Monociti/Macrofagi, Cellule dendritiche, Linfociti B, Milza, Linfonodi, Midollo osseo
TRL10	Membrana cellulare (superficie cellulare)	non identificati	inibizione di IL-1 β , TNF- α , e IL-6	Monociti/Macrofagi, Linfociti B, Milza, Linfonodi, Tonsille, Timo
TLR11	Membrana cellulare (superficie cellulare)	Molecole simil profillina (<i>Toxoplasma gondii</i>),	Citochine infiammatorie (TNF- α , IL6, etc.)	Monociti/Macrofagi Epatociti, Rene, Epitelio vescicale, Milza, Piccolo intestino

Tabella 1: Modificato da Kumar e coll. 2009 e da Broz e Monack 2013; *tessuti in cui è stato rilevato nelle diverse specie animali, incluso l'uomo.

TLR4

I TLR4 riconoscono specificatamente i lipopolisaccaridi batterici e la loro attivazione porta principalmente ad una sintesi di citochine pro-infiammatorie e chemiochine (Janssens *et al.*, 2003; Kanzler *et al.*, 2007). Recentemente, l'uso di agonisti dei TLR per stimolare preferenzialmente la risposta immunitaria dei T *helper* 1 o dei T *helper* 2 si è rivelato realisticamente fattibile (Alving *et al.*, 2012). Per esempio il monofosforilA, un derivato dei LPS, agonista dei TL4, è stato approvato come adiuvante per i vaccini umani contro l'epatite B e il papilloma virus (Ireton *et al.*, 2013; Johnson D.A., 2013). Altri TLR4-agonisti sono attualmente coinvolti in studi clinici. Per esempio l'adiuvante lipidico glucopiranosil, è attualmente in prova come adiuvante in un possibile vaccino contro la tubercolosi (Meyer *et* McShane, 2013). Questi nuovi e sicuri adiuvanti possono facilitare lo sviluppo di vaccini contro bersagli scarsamente immunogeni. Gli studi preclinici sono solitamente effettuati in modelli animali murini assunti come rappresentativi del sistema immunitario dei mammiferi. Sebbene molti aspetti del sistema immunitario sia innato che adattativo siano comuni tra uomo e topo, sono state rilevate numerose differenze tra le due specie nella risposte all'attivazione dei TLR (Schroder *et al.*, 2012). Nonostante le differenze delle sequenze che codificano per i TLR tra le diverse specie, le funzioni biologiche di base e le vie di trasmissione del segnale dei TLR sono sovrapponibili tra diverse specie (Ketloy *et al.*, 2008; Rehli M., 2002).

Nel 1999, Qureshi e coll. identificarono il gene del TLR4 nella regione cromosomiale LPS come responsabile della mancata risposta ai LPS in alcuni ceppi di topi. Furono identificate anche alcune mutazioni nei geni del TLR4 di ceppi di topi iporeattivi ai LPS, dimostrando che il TLR4 è essenziale per mediare la risposta ai LPS in vivo (Poltorak *et al.*, 1998; Qureshi *et al.*, 1999). Oltre al LPS, un componente della membrana esterna di batteri Gram negativi, i TLR4 di diverse specie riconoscono molti altri componenti dei patogeni come i polimeri di acido mannuronico di batteri Gram negativi, l'acido teicoico dei batteri Gram positivi e componenti virali come la proteina F del virus respiratorio sinciziale (Yanga *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2001; Kurt-Jones *et al.*, 2000). Oltre a componenti esogene, i TLR4 si legano con molecole endogene come proteine liberate dai tessuti in corso di shock da calore nel topo, nel ratto e nell'uomo (Ohashi *et al.*, 2000; Vabulas *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009; Roelofs *et al.*, 2006). L'extra dominio A della fibronectina e gli acidi grassi saturi sono potenzialmente riconosciuti da TLR4 umani e murini, il gruppo eme dai TLR4 murini (Gondokaryono *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007;

Tsukumo *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2007). I perossidi d'idrogeno dell'estere del colesterile, componente attiva delle lipoproteine a bassa densità minimamente modificate, sono state recentemente individuati come TLR4 agonisti (Choi *et al.*, 2009). Questi studi dimostrano che molecole prodotte o circolanti durante situazioni anormali, come un danno tissutale, sono in grado di innescare l'attivazione dei TLR4 (Medzhitov *et al.*, 1997).

Strutturalmente, i TLR4 formano un complesso sulla superficie cellulare con diverse proteine necessaria per il riconoscimento del ligando (Fitzgerald *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005). Nel siero, inizialmente l'LPS è legato dalla proteina LBP che trasferisce l'LPS al CD14. Il CD14 è una proteina di membrana legata al glicosilfosfatidilinositolo che circola anche in forma solubile e che lega i complessi LPS-LPB con alta affinità. Mentre il CD14, da solo, manca di un dominio intracellulare per innescare il segnale, associato al TLR4 forma un complesso funzionale LPS-recettore. Il legame di LPS richiede anche la proteina MD-2 che è associata al dominio extracellulare del TLR4 (Park *et al.*, 2009). Quindi il complesso attivo recettore-LPS richiede il CD14, il TLR4 e l'MD-2, anche se uno studio suggerisce che il CD14 e la LBP migliorino soltanto la risposta al LPS dipendente dal TLR4 e non siano necessari per il legame e la risposta al LPS (Lizundia *et al.*, 2008).

TLR nel suino

I TLR nel suino sono stati studiati per la loro importanza nella difesa dalle infezioni e per verificarne il ruolo. La distribuzione dei TLR9 nei polmoni e in diversi tessuti linfoidei è stata indagata in diversi studi (Kuzemtseva *et al.*, 2015; Shimosato *et al.*, 2005) che ne hanno riscontrato, con tecniche immunoistochimiche e con PCR, la presenza nelle cellule epiteliali, nell'endotelio vascolare, nelle cellule dei setti alveolari, in diverse cellule presentanti l'antigene delle zone perifollicolari della placche del Peyer, nei linfonodi, nella milza e nel timo.

Nel suino, a differenza del bovino (Werling *et al.*, 2006), i macrofagi alveolari esprimono i TLR3 (Chaung *et al.*, 2010; Sang *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2009). In suini infettati con PRRSV e PCV2 sono stati evidenziati due distinti comportamenti nell'espressione dei TLR: un aumento dei TLR2, 4 e 8 e una diminuzione dei TLR3, 7 e 9 (Tu *et al.*, 2015).

I TLR2 e i TLR4 sono tra i più studiati per il loro ruolo nella difesa da infezioni batteriche. In diversi casi, nel suino, è stato rilevato un aumento dell'espressione di questi due recettori: di entrambi, in caso di stress da calore (Ju *et al.*, 2014) e, dei TLR2, in caso d'infezione mammaria da *E. coli* (Zhu *et al.*, 2008). In suini selezionati per la resistenza a *Mycoplasma pneumoniae* l'espressione dei TLR2 e 4 nei tessuti linfoidei si è rilevata più alta rispetto al gruppo di controllo, suggerendo una particolare importanza di questi recettori associata ad altri parametri immunitari nella difesa da infezioni polmonari da micoplasmi (Borjigin *et al.*, 2016).

L'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-TLR2 ha permesso di evidenziare la presenza di questi recettori in monociti, macrofagi, granulociti, ma non in linfociti del sangue periferico. La colorazione di sezioni tissutali ha rilevato l'espressione del TLR2 in cellule epiteliali, dei tratti tracheobronchiale e intestinale, dotti biliari, tubuli renali e lamina basale dell'epidermide (Alvarez *et al.*, 2008).

Nel suino, i monociti e le cellule dendritiche di derivazione monocitaria (mo-DC) in vitro mature ed immature esprimono trascritti dei TLR4, mentre questi non sono stati riscontrati in mo-DC mature umane (Alvarez *et al.*, 2006). Nelle cellule mononucleari suini, i LPS inducono la trascrizione di TLR4, CD14 e RNA messaggero dei MD-2 e di diverse citochine come Il-1, Il-10, IL12, TNF- α e TNF- γ (Raymond *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2011). Sebbene l'espressione dei TLR4

aumenti nei monociti umani in seguito all'esposizione al LPS, lo stesso effetto non si ha nei monociti suini (Raymond *et al.*, 2005).

I livelli più alti di mRNA di TLR4 suino sono stati riscontrati con l'uso della PCR nel colon e nella milza. L'mRNA dei TLR4 è stato trovato anche nei polmoni, piccolo intestino, fegato, reni, timo, linfonodi, cervello (ipotalamo, ippocampo, corteccia e cervelletto), tonsille, ovaie e cornea, ma non nella pelle e nel muscolo (Thomas *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2006; Burkey *et al.*, 2007; Wassef *et al.*, 2004). Studi immunoistochimici hanno rivelato che, nei polmoni, il TLR4 è espresso dai macrofagi e dall'epitelio, nel fegato dalle cellule del Kupffer e dall'epitelio dei dotto biliari. Comunque né gli epatociti né l'epitelio vascolare epatico lo esprimono. Il TLR4 è espresso anche nelle cellule M e nel tessuto linfoide associato al sistema gastrointestinale. In suini infettati con PRRSV, l'espressione del TLR4 è aumentata nei linfonodi tracheobronchiali, nel cervello, nell'ipotalamo, nell'ippocampo, nella corteccia e nel cervelletto, ma non nei polmoni (Miguel *et al.*, 2010). Ceppi molto virulenti del virus della PRRS sono forti induttori dei TLR3, 7 e 8 in macrofagi alveolari e nella zona midollare del cervello rispetto a ceppi a bassa patogenicità dello stesso virus (Zhang *et al.*, 2013).

RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*

La polmonite enzootica suina (PEN), causata principalmente da *Mycoplasma hyopneumoniae*, è una malattia contagiosa riscontrata in molti allevamenti suini (Marè *et al.*, 1966). La malattia è caratterizzata da alta morbilità e, sebbene sia associata con una bassa mortalità, determina una diminuzione dell'incremento medio ponderale dei suini in ingrasso e dell'indice di conversione (Morrison *et al.*, 2000), causando gravi perdite economiche (Sarradell *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2006; Thomsen *et al.*, 1992; Straw, 1989; Noerregaard *et al.*, 2016). Il danno causato da *M. hyopneumoniae* all'epitelio respiratorio predispone gli animali ad infezioni secondarie di organismi come *Pasteurella multocida* (Amass *et al.*, 1994), *Haemophilus parasuis* (Williams *et al.*, 2000), virus influenzali (Thacker *et al.*, 2001), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Vigre *et al.*, 2004), virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) (Thacker *et al.*, 2000; Thanawongnuwech *et al.*, 2001, 2004; Thanawongnuwech and Thacker, 2003), e circovirus suino tipo II (PCV2) (Opriessnig *et al.*, 2004). Le infezioni secondarie sono la principale causa dei danni economici all'allevamento, poiché l'infezione sostenuta da *M. hyopneumoniae* non influisce sulle performance di crescita del suino (Escobar *et al.*, 2002).

La trasmissione dell'infezione avviene per via inalatoria e successiva localizzazione nelle prime vie respiratorie. La fase primaria dell'infezione è caratterizzata da arresto dell'attività ciliare nelle aree colonizzate, adesione all'apice delle cellule ciliate e loro progressiva distruzione. La colonizzazione della mucosa respiratoria avviene grazie alle adesine batteriche.

M. hyopneumoniae ha dimensioni cellulari di 400-120nm con forma pleomorfica dovuta alla mancanza di parete cellulare. In laboratorio è difficilmente coltivabile e l'isolamento spesso richiede 4-8 settimane.

M. hyopneumoniae induce una risposta immunitaria lenta e inefficace evidenziata dalla lenta sierconversione e dai bassi livelli di anticorpi nel tratto respiratorio (Djordjevic S.P. *et al.*, 1997; Thacker E.L. *et al.*, 2000; Thacker E.L. *et al.*, 1998). Una componente fondamentale della patogenesi di *M. hyopneumoniae* riguarda i cambiamenti immunopatologici che comprendono una diminuzione dell'attività fagocitaria dei macrofagi alveolari (Caruso J.P. e Ross R.F., 1990), la diminuzione della risposta dei linfociti a mitogeni non specifici (Kishima M. e Ross R.F., 1985) e la produzione di citochine infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α (Thacker E.L. *et al.*, 2000; Asai T.M. *et al.*, 1993; Asai T.M. *et al.*, 1994).

Inoltre, nel liquido di lavaggio bronchiale si rilevano livelli aumentati di IL-8, IL-10 e IL-12 (Thacker E.L. *et al.*, 1999). La produzione di TNF- α da parte dei macrofagi alveolari è dipendente dalla stimolazione dei TLR2 e 6 (Muneta *et al.*, 2003).

In uno studio del 2011 è stata valutata l'espressione dei TLR6 due diversi gruppi genetici di suini in seguito alla vaccinazione contro *M. hyopneumoniae*. I risultati hanno mostrato una diminuzione dell'espressione dei TLR6 in seguito alla vaccinazione e una significativa differenza di espressione tra i due gruppi genetici (Régia Silva Sousa K. *et al.*, 2011). Inoltre, in un'altra ricerca, è stata evidenziata una diminuzione dell'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto linfoide associato ai bronchi in seguito a vaccinazione (Vranckx *et al.*, 2012).

La diagnosi d'infezione può esser fatta con metodi diretti o indiretti. I metodi diretti comprendono l'isolamento del battere, l'evidenziazione dell'agente su preparati istologici o freschi mediante tecniche d'immunofluorescenza, l'esecuzione di una PCR o real time-PCR (RT-PCR) su tessuti o campioni biologici quali liquido da lavaggio bronchio-alveolare. Tra i metodi indiretti il più utilizzato è il test ELISA.

Le lesioni rilevabili macroscopicamente sono caratterizzate da epatizzazione del parenchima polmonare più frequentemente nelle aree cranioventrali del polmoni (figura 2). Istologicamente è rilevabile un'iperplasia dei complessi BALT (Bronchial associated lymphoid tissue) e notevole essudato intrabronchiolare (vedi figura 3).

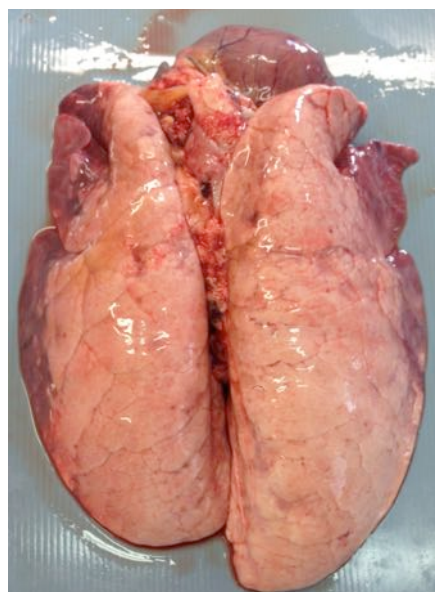


Figura 2: polmone con lesioni macroscopiche dei lobi apicali caratterizzate da aree di consolidamento del parenchima riconducibili a *M. hyopneumoniae*.

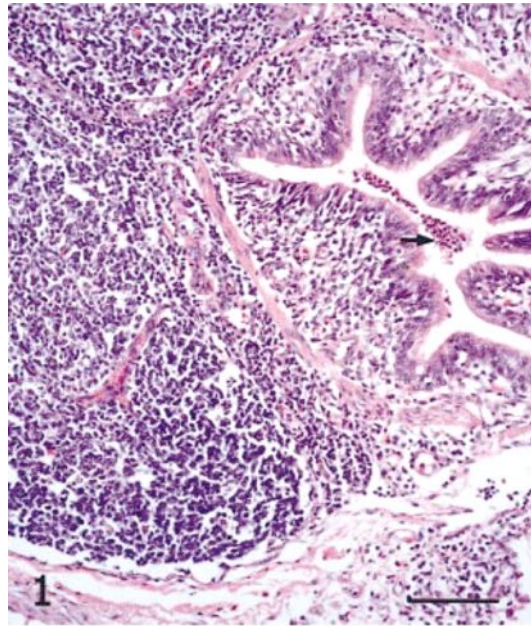


Figura 3: Iperplasia linfocitaria peribronchiolare e perivascolare, macrofagi e neutrofili nel lume delle vie aeree (freccia). Ematossilina-eosina, barra: 95 μ m. Da J. Sarradell *et al.*, 2003.

Diversi studi hanno valutato la risposta immunitaria in caso d'infezione da *M. hyopneumoniae* nel suino delineando i vari aspetti che la compongono. Sarradell e coll. nel 2003 hanno descritto chiaramente le lesioni ascrivibili a *M. hyopneumoniae* riscontrabili istologicamente. I polmoni infetti da *M. hyopneumoniae* mostravano iperplasia linfoide del tessuto linfoide associato al bronco (BALT) che provoca oblitterazione del lume bronchiale ed atelettasia degli alcoli circostanti (figura 3). MH colonizza la superficie luminale dei bronchi e bronchioli senza penetrare nel parenchima polmonare, causando la riduzione dell'attività ciliare, la perdita delle ciglia, la formazione di microcolonie e l'accumulo di batteri, portando anche all'esfoliazione dell'epitelio. L'epitelio sopra i noduli prominenti si presenta degenerato ed esfoliato. Nella comparazione con animali controllo, si evidenziava la diffusa perdita di ciglia in differenti superfici bronchiali. Nei bronchi e nei bronchioli si evidenziava un'iperplasia delle cellule caliciformi. I setti alveolari sono ispessiti dall'accumulo di piccoli e grandi linfociti, plasmacellule e neutrofili. Negli alveoli si evidenziava una moderata iperplasia dei pneumociti di tipo II (Sarradell *et al.*, 2003). Nello stesso studio è stata rilevata, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali per CD3, un'intensa immunoreattività sulla superficie e nel citoplasma di cellule mononucleari. I linfociti CD3+ sono stati riscontrati nelle aree perifollicolari e interfollicolari così come all'interno d'infiltrazioni di cellule mieloidi nelle pareti alveolari (vedi figura 4). Numerosi cellule positive si osservavano nella lamina propria dei bronchi e dei bronchiolo e tra l'epitelio

delle vie aeree (Sarradell *et al.*, 2003). Utilizzando anticorpi anti-SLA-II e S-100 si rilevavano, nei centri germinali dei BALT, cellule stellate con lunghi processi citoplasmatici. Alla periferia dei BALT, nella lamina propria dei bronchi e dei bronchioli, nei setti alveolari e attorno alle ghiandole bronchiali submucosali erano presenti plasmacellule contenenti IgG o IgA. Le cellule CD4+ predominavano sulle CD8+.

Lo stesso quadro istologico è stato riscontrato da Redondo e coll. (2009) che hanno seguito l'andamento di un'infezione sperimentale con *M. hyopneumoniae*. Le lesioni istopatologiche sono state rilevanti tra i 7 e i 28 giorni post infezione coincidendo con un aumento dell'espressione, rilevata con tecniche immunoistochimiche, delle citochine (IL-1a, IL-1b, IL-8, e INF-g) e dei marcatori linfatici quali CD4+, CD8+, muramidasi, IgG+ e IgA+ (Redondo *et al.*, 2009). Con tecniche di RT-PCR è stato rilevato un aumento dell'espressione di IL-1, TNF-alpha e IL-6 in suini infettati sperimentalmente con *M. hyopneumoniae* dopo sette giorni dall'infezione (Choi *et al.*, 2006). Lo stato infiammatorio nei siti d'infezione è dimostrato anche dall'aumento di espressione di ciclossigenasi-2 nelle cellule epiteliali bronchiali e bronchiolari, nelle ghiandole della sottomucosa e nei macrofagi presenti nell'essudato broncoalveolare (Andrada *et al.*, 2014).

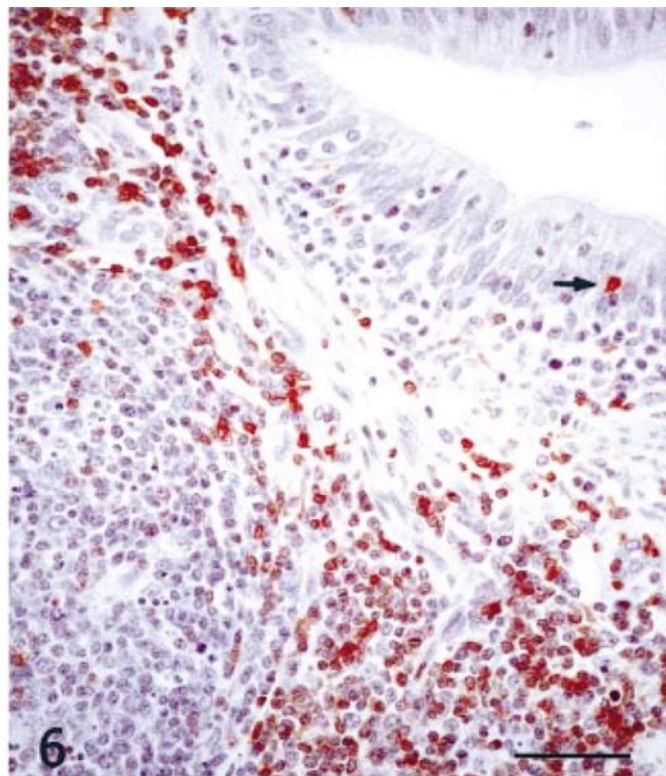


Figura 4: linfociti CD3+ immunocolorati localizzati principalmente nelle aree perifollicolari dei BALT e nella lamina propria dei bronchioli (freccia). Metodo ABC, ematossilina di Harris, barra= 65 µm. Da J. Sarradell *et al.*, 2003.

PARTE SPERIMENTALE

Introduzione

COMPONENTI IMMUNITÀ CELLULO-MEDIATA

L'immunità cellulo-mediata è gestita dai linfociti T. Queste cellule non producono anticorpi, ma agiscono distruggendo direttamente il "bersaglio" o facendolo distruggere da cellule accessorie che vengono stimulate dalle linfochine, sostanze solubili da esse prodotte. I linfociti T, quando riconoscono e si legano a un antigene mediante il loro recettore specifico, vengono attivati e proliferano formando un clone di cellule immunocompetenti, nella regione dell'organismo dove è concentrato l'antigene, oltre che nei linfonodi dove l'antigene è trasportato dai macrofagi che lo hanno fagocitato, processato e presentato in superficie. Tra queste cellule che proliferano rapidamente si differenziano, su base funzionale, tre distinte sottopopolazioni: a) cellule regolatrici, b) cellule della memoria, c) cellule effettrici.

Le cellule regolatrici modulano l'intensità della risposta immunitaria e inoltre intervengono nella cooperazione tra immunità cellulo mediata e immunità umorale. I linfociti T *helper* svolgono il ruolo centrale in questa regolazione. Più precisamente, la sottoclasse di linfociti T *helper*, denominata T_h1 , controlla l'attivazione dei macrofagi, aumentandone l'efficienza nella neutralizzazione dei microrganismi fagocitati; la sottoclasse *helper*, denominata T_h2 , interagisce invece con i linfociti B, al fine di avviare o di aumentare la produzione anticorpale. Questo tipo di interazione rappresenta un sistema di sicurezza, per evitare che accidentalmente un linfocita B inizi a produrre anticorpi in modo incontrollato. Una seconda popolazione di cellule regolatrici è quella dei linfociti T *suppressor*, che agiscono limitando la risposta anticorpale e questo da un lato consente di impedire che una risposta immunitaria eccessiva possa danneggiare l'ospite stesso e, dall'altro, evita un'inutile produzione di anticorpi quando non sono più necessari. Le cellule della memoria rappresentano un ulteriore pool di linfociti T che, dopo stimolazione da parte dell'antigene, permangono per lunghi periodi, anche dopo la scomparsa di quest'ultimo. Queste cellule "sensibilizzate" rimangono quiescenti finché non incontrano successivamente lo stesso antigene: in questo caso si riattivano molto rapidamente dando luogo alla proliferazione di un pool di linfociti effettrici e regolatori. Questo tipo d'immunità cellulo mediata "della memoria" è simile alla risposta umorale anamnestic e ha la funzione di ridurre il periodo di latenza da circa 20 giorni a solo 48-72 ore.

Le cellule effettrici o linfociti T citotossici attaccano fisicamente le cellule

bersaglio e le distruggono inducendo alterazioni di membrana cui consegue la lisi. L'immunità cellulo mediata è d'importanza fondamentale nelle difese immunitarie contro microrganismi a parassitismo intracellulare quali protozoi, funghi, virus e batteri soprattutto dei generi *Listeria*, *Brucella* e micobatteri tubercolari. In effetti, per combattere i microrganismi che si replicano all'interno delle cellule dell'ospite, gli anticorpi che non sono in grado di penetrare nelle cellule sono inefficienti. I linfociti T citotossici sono particolarmente efficienti nel riconoscere e distruggere le cellule infette o comunque alterate. L'immunità cellulo mediata è inoltre d'importanza fondamentale nei fenomeni di rigetto dei trapianti e nel sistema che individua e distrugge le cellule neoplastiche, tramite le cellule denominate *natural killer*. Per realizzare questi meccanismi effettori, i linfociti T, a differenza dei linfociti B, sono capaci di riconoscere e reagire, attraverso il loro recettore specifico di membrana (Tcr) solo con brevi sequenze di peptidiche, appartenenti al microrganismo invasore, presenti o sulla superficie di cellule specializzate (ad es. i macrofagi), che fungono da *antigen presenting cells*, oppure presenti sulla superficie di cellule infette o comunque alterate che devono quindi venire distrutte. Più precisamente gli antigeni riconosciuti dai linfociti T sono parti di un agente patogeno che vengono presentate sulla superficie delle cellule dopo essere state elaborate e montate in un complesso con proteine cellulari della cellula stessa, che sono codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC).

LINFOCITI T

I linfociti T sono coinvolti nel processo di coordinazione della risposta immunitaria cellulo-mediata. I linfociti T sono distinti in due sottopopolazioni principali, caratterizzate dal diverso meccanismo d'azione e dal meccanismo di funzionamento: linfociti T *helper* e linfociti T citotossici. Altre sottopopolazioni di minor importanza sono i linfociti T memoria, linfociti T regolatori, linfociti T *natural killer* e linfociti T γ/δ . I linfociti T originano nel midollo osseo e maturano nel timo. Durante la maturazione attraversano vari stadi che si possono distinguere in base ai recettori espressi in superficie. I linfociti T non possiedono né immunoglobuline di membrana, né recettori per la frazione C3b del complemento. Possono però essere identificati per la presenza di una grande varietà di antigeni di superficie. Il recettore più importante delle cellule T è il recettore per l'antigene: il cosiddetto *T cell receptor* o Tcr. Tale recettore è molto complesso in quanto è strettamente aggregato ad altre proteine di superficie, quali la CD3, presente su tutti i linfociti T e, inoltre, o alla CD4 o alla CD8, a

seconda che il linfocita T abbia, rispettivamente, funzioni di *helper* o di citotossico/*suppressor*. Il linfociti T *helper* sono cellule ad attività regolatrice della risposta immunitaria che esprimono il fenotipo CD4+ e CD8-. Costituiscono circa un terzo della popolazione delle cellule T mature e hanno il ruolo di amplificare la funzione di altre cellule: aiutano i linfociti B a produrre gli anticorpi e a secernearli; inducono i linfociti citotossici a differenziarsi in cellule effettrici e stimolano i macrofagi e altre cellule non specifiche ad intervenire nelle reazioni di ipersensibilità ritardata. Queste diverse funzioni sono svolte da diverse sottopopolazioni di linfociti T *helper*: i linfociti T *helper* 1 (Th1) stimolano le cellule citotossiche e attivano i macrofagi, promuovendo quindi soprattutto la risposta immunitaria cellulo-mediata; i linfociti T *helper* 2 (Th2) stimolano invece la proliferazione dei linfociti B e quindi la sintesi delle diverse classi anticorpali, promuovendo specificatamente la risposta immunitaria di tipo umorale. Le cellule Th1 e Th2 producono diverse citochine: IL-2, IFN- γ , TNF- α e LT- α le cellule Th1; IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 le cellule Th2.

I linfociti T citotossici (CTL) sono indotti dall'IL-2 e possono espandere il loro numero migliaia di volte al picco della risposta immunitaria. Il sistema CTL lisa cellule allogeniche, che veicolano antigeni di istocompatibilità di classe I diversi dai propri e cellule singeniche, cioè con gli stessi antigeni di istocompatibilità, che siano però stati modificati nella loro struttura.

I linfociti T *suppressor*, o Treg, sono deputati a sopprimere direttamente o attraverso fattori solubili (TGF- β , IL-10 e IL-35), l'attività di altre cellule immunitarie e più precisamente dei linfociti B, di alcuni tipi di linfociti T e dei macrofagi.

Il recettore con cui i linfociti T riconoscono l'antigene è il recettore, un eterodimero, denominato Tcr che viene espresso sulla membrana in associazione con un altro complesso molecolare denominato CD3 che è coinvolto nella trasmissione del segnale all'interno della cellula. Pertanto la struttura responsabile del riconoscimento dell'antigene estraneo associato all'antigene d'istocompatibilità è rappresentato dall'eterodimero α/β associato ad una serie di peptidi denominati nel loro insieme CD3. Oltre all'eterodimero α/β è stato individuato un altro tipo di eterodimero transmembrana con catene γ/δ . Questi due tipi di eterodimeri sono presenti in diverse percentuali nelle diverse specie. Nell'uomo il 95%-99% dei linfociti T veicola Tcr α/β , mentre nei ruminanti il 30-60% veicola Tcr γ/δ .

I linfociti T regolatori, Treg, sono una sottopopolazione dei linfociti T che modula la risposta immunitaria, mantiene la tolleranza agli auto-antigeni e

prevengono le malattie autoimmuni. I Treg sono immunosoppressivi e generalmente rallentano l'induzione e la proliferazione dei linfociti T effettori. I Treg esprimono i biomarcatori CD4, FOXP3, e CD25 e derivano dalla stessa linea dei linfociti T CD4+ (Broere *et al.*, 2011; Poli e Rocchi, 2005).

MACROFAGI

I macrofagi sono cellule mononucleate tissutali che appartengono al sistema dei fagociti. Di quest'ultimo sistema fanno parte anche i granulociti neutrofili e i monociti. Essi svolgono un ruolo molto importante nelle risposte immunitarie naturali e specifiche. La loro funzione principale è la fagocitosi cioè la capacità di inglobare nel loro citoplasma particelle estranee, compresi i microrganismi, e di distruggerle. Secernono inoltre citochine ad attività proinfiammatoria e presentano l'antigene ai linfociti T-CD4. I macrofagi hanno una dimensione che varia da 12 a 25 µm di diametro e hanno una vita media di circa 75 giorni e oltre. Originano nel midollo osseo da cellule precursori e passano nel sangue come monociti; questi, dopo essere rimasti in circolo per circa 10-30 ore, migrano nei tessuti dove si trasformano in macrofagi. I monociti del sangue, che rappresentano circa il 5% dei leucociti circolanti, quando passano nei tessuti divenendo macrofagi, acquisiscono una maggiore attività fagocitaria, che si accompagna a un aumento dimensionale del citoplasma e anche numerico degli organuli quali lisosomi, microtuboli, microfilamenti e delle membrane dell'apparato di Golgi; inoltre il nucleo diviene più irregolare e acquisisce uno o più nucleoli.

Monociti e macrofagi, che sono caratterizzati dalla capacità di aderire saldamente alle superfici solide, di muoversi attivamente, di rispondere intensamente agli stimoli chemiotattici e di essere capaci di fagocitare le sostanze più diverse, organiche come virus, batteri protozoi, complessi antigene-anticorpo, sia inorganiche come carbone, silice asbesto, ecc., realizzano un sistema difensivo molto efficiente: il sistema fagocitario mononucleare. L'intensa capacità fagocitaria di queste cellule è dovuta alla presenza sulla loro membrana di recettori specifici per le sottoclassi IgG1 e IgG3: tale caratteristica consente loro di "catturare" specificatamente e di fagocitare gli antigeni rinvenuti nei vari tessuti linfoidi e, in articolari circostanze di attaccare cellule di mammiferi che presentino sulla loro superficie l'antigene corrispondente. Come gli altri fagociti, presentano anche i recettori per la porzione Fc degli anticorpi, dopo che questi si sono legati con l'antigene, e recettori per la frazione C3b del complemento. I macrofagi presenti nel sito d'infezione presentano un aumento del numero dei

lisosomi contenenti enzimi idrolitici e inoltre producono altri enzimi tra i quali attivatori del plasminogeno, collagenasi, elastasi, proteasi e lisozima. In questo modo acquisiscono un'eccezionale capacità di digerire materiali diversi, tra cui proteine, polisaccaridi e acidi nucleici. I macrofagi attivati producono anche linfocine che intervengono nell'attivazione dei linfociti. Altri fattori prodotti dai macrofagi includono le frazioni C2, C3, C4, e C5 del complemento, le prostaglandine, l'IFN- α e un fattore che stimola la replicazione delle cellule del midollo osseo. Queste citochine sono essenziali per la risoluzione delle infezioni ma sono anche responsabili di danni tissutali.

Il richiamo e l'attivazione dei fagociti (macrofagi e neutrofili) sono favoriti da fenomeni di chemiotassi, che gli stessi microrganismi invasori inducono, soprattutto attraverso la reazione infiammatoria. Il contatto tra fagocita e particella estranea viene facilitato dalla presenza su quest'ultima di sostanze plasmatiche, quali fibronectina o frazioni del complemento, che tendono a legarsi ai batteri alle sostanze particolate in genere. Il massimo di efficienza della fagocitosi si realizza quando i microrganismi sono ricoperti da anticorpi: il complesso antigene-anticorpo tende infatti ad aderire molto efficacemente alla cellula fagocitaria, per la presenza su quest'ultima di recettori specifici per molecole anticorpali modificate dal loro legame con l'antigene. In alternativa, il complesso antigene anticorpo può fissarsi al fagocita per l'intervento di componenti del complemento che, da un lato, si legano alla porzione Fc dell'anticorpo, dall'altro a specifici recettori (CD16) che i macrofagi presentano sulla membrana. I macrofagi possono essere identificati tramite citometria o immunoistochimica attraverso la messa in evidenza di specifiche proteine come il CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80 (topo)/EMR1 (uomo), lisozima M, MAC-1/MAC-3 e CD68 (Khazen *et al.*, 2005). Il recettore CD14 riconosce LPS dei batteri Gram negativi. I macrofagi alveolari del suino esprimono i TLR3, i TLR2 e i TLR6 (Zhang *et al.*, 2013; Muneta *et al.*, 2003).

LINFOCITI B

I linfociti B, responsabili della risposta immunitaria di tipo umorale, sono in grado, differentemente dai linfociti T, di riconoscere e reagire, tramite il specifico recettore (BCR), direttamente con epitopi presenti sulla superficie dei microrganismi invasori o su qualunque altra sostanza estranea solubile, rilasciata dal patogeno. I linfociti B si sviluppano dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo e qui maturano. Il linfocita B maturo veicola sulla sua superficie immunoglobuline di una determinata classe anticorpale

specifiche per un determinato antigene, per cui solo quest'ultimo viene riconosciuto da tale linfocita, mentre tutti gli altri antigeni vengono ignorati. La maturazione di queste cellule attraversa diversi stadi caratterizzati dalla presenza di diversi isotipi: durante l'ontogenesi, la prima cellula identificabile come appartenente alla linea dei linfociti B, è la cellula pre-B, caratterizzata dalla presenza di IgM citoplasmatiche, ma non di membrana; lo stadio successivo della cellula B immatura è caratterizzato dalla presenza di IgM anche sulla membrana. In questo stadio i linfociti sono estremamente sensibili all'induzione della tolleranza nei confronti di antigeni che dovessero incontrare. Si passa poi alle cellule B mature che acquisiscono la capacità di produrre una determinata classe anticorpale (IgG, IgA, IgE, o IgM); questi linfociti presentano sulla membrana, oltre alle IgM, anche l'isotipo che saranno in grado di produrre dopo l'incontro con l'antigene. Durante le varie fasi di maturazione sono espresse sulla superficie diverse proteine, nelle cellule mature sono espresse la CD4, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD32, CD35, CD40, CD72, CD79 α e le molecole MHC di classe I e di classe II. L'attivazione dei linfociti B può essere indotta dal semplice legame con l'antigene col BCR, con l'aiuto di frammenti del complemento oppure dall'attivazione dei TLR che attivano a loro volta i linfociti stessi. In particolare, per quest'ultima via bisogna ricordare che i linfociti B esprimono i TLR5, TLR7 e TLR9 che riconoscono rispettivamente flagellina batterica, RNA a singola elica e sequenze non metilate in DNA presenti negli endosomi. Per la maggior parte degli antigeni proteici l'attivazione non causa una risposta diretta di produzione di anticorpi, bensì l'internalizzazione del BCR legante l'antigene per processarlo ed esporlo sulle molecole MHC di classe II in attesa che i linfociti T helper lo riconoscano. Lo stimolo a un'intensa replicazione e differenziazione dei linfociti B, già attivati, avviene ad opera dei linfociti T_H2 sia per contatto diretto, sia attraverso la produzione di IL-4 (Poli e Rocchi, 2005; Rosser e Mauri, 2015; LeBien e Tedder, 2008).

Materiali e Metodi

Prelievo dei campioni

Durante il 2016 sono stati valutati al macello gli score polmonari di 5 partite di suini grassi provenienti da 5 diversi allevamenti, che praticano la vaccinazione per *M. hyopneumoniae* con due inoculi, uno a 15 giorni di vita e uno a circa 180 giorni. Per ogni partita, composta da 130-140 animali, sono stati valutati almeno 100 polmoni secondo il metodo proposto da Madec e Kobish (1982) per definire uno score polmonare individuale. Da ogni partita sono stati prelevati campioni di polmoni con lesioni riconducibili a *M. hyopneumoniae* per la ricerca del micoplasma tramite real time PCR come descritto da Marois e coll. (2010), eseguita presso la Sezione di Diagnostica di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale.

Per le ricerche istologiche ed immunoistochimiche, eseguite presso Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Generale del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma, sono stati prelevati campioni rappresentativi dei polmoni con lesioni e campioni di tessuto adiposo mediastinico dello stesso animale, vedi tabella 2.

I campioni di tessuto adiposo sono stati divisi in due aliquote: una è stata congelata in azoto liquido e una è stata inclusa in paraffina. I tessuti congelati sono stati sezionati a 5µm al criostato e posti su vetrini polilisinati.

Allevamento	Numero polmoni campionati per ricerca <i>M. hyopneumoniae</i>	Numero campioni per immunoistochimica
A	46	13
B	11	6
C	14	10
D	7	7
E	16	13

Tabella 2: campioni utilizzati per la ricerca di *M. hyopneumoniae* e per le indagini istologiche ed immunoistochimiche.

Istologia

I campioni di polmoni, 49 tra quelli campionati, 32 RT-PCR positivi e 17 negativi, sono stati disidratati e inclusi in paraffina. Successivamente sono state ottenute sezioni di 5µm su vetrini polisinati (Buchwalow e Böcker, 2014). Per ogni campione, dopo colorazione con ematossilina-eosina, sono state valutate l'attivazione dei BALT, la disepitelizzazione dell'epitelio bronchiale e la presenza d'inflammation bronco-polmonare acuta attraverso la valutazione degli aggregati neutrofilici-macrofagici nei lumi bronchiali ed alveolari. Per la classificazione delle lesioni sono stati stabiliti 4 livelli per ciascun parametro sopraelencato, da 0 a 3.

Immunoistochimica

Le sezioni di tessuto polmonare incluso in paraffina sono state colorate con tecnica immunoistochimica avidina-biotina-perossidasi per fenotipizzare i tessuti con gli anticorpi riportati in tabella 3.

Le sezioni ottenute da tessuti fissati in formalina sono state sottoposte a smascheramento antigenico, in quanto la fissazione maschera i determinanti antigenici per la formazione di legami crociati. Le perossidasi endogene sono state bloccate con idrogeno perossido (H_2O_2 30%w/w) al 3% in PBS per i tessuti inclusi in paraffina e allo 0.3% per le sezioni. Tutte le sezioni sono state trattate con siero normale di capra diluito al 10% in PBS per eliminare i legami con epitopi aspecifici. In seguito, tutte le sezioni sono state incubate con un anticorpo secondario biotinilato anti anti-mouse IgG-B (sc-2039 Santa Cruz Biotechnology, inc.) 1:200 in PBS per 30 minuti. L'amplificazione del segnale è stata ottenuta con Vectastain Elite ABC kit di Vector Laboratories per 30 minuti e la colorazione della reazione è stata effettuata con diaminobenzidina DAB (DAKO Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System) applicata per 5-10 minuti. Come controcolorazione nucleare è stata utilizzata l'ematossillina di MAYER per 5 minuti, quindi le sezioni sono state disidratate e coperte con vetrini coprioggetto (Buchwalow e Böcker, 2014).

La valutazione della presenza dei linfociti Treg è stata effettuata contando le cellule colorate positivamente in almeno quattro BALT per campione.

La presenza dei macrofagi, dei linfociti T e dei linfociti B è stata valutata su 4 campi visivi per campioni a 200 ingrandimenti, con una scala da 0 a 4: 0 per i

campioni in cui non si rilevavano cellule colorate, 1 dove si rilevavano mediamente fino a 20 cellule, 2 da 20 a 60 cellule, 3 da 60 a 100 cellule e 4 per i campioni con più di 100 cellule.

Per la fenotipizzazione dei TLR-4 nei tessuti adiposi mediastinici, è stato necessario utilizzare il materiale congelato in azoto liquido perché l'anticorpo monoclonale anti-TLR-4 si è rivelato inefficace nei campioni fissati in paraffina. I campioni congelati in azoto liquido, non subendo la fissazione, presentano i determinanti antigenici non mascherati sulla loro superficie. La valutazione dell'espressione dei TLR4 è stata effettuata su 20 campioni, utilizzando una classificazione semi quantitativa in base alla diffusione ed intensità della colorazione su quattro livelli: assente, lieve, media, intensa su quattro campi a 4 ingrandimenti.

Anticorpo (Clone)	Tipo Di Ab	Produttore	Diluizione	Smascheramento Antigenico in Microonde (4 Cicli A 800Watt)	Tempi Di Incubazione	Numero di campioni processati
CD3 (CD3-12)	Monoclonale	AbD Serotec	1:100	Tampone pH9	1 Ora	16 pos 7 neg 23 tot
CD79 α (HM57)	Monoclonale	AbD Serotec	1:30	Tampone pH6	1 Ora	16 pos 7 neg 23 tot
MAC387 (MAC387)	Monoclonale	AbD Serotec	1:100	Tampone pH6	1 Ora	16 pos 7 neg 23 tot
Foxp3 (FJK-16s)	Monoclonale	eBioscience	1:200	Tampone pH9	Overnight 4°	29 pos 10 neg 39 tot
TLR-4 (76B357.1)	Monoclonale	Abcam	1:100	Non Necessario (Tessuto Congelato)	1 Ora	14 pos 6 neg 20 tot

Tabella 3: anticorpi utilizzati per l'immunofenotipizzazione cellulare.

RISULTATI

In tutte le partite di animali sono state riscontrate lesioni riconducibili macroscopicamente a *M. hyopneumoniae*; gli score polmonari medi delle partite visionate hanno variato da 0,14 a 1,98 (vedi tabella 4). La percentuale di campioni di polmone per ciascuna partita rilevati positivi alla RT-PCR è variata dallo 0% al 100%; sono risultate negative 2 partite (vedi tabella 4).

Partita	Numero polmoni RT-PCR positivi	Media score polmonare
A	46/46 (100%)	1,98
B	0/11 (0%)	0,16
C	0/14 (0%)	0,18
D	6/7 (85,7%)	0,14
E	16/16 (100%)	0,41
Tot	68/94 (69,4%)	/

Tabella 4: Risultati della ricerca di *M. hyopneumoniae* tramite RT-PCR e media dello score polmonare rilevati nelle diverse partite campionate.

Le lesioni più significative rilevate istologicamente erano caratterizzate da polmonite catarrale broncointerstiziale con aumento di volume peribronchiale, peribronchiolare e perivascolare del tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT) da lieve a notevole. In questo ultimo caso vi era anche lo sviluppo di follicoli linfatici. Nei casi più gravi si osservava la riduzione del lume bronchiale, bronchiolare e alveolare indotta dall'aumento di volume dei BALT. Gli epiteli a ridosso dei noduli abnormemente sviluppati, si presentavano spesso esfoliati in modo più o meno marcato. Le cellule caliciformi bronchiali apparivano talvolta iperplastiche. Vedi figure 5, 6 e 7.

In 10 campioni si osservavano aspetti di flogosi mista, sia interstiziale ma più spesso essudativa. La polmonite interstiziale, che mostrava estensione variabile, da focale a multifocale confluyente a diffusa, era caratterizzata dall'accumulo prevalentemente alveolo-settale, ma anche peribroncovascolare, di macrofagi e linfociti. Non erano infrequenti casi di alveolite macrofagica con numerosi macrofagi essudati nel lume degli alveoli a distribuzione lobulare focale.

La componente essudativa della flogosi polmonare era riconducibile ad una broncopolmonite o, più raramente ad una componente fibrinosa alveolare mista ad essudato di cellule rappresentato da macrofagi e granulociti neutrofili (vedi figura 7).

Nelle partite con campioni risultati positivi alla RT-PCR, sono state rilevate lesioni caratteristiche dell'infezione da *M. hyopneumoniae*, spesso con notevoli infiltrati di neutrofili nel lume alveolare. Le alterazioni più intense sono state rilevate nei campioni RT-PCR positivi.

I Treg più numerosi (vedi figura 15) sono stati riscontrati nei campioni con minor infiammazione a livello polmonare, mentre laddove questa era alta, i Treg sono stati meno frequenti. Le medie delle conte dei Treg sono variate da 0 a 13,5 cellule.

L'utilizzo dell'anti TLR4 su tessuto adiposo ha permesso di distinguere 4 livelli di intensità della colorazione (vedi figura 16). I campioni con la colorazione più

intensa per i TLR4, campione A13 e E6, entrambi positivi alla RT-PCR, hanno mostrato anche un intenso stato infiammatorio a livello polmonare con valutazioni di infiammazione bronco-alveolare più elevata e una minor presenza di Treg a livello dei BALT. Viceversa, 10 campioni con valutazione dei TLR4 pari a 0 e 1, comprendenti 2 RT-PCR positivi, mostravano un grado d'infiammazione alveolo-bronchiale con nessuno o pochi macrofagi e neutrofili e una media della presenza di Treg nei BALT di 3,9 cellule.

Nei campioni con più cellule CD3 positive sono state riscontrate anche molte cellule CD79 α positive.

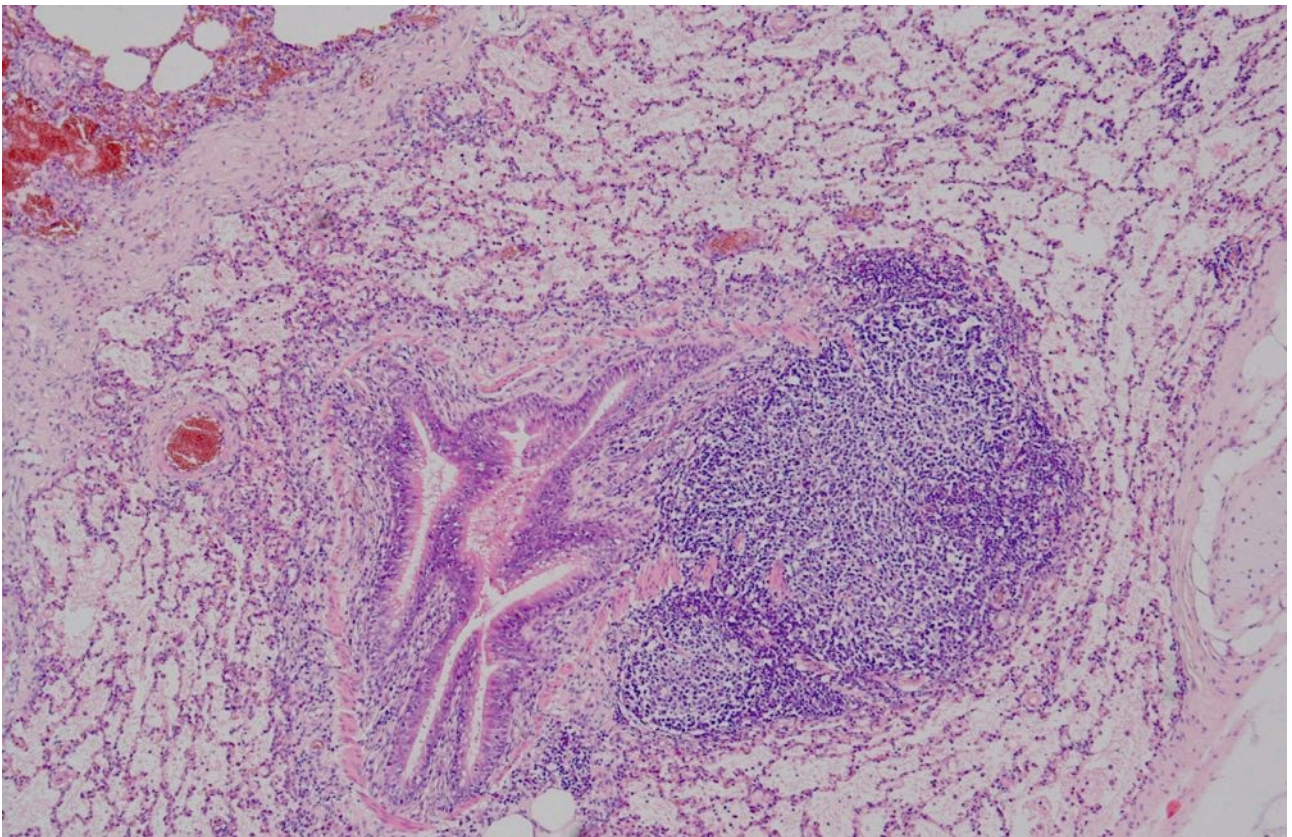


Figura 5: polmone di suino. Si osserva iperplasia del BALT con parziale riduzione del lume bronchiolare. Colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento 4X. Campione A1.

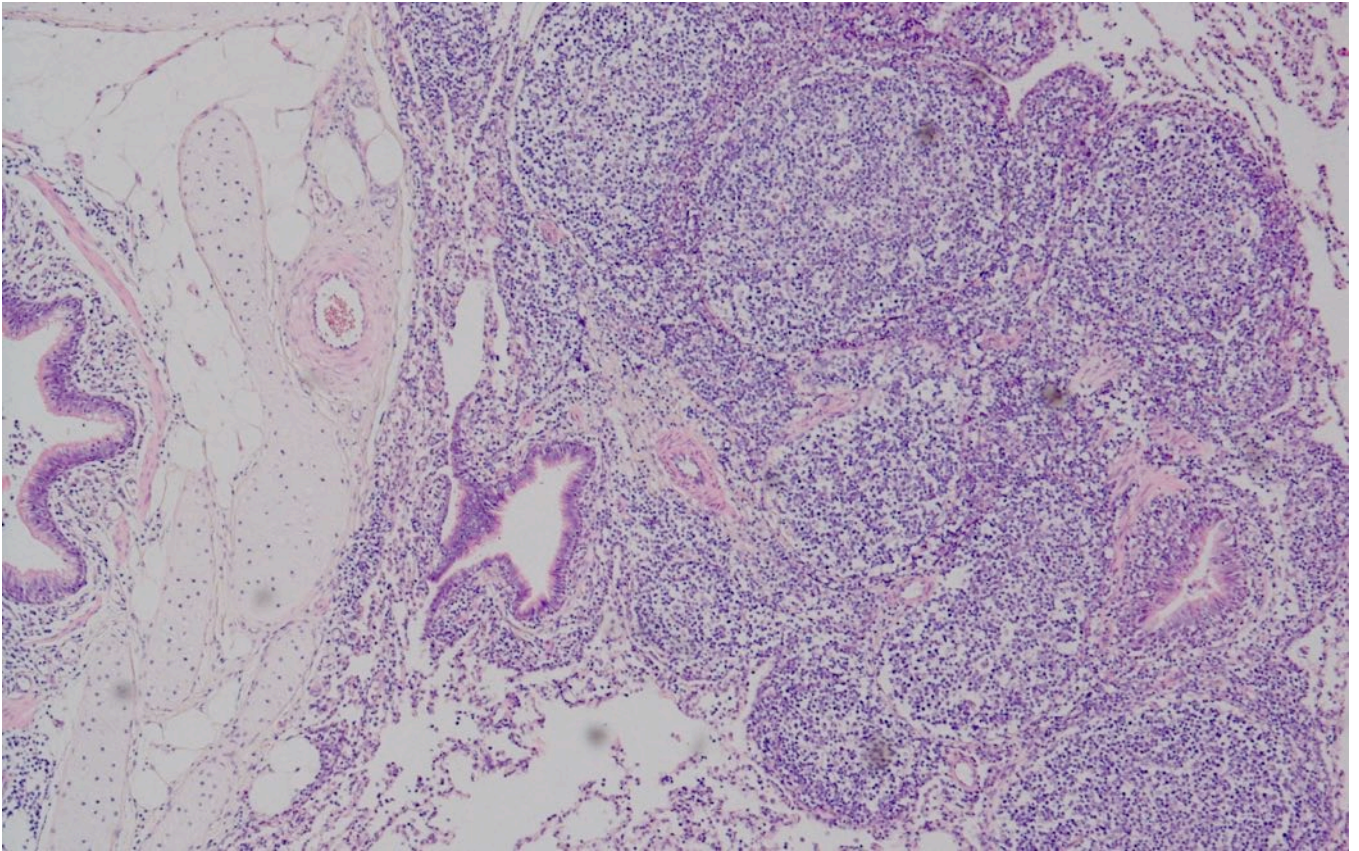


Figura 6: polmone di suino. Si osserva notevole iperplasia dei BALT con invasione del parenchima polmonare. Colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento 4X. Campione D1.

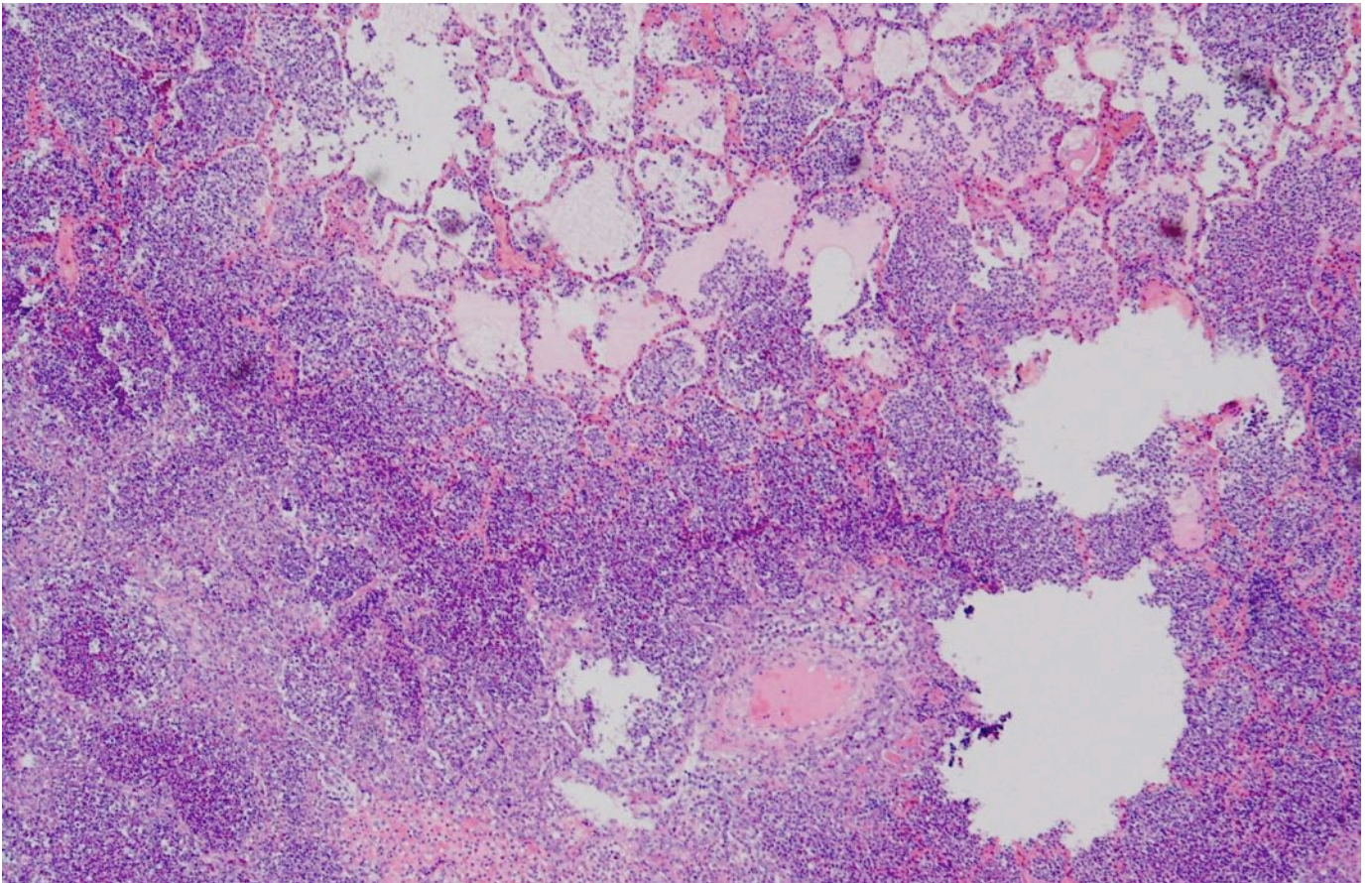


Figura 7: polmone di suino. Si osserva infiltrazione massiva di neutrofili e macrofagi dei setti alveolari con invasione del lume alveolare. Depositi di fibrina nel lume alveolare. Colorazione ematossilina-eosina 4X. Campione A12.

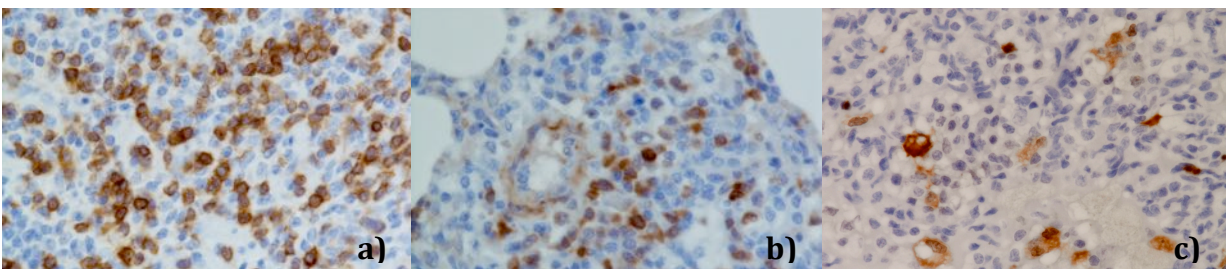


Figura 8: polmoni di suino. Colorazioni con anticorpi antiCD3 a), antiCD79 α b) e antiMAC387 c). Morfologia cellulare. a) linfociti T; b) linfociti B; c) macrofagi.

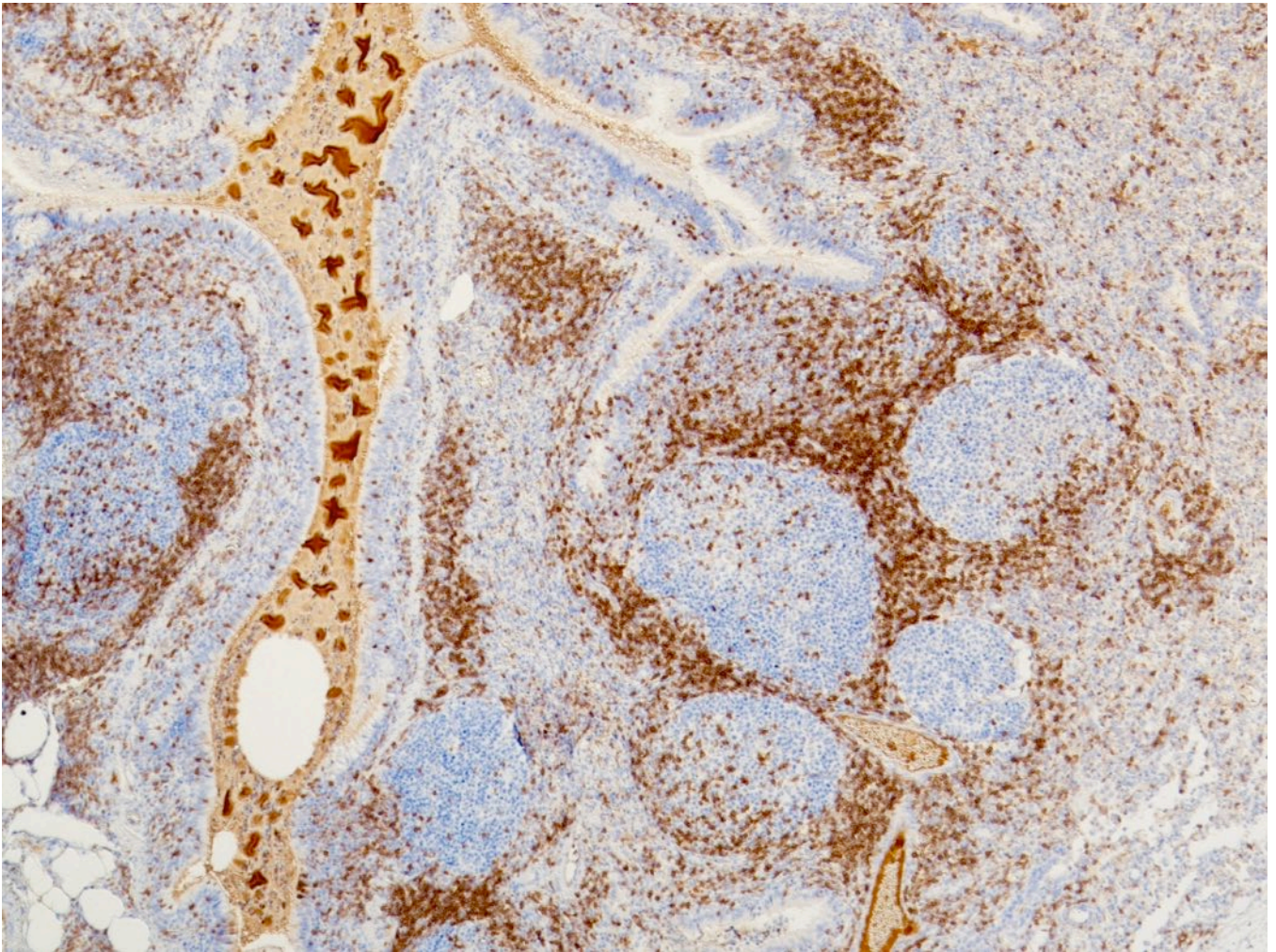


Figura 9: polmone di suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo anti CD3. Iperplasia dei BALT. Si osservano numerosi linfociti T nella zona mantellare dei centri germinativi. Rari linfociti T si trovano nella zona centrale dei centri germinativi. Ingrandimento 40X. Campione D6.

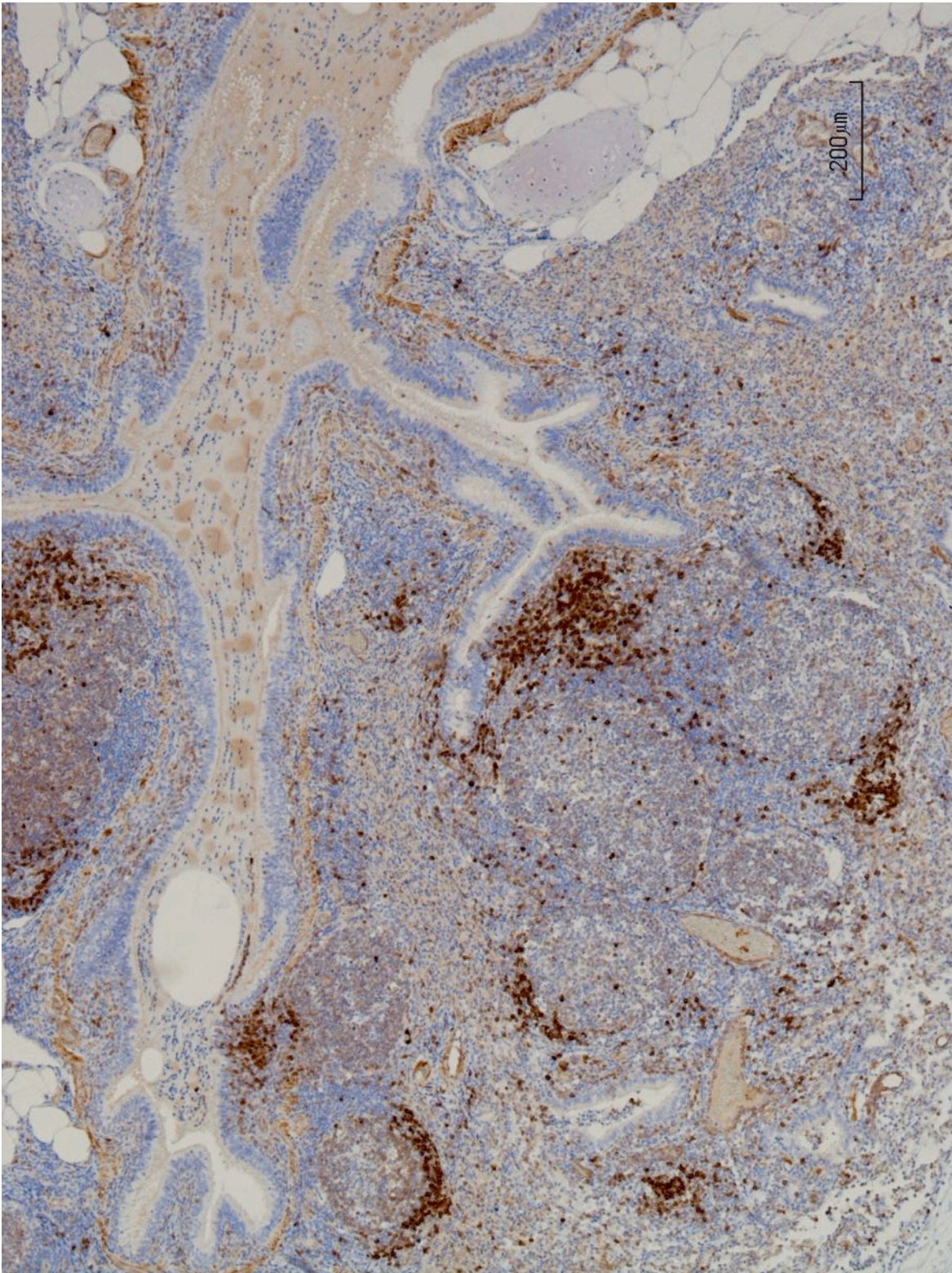


Figura 10: polmone di suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo anti CD79 α . Si osservano numerosi linfociti B a livello di mantello e, talvolta, nel centro germinativo. Ingrandimento 4X. Campione D6.

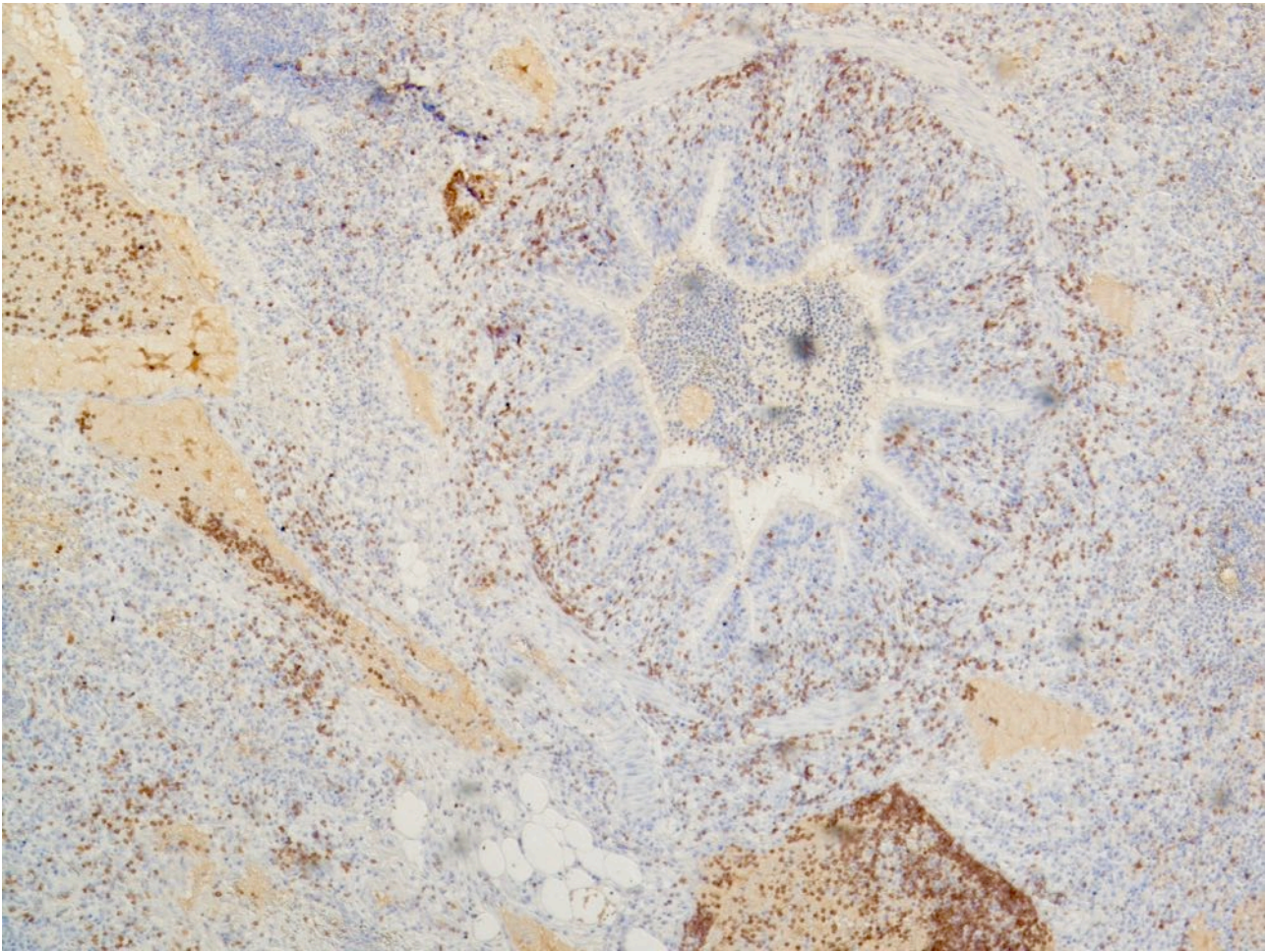


Figura 11: polmone di suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo anti CD3. Nella sottomucosa bronchiale si osservano numerosi linfociti T infiltranti. Anche a livello di pareti alveolari si nota infiltrazione di linfociti T. Ingrandimento 4X. Campione D1

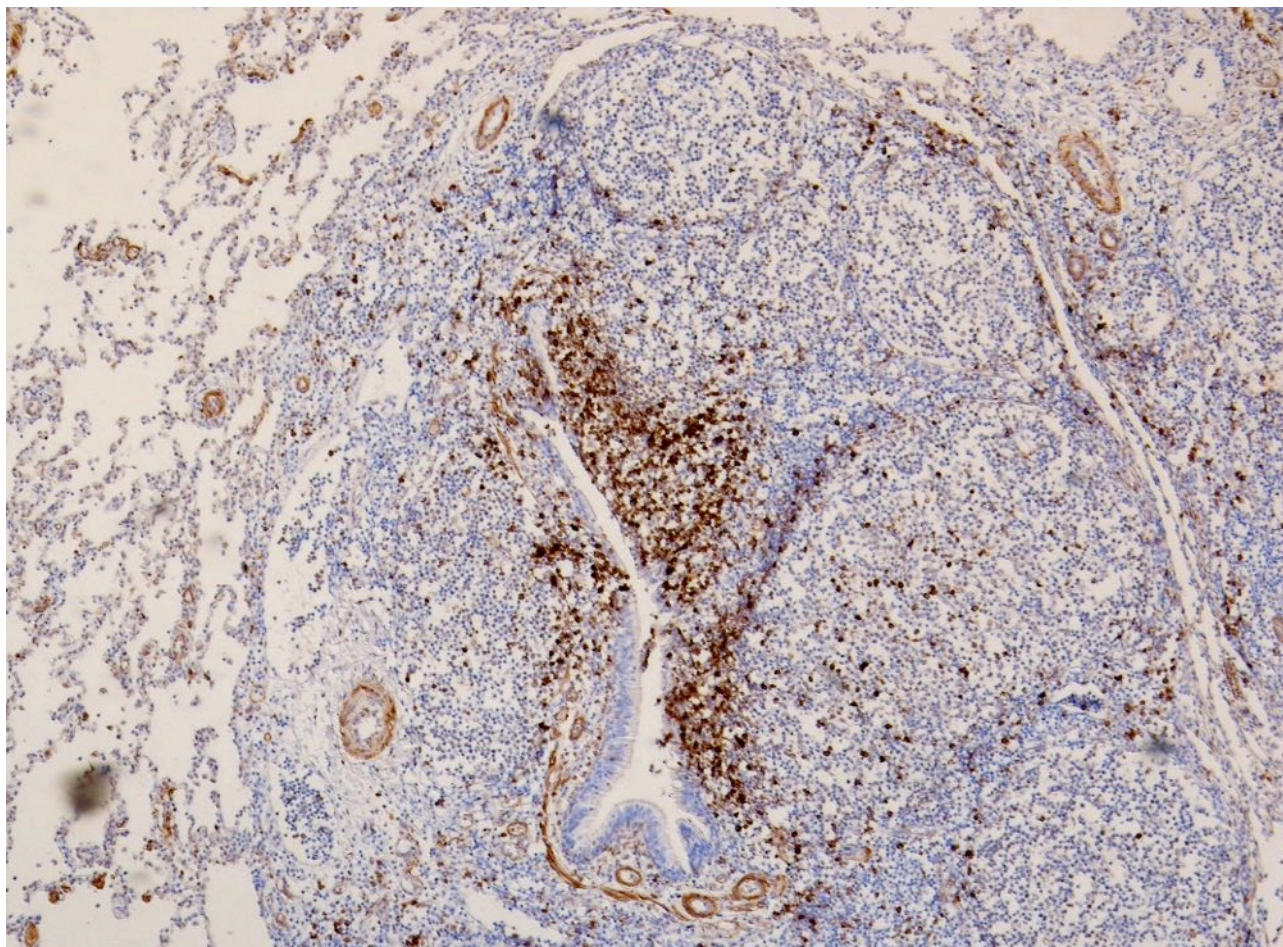


Figura 12: polmone di suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo antiCD79 α . Ingrandimento 4X. Campione D1.

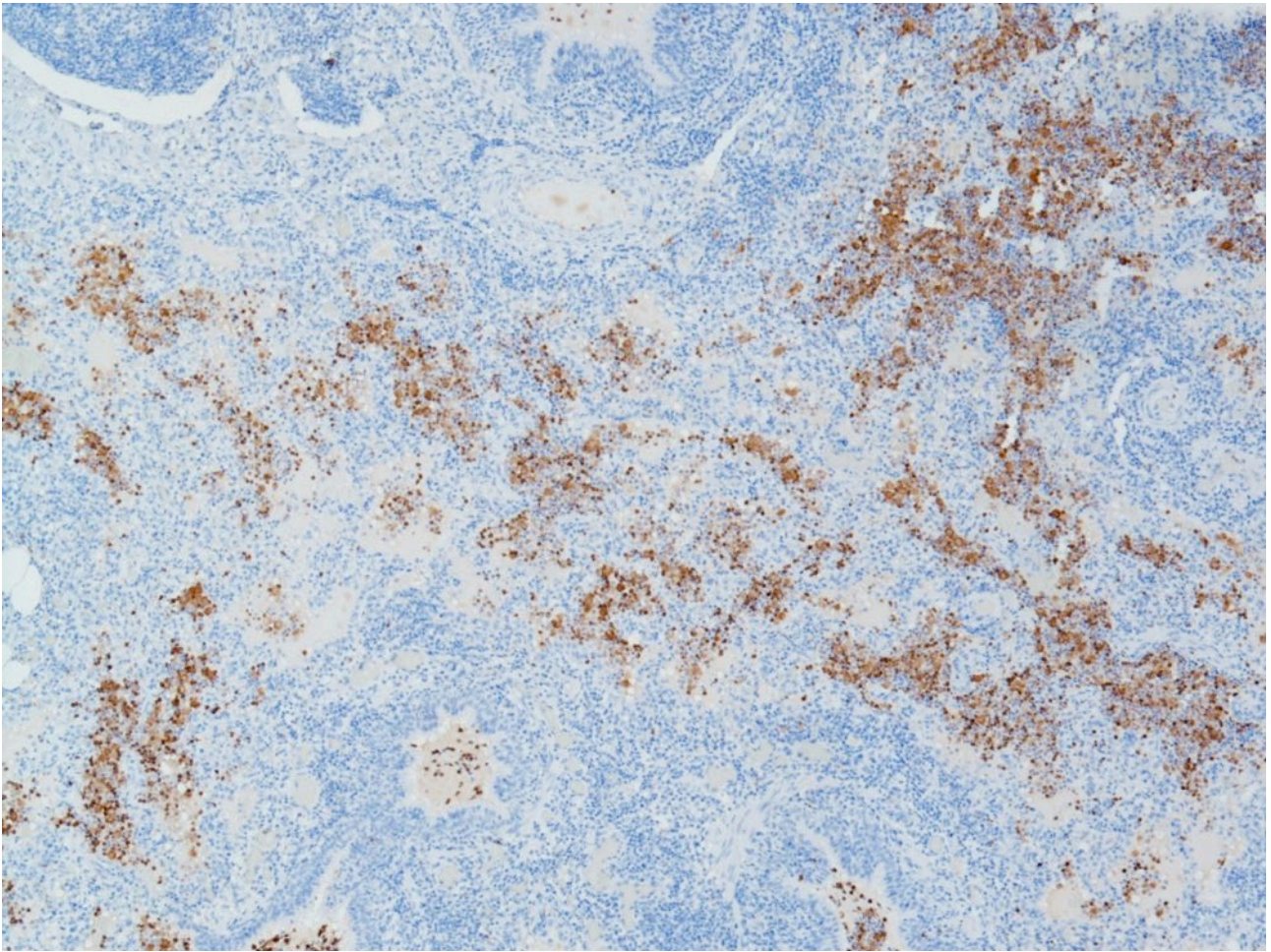


Figura 13: polmone suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo MAC387. Bronchioli con infiltrazione di macrofagi nel lume ed intensa infiltrazione di macrofagi negli alveoli. Ingrandimento 4X. Campione A5.

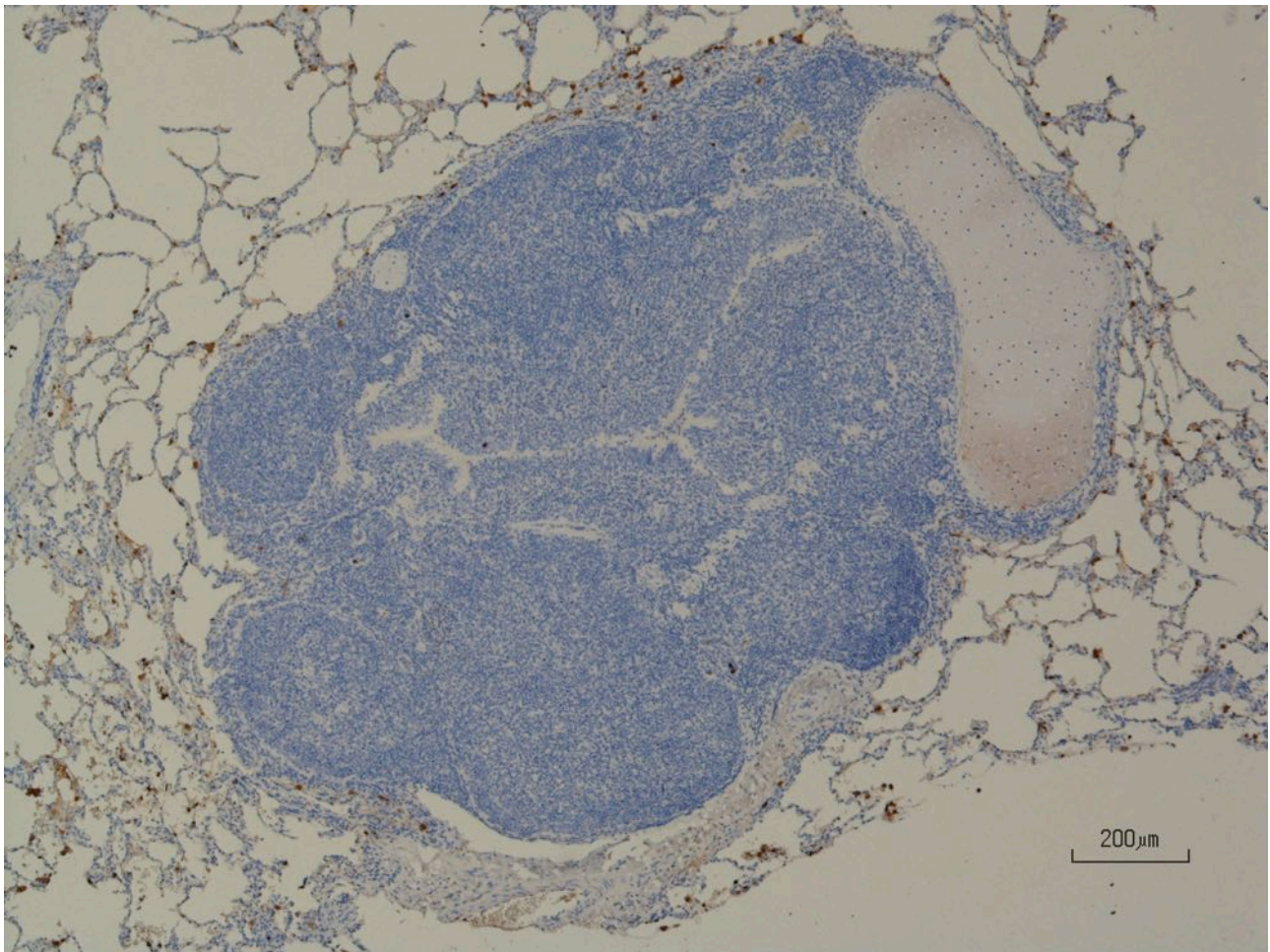


Figura 14: polmone di suino. Si osserva iperplasia del BALT con scarsa presenza di cellule macrofagiche immunocolorate con anti MAC387. Le cellule macrofagiche sono localizzate ai margini del tessuto linfoide. Campione D5. Ingrandimento 4X.

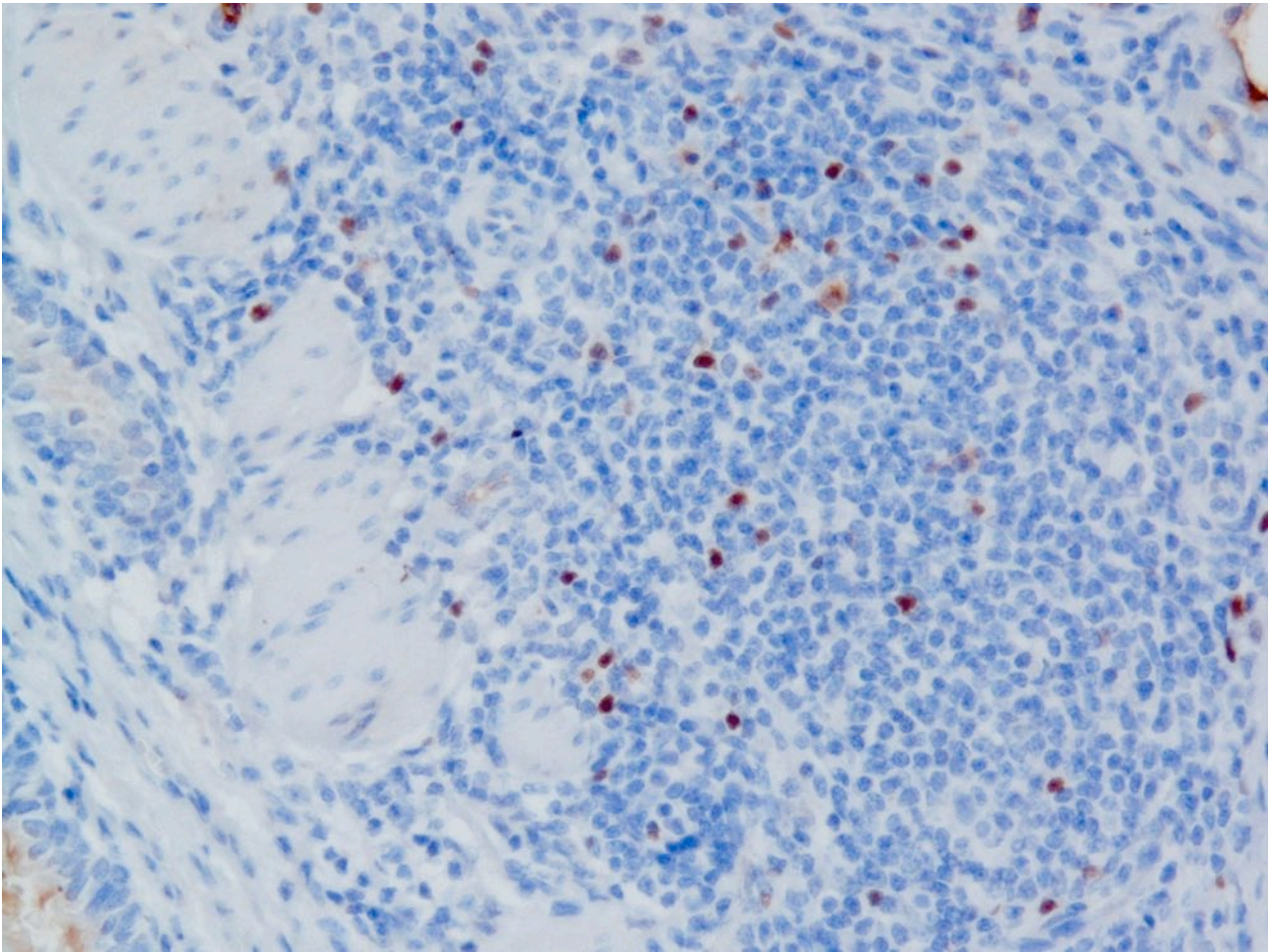


Figura 15: polmone di suino. Immunofenotipizzazione con anticorpo Foxp3. BALT con numerosi Treg colorati positivamente. Campione B3. Ingrandimento 10X.

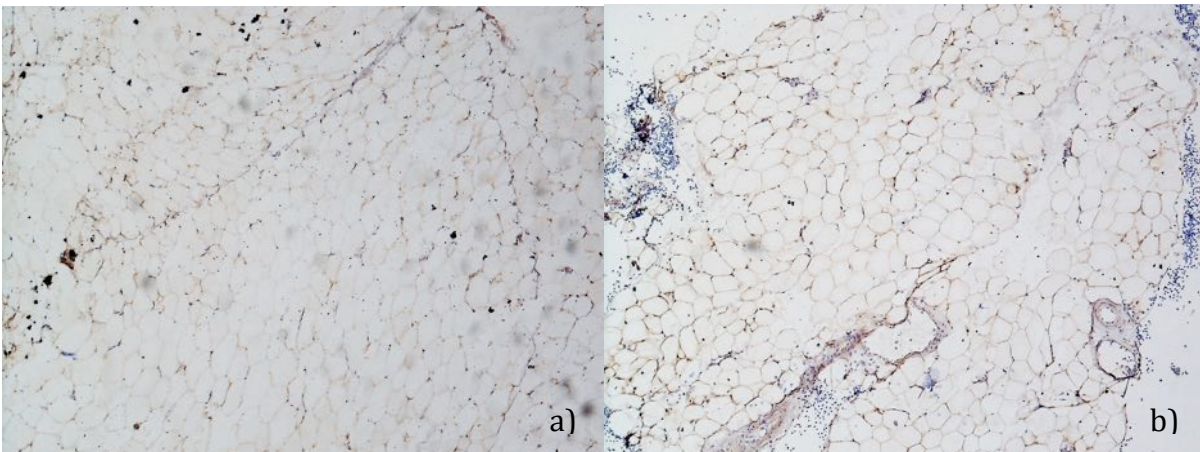


Figura 16: tessuto adiposo suino. Immunofenotipizzazione con anticorpi anti TLR4. L'antigene rilevato dagli anticorpi definisce i margini delle cellule adipose. Ingrandimento 4X. a) campione D1; b) campione E6.

Campione	RT-PCR	TLR4	BALT	Epit.	Neutr.	Treg	CD3	MAC	CD79 α	Score
A1	+	n.d.	1	1	0	1,25	1	1	2	1
A2	+	n.d.	2	0	0	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	1
A3	+	1	1	0	2	4	3	3	1	1
A4	+	n.d.	2	2	3	2,5	n.d.	n.d.	n.d.	1
A5	+	1	3	2	3	2	2	2	3	2
A6	+	n.d.	2	2	2	5,5	3	3	2	3
A7	+	n.d.	0	0	0	5,75	n.d.	n.d.	n.d.	4
A8	+	n.d.	2	2	3	0	2	3	3	7
A9	+	n.d.	1	2	3	0	n.d.	n.d.	n.d.	5
A10	+	n.d.	3	3	1	5,7	3	2	3	8
A11	+	n.d.	2	3	3	n.d.	1	4	1	2
A12	+	2	1	3	3	0	1	4	1	2
A13	+	3	2	3	3	0	n.d.	n.d.	n.d.	8
B1	-	2	0	0	0	3	2	1	1	1
B2	-	n.d.	0	0	0	3,75	n.d.	n.d.	n.d.	1
B3	-	n.d.	0	0	0	13,5	n.d.	n.d.	n.d.	1
B4	-	n.d.	0	0	0	6	n.d.	n.d.	n.d.	1
B5	-	3.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
B6	-	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
C1	-	n.d.	0	0	0	2,3	1	1	1	2
C2	-	n.d.	0	0	0	6,7	n.d.	n.d.	n.d.	1
C3	-	1	0	0	0	7,3	n.d.	n.d.	n.d.	1
C4	-	1	1	0	0	0,7	1	1	1	1
C5	-	n.d.	0	0	0	4	1	1	1	1
C6	-	n.d.	1	0	0	4	n.d.	n.d.	n.d.	1
C7	-	n.d.	2	1	0	5	n.d.	n.d.	n.d.	1
C8	-	2	0	0	0	n.d.	1	1	1	1
C9	-	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
C10	-	2	0	0	0	n.d.	1	1	1	1
D1	+	0	3	2	0	n.d.	4	1	4	3
D2	+	n.d.	2	1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
D3	+	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
D4	+	2	0	0	1	4	n.d.	n.d.	n.d.	2
D5	+	1	3	2	1	0,2	4	1	4	2
D6	+	n.d.	3	2	2	0,3	4	1	2	3
D7	-	n.d.	2	0	0	1,3	3	1	1	4
E1	+	1	0	0	0	7,3	n.d.	n.d.	n.d.	3
E2	+	n.d.	1	2	2	1,7	1	3	1	4
E3	+	1	2	1	0	4,7	n.d.	n.d.	n.d.	1
E4	+	n.d.	2	0	0	11,5	2	2	1	2
E5	+	2	1	1	2	3	n.d.	n.d.	n.d.	1
E6	+	3	1	3	3	0	n.d.	n.d.	n.d.	3
E7	+	n.d.	2	2	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
E8	+	n.d.	0	0	0	2	3	3	2	7
E9	+	n.d.	3	3	3	5,5	n.d.	n.d.	n.d.	2
E10	+	n.d.	2	3	0	1	n.d.	n.d.	n.d.	5
E11	+	1	1	2	2	4,5	1	3	1	3
E12	+	n.d.	1	1	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
E13	+	n.d.	2	2	2	0,7	3	1	3	3

Tabella 5: risultati della valutazione istologica e immunoistochimica. PCR: "+" positivo alla RT-PCR, "-" negativo; TLR4: risultato della valutazione del TLR4 nei campioni di tessuto adiposo; BALT: valutazione dell'attivazione del BALT; Epit.: valutazione della disepitelizzazione dell'epitelio bronchiale; Neutr.: valutazione della presenza d'inflammation bronco-polmonare acuta attraverso la valutazione degli aggregati neutrofilici-macrofagici nei lumi bronchiali ed alveolari; Treg: media delle 4 conte delle cellule colorate dall'anticorpo in 4 differenti BALT; CD3: valutazione della presenza di cellule colorate dall'anticorpo (linfociti T); MAC: valutazione della presenza di cellule colorate dall'anticorpo (macrofagi); CD79 α : valutazione della presenza di cellule colorate dall'anticorpo (linfociti B). Score: score polmonare.

CONCLUSIONI

I rilievi al macello hanno confermato che l'infezione da *M. hyopneumoniae* è diffusa nel sistema dall'allevamento suinicolo italiano e che la vaccinazione non previene l'infezione, ma è utile a diminuirne la patogenicità, come rilevato dai bassi punteggi allo score polmonare delle partite esaminate. I campioni negativi, benché tutti presentassero lesioni macroscopiche, compatibili con infiammazione broncopolmonare dei lobi apicali, possono essere risultati tali in quanto le lesioni non sono patognomoniche dell'infezione da *M. hyopneumoniae* e soprattutto perché questo patogeno, abbassando le difese immunitarie locali, favorisce l'insorgenza di infezioni secondarie, prima di essere eliminato dalla risposta dell'ospite.

Il quadro istologico rilevato è sovrapponibile a quello precedentemente descritto da altri autori nei quadri d'infezione da *M. hyopneumoniae* (Kwon *et al.*, 2002; Sarradell *et al.*, 2003; Opriessnig *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2006) caratterizzato da iperplasia linfocitaria peribronchiolare e perivascolare, macrofagi e neutrofili nel lume delle vie aeree. L'infiltrazione macrofagica e neutrofilica del lume e del setto alveolare evidenziata in diversi campioni è rappresentativa di uno stato infiammatorio avanzato, riconducibile sia all'infezione pura da *M. hyopneumoniae* (Sarradell *et al.*, 2003) sia alla presenza di germi d'irruzione secondaria. Queste lesioni sono riconducibili all'accumulo di muco e di essudato infiammatorio nel lume bronchiale dovuto alla diminuzione dell'attività ciliare, alla broncocostrizione da mediatori chimici rilasciati dai macrofagi alveolari e alla presenza di aggregati linfatici.

La presenza di macrofagi nel lume di bronchi e bronchioli, e nei setti alveolari da 14 a 28 giorni dopo l'infezione da *M. hyopneumoniae* è stata documentata da Redondo e coll. (2009) confermando che queste cellule hanno un ruolo importante nello sviluppo della risposta infiammatoria. Oltre che nel lume alveolare in corso di un'intensa risposta immunitaria, nel nostro studio, numerosi macrofagi sono stati evidenziati nelle zone marginali di BALT reattivi ed iperplastici. Quest'attivazione dei BALT può essere dovuta agli stessi macrofagi che, stimolati dalla presenza di antigeni batterici, producono citochine pro-infiammatorie (Thanawongnuwech *et al.*, 2003). Nei quadri istologici in cui vi era una forte componente infiammatoria subacuta caratterizzata dalla massiva presenza di neutrofili e macrofagi, le altre componenti del sistema immunitario, linfociti B, linfociti T e Treg, si sono mostrate poco rappresentate. Nel contempo anche la reazione dei BALT si mostrava blanda con tessuti linfoidi

poco o per nulla reattivi. Assieme alla componente macrofagica si osservava una componente neutrofilica che l'accompagnava nella risposta immunitaria. Questo è determinato dal fatto che a livello polmonare, oltre alla popolazione macrofagica stabile, è presente, a ridosso dell'endotelio, una popolazione di monociti con funzioni di controllo (Auffray *et al.*, 2007), essenziale per un intervento rapido nel tessuto infiammato e la formazione di macrofagi tissutali. Nel polmone in particolare, è stato riportato un interessante legame tra monociti e neutrofili: utilizzando tecniche d'*imaging in vivo*, è stato osservato che la deplezione di monociti del sangue danneggia il reclutamento di neutrofili tramite migrazione transendoteliale nel polmone, dimostrando così che il reclutamento di neutrofili durante l'infiammazione polmonare è dipendente dai monociti (Kreisel *et al.*, 2010).

Analogamente a quanto rilevato nel tessuto adiposo umano (Bès-Houtmann *et al.*, 2007), è stata confermata la presenza di TLR4 nel tessuto adiposo mediastinico del suino. L'aumento dell'espressione dei TLR4 nei tessuti con infiammazione in atto è stato rilevato nel tessuto mammario in corso di mastiti batteriche nel bovino (Goldammer *et al.*, 2004). Nell'uomo, diverse citochine inducono l'aumento dell'espressione dei TLR4 anche in tessuti non direttamente coinvolti da processi infiammatori. Ricerche hanno confermato l'aumento dell'espressione dei TLR in diverse cellule del sistema immunitario causato da diverse citochine (Yang *et al.*, 2009; Derkow *et al.*, 2013). L'analisi semiquantitativa della presenza dei TLR4 nel tessuto adiposo mediastinico, svolta in questa ricerca, tende a confermare questi dati rilevando valori più alti in quei soggetti che mostravano un'infiammazione più intensa o più diffusa a livello polmonare; ulteriori studi sono comunque necessari per confermare questa ipotesi.

I linfociti T sono stati rilevati soprattutto in quadri istologici con moderata o forte iperplasia dei BALT, con scarsa infiltrazione macrofagica o neutrofilica a livello degli alveoli. Sia nei quadri con modico interessamento dei BALT, sia in quelli con forte interessamento, i linfociti T si mostravano diffusi nelle diverse strutture polmonari, sottomucosa bronchiolare compresa.

I linfociti B presenti soprattutto nei centri germinativi e a livello del mantello dei BALT e in vicinanza dei bronchi e dei bronchioli, si sono rivelate scarsamente presenti nelle forme con complicazioni batteriche e maggiormente evidenziabili nelle forme più pure.

I linfociti Treg, Foxp3+, hanno, nel suino come nell'uomo, proprietà immunosoppressive (Kaser *et al.*, 2008) e quest'attività può essere indotta da

patogeni, come il PRRSV (Silva-Campa *et al.*, 2009). Il riscontro di una maggior presenza di Treg nei BALT dei campioni istologici che mostravano un quadro di scarsa o nulla attivazione dei fenomeni immunitari, suggerisce un ruolo attivo di queste cellule per mantenere un basso livello di attivazione del sistema immunitario a livello locale. Viceversa nei quadri istologici con maggior attivazione del sistema immunitario, si sono rilevati pochi o rari Treg nei BALT. Le tecniche istologiche ed immunoistologiche utilizzate, ci hanno permesso di inquadrare la risposta immunitaria del suino alle infezioni polmonari con partecipazione di MH, rilevando la complessità dell'intervento delle diverse cellule del sistema immunitario.

Abbreviazioni

BALT tessuto linfoide associato ai bronchi

LPS lipopolisaccaride

CTL linfociti T citotossici

MH *Mycoplasma hyopneumoniae*

MMTV virus murino del tumore mammario

RSV virus respiratorio sinciziale

TRL toll-like receptor

RT-PCR real time polymerase chain reaction

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732–738.
- 2) Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007 Aug 3;317(5838):666-70.
- 3) Alvarez B, de la Riva PM, Handler A, Revilla C, Alonso F, Ezquerra A, Domínguez J. Expression of TLR4 in swine as assessed by a newly developed monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013 May 15;153(1-2):134-9.
- 4) Alvarez B, Revilla C, Doménech N, Pérez C, Martínez P, Alonso F, Ezquerra A, Domínguez J. Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues. *Vet Res*. 2008 Mar-Apr;39(2):13.
- 5) Alvarez B, Revilla C, Chamorro S, Lopez-Fraga M, Alonso F, Dominguez J, et al. Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine toll-like receptor 4. *Dev Comp Immunol* (2006) 30:345–55.
- 6) Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* (2012) 24:310–5.
- 7) Amass, S. F., Clark, L. K., Van Alstine, W. G., Bowersock, T. L., Murphy, D. A., Knox, K. E. and Albregts, S. R. (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 204, 102-107
- 8) Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9247–9252.
- 9) Andrada M, Quesada-Canales O, Suárez-Bonnet A, Paz-Sánchez Y, Espinosa de Los Monteros A, Rodríguez F. Cyclooxygenase-2 expression in pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol*. 2014 Aug-Oct;151(2-3):271-6.
- 10) Asai, T., M. Okada, M. Ono, T. Irisawa, Y. Mori, Y. Yokomizo, S. Sato. (1993) Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 38, 253-260.
- 11) Asai, T., M. Okada, M. Ono, Y. Mori, Y. Yokomizo & S. Sato: Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pig experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 97-102 (1994).
- 12) Bès-Houtmann S, Roche R, Hoareau L, Gonthier MP, Festy F, Caillens H, Gasque P, Lefebvre d'Hellencourt C, Cesari M. Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol*. 2007 Feb;127(2):131-7.
- 13) Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* 76:8729–8736.
- 14) Broere F, S.G. Apasov, M.V. Sitkovsky, W. van Eden. T cell subsets and T cell-mediated immunity in F.P. Nijkamp and M.J. Parnham, 2011 *Principles of Immunopharmacology*: 3rd revised and extended edition.
- 15) Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013 Aug;13(8):551-65.
- 16) Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods* 31 oct 2014. Springer Editore.
- 17) Burkey TE, Skjolaas KA, Dritz SS, Minton JE. Expression of toll-like receptors,

- interleukin 8, macrophage migration inhibitory factor, and osteopontin in tissues from pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar typhimurium or serovar choleraesuis. *Vet Immunol Immunopathol* (2007) 115:309–19.
- 18) Caruso, J.P. & R.F. Ross: Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection on alveolar macrophage function in swine. *Am J Vet Res* 51, 227–231 (1990).
 - 19) Chaung, H.C., Chen, C.W., Hsieh, B.L., Chung, W.B., 2010. Toll-like receptor expressions in porcine alveolar macrophages and dendritic cells in responding to poly IC stimulation and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 197–203.
 - 20) Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ Res* (2009) 104:1355–63.
 - 21) Choi, C., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Lee, Y. H., Kim, O. et al. (2006). Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 40–46.
 - 22) Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77:4588–4596.
 - 23) Borjigin L, Shimazu T, Katayama Y, Li M, Satoh T, Watanabe K, Kitazawa H, Roh SG, Aso H, Katoh K, Uchida T, Suda Y, Sakuma A, Nakajo M, Suzuki K. Immunogenic properties of Landrace pigs selected for resistance to mycoplasma pneumonia of swine. *Anim Sci J.* 2016 Mar;87(3):321–9.
 - 24) Dennis V.A., S. Dixit, S.M. O'Brien, X. Alvarez, B. Pahar, M.T. Philipp, Live *Borrelia burgdorferi* spirochetes elicit inflammatory mediators from human monocytes via the Toll-like receptor signaling pathway, *Infect. Immun.* 77 (2009) 1238–1245.
 - 25) Derkow K, Bauer JM, Hecker M, Paap BK, Thamilarasan M, Koczan D, Schott E, Deuschle K, Bellmann-Strobl J, Paul F, Zettl UK, Ruprecht K, Lehnardt S. Multiple sclerosis: modulation of toll-like receptor (TLR) expression by interferon- β includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One.* 2013 Aug 12;8(8):e70626.
 - 26) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis E, Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529–1531.
 - 27) Djordjevic, S.P., G.J. Eamens, L.F. Romalis, P.J. Nicholls, V. Taylor & J. Chin: Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust Vet J* 75, 504–511 (1997).
 - 28) Escobar J, Van Alstine WG, Baker DH, Johnson RW. Growth performance and whole-body composition of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Anim Sci.* 2002 Feb;80(2):384–91.
 - 29) Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *J Biol Chem* (2007) 282:20221–9.
 - 30) Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* (2004) 6:1361–7.
 - 31) Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882–1885.
 - 32) Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H.J., Brunner, R.M., Kata, S.R., Seyfert,

- H.M., 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, Toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 174–185.
- 33)Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, Jayawardana ST, et al. The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* (2007) 82:657–65.
 - 34)Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
 - 35)Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* (2001) 75:10730–7.
 - 36)Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526–1529.
 - 37)Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
 - 38)Ireton GC, Reed SG. Adjuvants containing natural and synthetic toll-like receptor 4 ligands. *Expert Rev Vaccines* (2013) 12:793–807.
 - 39)Ishii M, Hashimoto M, Oguma K, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2). *Vet Immunol Immunopathol.* 2006 Mar 15;110(1-2):87-95.
 - 40)LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1570-80.
 - 41)Lizundia R, Sauter KS, Taylor G, Werling D. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate Immun* (2008) 14:223–31.
 - 42)Lorenzo H, Quesada O, Assunção P, Castro A, Rodríguez F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006 Feb 15;109(3-4):199-207.
 - 43)Janssens S, Beyaert R. Role of toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* (2003) 16:637–46.
 - 44)Johnson DA. TLR4 agonists as vaccine adjuvants: a chemist's perspective. *Expert Rev Vaccines* (2013) 12:711–3.
 - 45)Ju XH, Xu HJ, Yong YH, An LL, Jiao PR, Liao M. Heat stress upregulation of Toll-like receptors 2/4 and acute inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of Bama miniature pigs: an in vivo and in vitro study. *Animal.* 2014 Sep;8(9):1462-8.
 - 46)Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* (2007) 13:552–9.
 - 47)Kaser T, Gerner W, Hammer SE, Patzl M, Saalmüller A. Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;122:153–158.
 - 48)Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, et al. Expression and function of toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol* (2008) 125:18–30.
 - 49)Kim Y.M., M.M. Brinkmann, M.E. Paquet, H.L. Ploegh, UNC93B1 delivers nucleotide-sensing Toll-like receptors to endolysosomes, *Nature* 452 (2008): 234–238.
 - 50)Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, Wang Y, et al. Extracellular heat shock protein

- 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res* (2009) 105:1186–95.
- 51) Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* (2007) 100:1589–96.
 - 52) Kishima, M. & R.F. Ross: Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* on phytohemagglutinin-induced transformation of swine lymphocytes. *Am J Vet Res* 46, 2366–2368 (1985).
 - 53) Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 19;107(42):18073–8.
 - 54) Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621–5.
 - 55) Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1315–1320.
 - 56) Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* (2000) 1:398–401.
 - 57) Kuzemtseva L, Pérez M, Mateu E, Segalés J, Darwich L. Expression of Toll-like receptor 9 (TLR9) in the lungs and lymphoid tissue of pigs. *Vet J*. 2015 Feb;203(2):259–61.
 - 58) Kwon D, Chae C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet Pathol*. 1999 Jul;36(4):308–13.
 - 59) Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spa'tzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973.
 - 60) Liu, C.H., Chaung, H.C., Chang, H.L., Peng, Y.T., Chung, W.B., 2009. Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 266–275.
 - 61) Lorenzo, H., Quesada, O., Assuncao, P., Castro, A. and Rodríguez, F. (2006). Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109, 199–207.
 - 62) Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 198(3):513–520.
 - 63) Madec F, Kobish M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées de la Recherche Porcine* 1982, 14: 405–412.
 - 64) Mancuso G., M. Gambuzza, A. Midiri, C. Biondo, S. Papasergi, S. Akira, G. Teti, C. Beninati, Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 587–594.
 - 65) Marè CJ, Switzer WP. Virus pneumonia of pigs: propagation and characterization of a causative agent. *Am J Vet Res* 1966; 27: 1687–1693.
 - 66) Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *J Appl Microbiol*. 2010 May;108(5):1523–33.
 - 67) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394–397.

- 68) Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* (1997) 91:295–8.
- 69) Meyer J, McShane H. The next 10 years for tuberculosis vaccines: do we have the right plans in place? *Expert Rev Vaccines* (2013) 12:443–51.
- 70) Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3:36–46.
- 71) Miguel JC, Chen J, Van Alstine WG, Johnson RW. Expression of inflammatory cytokines and toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* (2010) 135:314–9.
- 72) Morrison, D. F., Foss, D. L. and Murtaugh, M. P. (2000). Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infection and Immunity*, 68, 4752e 4758.
- 73) Muneta Y, Uenishi H, Kikuma R, Yoshihara K, Shimoji Y, Yamamoto R, Hamashima N, Yokomizo Y, Mori Y. Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Oct;23(10):583-90.
- 74) Murawski M.R., G.N. Bowen, A.M. Cerny, L.J. Anderson, L.M. Haynes, R.A. Tripp, E.A. Kurt-Jones, R.W. Finberg, Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2, *J. Virol.* 83 (2009) 1492–1500.
- 75) Murtaugh M.P. Advances in swine immunology help move vaccine technology forward. *Veterinary immunology and immunopathology* 2014; 159: 202-207.
- 76) Noerregaard E., C.-J. Ehlorsson, A.-K. Lieber. The economic impact of an outbreak of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Book of Abstracts of 24th International Pig Veterinary Society Congress June 7th - 10th 2016 Dublin, Ireland.
- 77) Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* (2000) 164:558–61.
- 78) Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem* (2001) 276:10229–33.
- 79) Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG, Joosten LA. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 21;111(42):E4478-84.
- 80) Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J. and Halbur, P. G. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, 41, 624-640.
- 81) Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* (2009) 458:1191–5.
- 82) Poli G. e Rocchi M., Sistemi difensivi acquisiti e specifici struttura e funzione del sistema immunitario in Poli G. et al. *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*, seconda ed. 2005, UTET.
- 83) Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* (1998) 282: 2085–8.
- 84) Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J Exp Med* (1999) 189: 615–25.
- 85) Raymond CR, Wilkie BN. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by

- porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Vet Immunol Immunopathol* (2005) 107: 235–47.
- 86) Reardon S. New life for pig organ. *Nature* 2015; 257: 152-154.
 - 87) Redondo E, Masot AJ, Fernández A, Gázquez A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Pathol*. 2009 May;140(4):260-70.
 - 88) Rehli M. Of mice and men: species variations of toll-like receptor expression. *Trends Immunol* (2002) 23:375–8.
 - 89) Régia Silva Sousa K, Mauric Frossard Ribeiro A, Roberto Nunes Goes P, Eliza Facioni Guimarães S, Lopes PS, Veroneze R, Gasparino E. Toll-Like Receptor 6 differential expression in two pig genetic groups vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *BMC Proc*. 2011 Jun 3;5 Suppl 4:S9.
 - 90) Rocchi J, Ricci V, Albani M, Lanini L, Andreoli E, Macera L, Pistello M, Ceccherini
 - 91) Nelli L, Bendinelli M, Maggi F. Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9. *Virology*. 2009; 394(2):235–242.
 - 92) Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* (2006) 176:7021–7.
 - 93) Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607-12.
 - 94) Sacco RE, Nicholson TL, Waters TE, Brockmeier SL. Porcine TLR3 characterization and expression in response to influenza virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011 Jul 15;142(1-2):57-63.
 - 95) Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Chaplin P, Suter M, O'Keefe M, Hochrein H. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on tlr9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest*. 2008; 118(5):1776–1784.
 - 96) Sang, Y., Ross, C.R., Rowland, R.R., Blecha, F., 2008a. Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection. *Viral Immunol*. 21, 303–313.
 - 97) Sarradell J, Andrada M, Ramírez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herráez P, Rodríguez F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol*. 2003 Jul;40(4):395-404.
 - 98) Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, et al. Conservation and divergence in toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:E944–53.
 - 99) Shimosato T, Tohno M, Kitazawa H, Katoh S, Watanabe K, Kawai Y, Aso H, Yamaguchi T, Saito T. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol Lett*. 2005 Apr 15;98(1):83-9.
 - 100) Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Resendiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, et al. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* (2009) 387:373–9.
 - 101) Sorensen NS, Skovgaard K, Heegaard PM. Porcine blood mononuclear cell cytokine responses to PAMP molecules: comparison of mRNA and protein production. *Vet Immunol Immunopathol* (2011) 139:296–302.

- 102) Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3516–3521.
- 103) Thacker, E.L., B.J. Thacker, T.B. Boettcher & H. Jayappa: Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health Prod* 6, 107-112 (1998).
- 104) Thacker, E.L., P.G. Halbur, R.F. Ross, R. Thanawongnuwech & B.J. Thacker: *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37, 620-627 (1999).
- 105) Thacker, E. L., Thacker, B. J. and Janke, B. H. (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2525-2530.
- 106) Thacker, E.L., B.J. Thacker, M. Kuhn, P.A. Hawkins & W.R. Waters: Mucosal and systemic characteristics of protective activity of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. *Am J Vet Res* 61, 1384-1389 (2000).
- 107) Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F. and Halbur, P. G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine*, 18, 1244-1252.
- 108) Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P. and Thacker, E. L. (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*, 11, 901-908.
- 109) Thanawongnuwech, R. and Thacker, E. L. (2003). Interleukin-10, interleukin-12 and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunology*, 16, 357-367.
- 110) Thomas AV, Broers AD, Vandegaart HF, Desmecht DJ. Genomic structure, promoter analysis and expression of the porcine (*Sus scrofa*) TLR4 gene. *Mol Immunol* (2006) 43:653–9.
- 111) Thomsen BL, Jorsal SE, Andersen S, Willeberg P. The Cox regression model applied to risk factor analysis of infections in the breeding and multiplying herds in the Danish SPF system. *Prev Vet Med* 1992 12:287-297.
- 112) Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carnevali JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* (2007) 56:1986–98.
- 113) Tu PY, Tsai PC, Lin YH, Liu PC, Chang HL, Kuo TY, Chung WB. Expression profile of Toll-like receptor mRNA in pigs co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Res Vet Sci*. 2015 Feb;98:134-41.
- 114) Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, et al. (2006) Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c(+) lamina propria cells. *Nat Immunol* 7: 868–874.
- 115) Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* (2001) 276:31332–9.
- 116) Vigre, H., Dohoo, I. R., Stryhn, H. and Busch, M. E. (2004). Intra-unit correlations in seroconversion to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma*

- hyopneumoniae at different levels in Danish multi-site pig production facilities. *Preventive Veterinary Medicine*, 63, 9-28.
- 117) Vranckx K, Maes D, Marchioro SB, Villarreal I, Chiers K, Pasmans F, Haesebrouck F. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Vet Res*. 2012 Mar 12;8:24.
 - 118) Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10: 1366–1373.
 - 119) Wassef A, Janardhan K, Pearce JW, Singh B. Toll-like receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol*. 2004 Oct;19(4):1201-8.
 - 120) Werling, D., Piercy, J., Coffey, T.J., 2006. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells—Potential role in pathogen discrimination? *Vet. Immunol. Immunopathol*. 112, 2–11.
 - 121) Williams, J., Torres-Leon, M. A. and Sansor-Nah, R. (2000). Prevalencia, extension y caracterizacion de las lesiones en el pulmon de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Merida, Yucatan, Mexico. *Revista Biomedica*, 11, 25-32.
 - 122) Yang H, Wei J, Zhang H, Lin L, Zhang W, He S. Upregulation of Toll-like receptor (TLR) expression and release of cytokines from P815 mast cells by GM-CSF. *BMC Cell Biol*. 2009 May 9;10:37.
 - 123) Yang S, Sugawara S, Monodane T, Nishijima M, Adachi Y, Akashi S, et al. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infect Immun* (2001) 69:2025–30.
 - 124) Zhang L, Liu J, Bai J, Wang X, Li Y, Jiang P. Comparative expression of Toll-like receptors and inflammatory cytokines in pigs infected with different virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Virol J*. 2013 Apr 30;10:135.
 - 125) Zhu J, Huang X, Yang Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both toll- like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol*. 2007; 81(7):3170–3180.
 - 126) Zhu Y, Magnusson U, Fossum C, Berg M. *Escherichia coli* inoculation of porcine mammary glands affects local mRNA expression of Toll-like receptors and regulatory cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Sep 15;125(1-2):182-9.