

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Medico-Veterinarie

Ciclo XXVIII

**Valutazione della risposta immunitaria cellulare
e fenotipizzazione linfocitaria nel suino in corso di infezione naturale da
virus della PRRS (“Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome”)
e dopo stimolazione di PBMC (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”)
in vitro con Peptide Killer (KP)**

**Evaluation of the cellular immune response
and lymphocyte phenotyping in swine upon PRRS (“Porcine
Reproductive and Respiratory Syndrome”) virus
natural infection and after in vitro stimulation of
PBMC (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”) with Killer Peptide (KP)**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Tutor:

Chiar.mo Prof. Paolo Borghetti

Dottoranda:

Giulia Ferrarini

2014-2015

INDICE

SUMMARY	Pag. 4
RIASSUNTO	Pag. 8
1. INTRODUZIONE	
1.1. PRRS e PRRSV	Pag. 12
1.1.1. Storia	Pag. 12
1.1.2. Eziologia	Pag. 12
1.1.3. Caratteristiche chimico-fisiche e biologiche	Pag. 14
1.1.4. Organizzazione del genoma	Pag. 14
1.1.4.1. Variabilità genotipica/fenotipica	Pag. 16
1.1.4.2. Replicazione	Pag. 18
1.1.5. Vie di diffusione e trasmissione	Pag. 20
1.1.5.1. Vie dirette	Pag. 20
1.1.5.2. Vie indirette	Pag. 21
1.1.6. Patogenesi	Pag. 23
1.1.6.1. Stadio acuto dell'infezione	Pag. 23
1.1.6.2. Stadio persistente dell'infezione	Pag. 23
1.2. LA RISPOSTA IMMUNITARIA	Pag. 25
1.2.1. Immunità innata	Pag. 25
1.2.2. Immunità specifica o adattativa	Pag. 28
1.2.2.1. Immunità umorale	Pag. 28
1.2.2.2. Immunità cellulo-mediata	Pag. 30
1.2.3. La risposta immunitaria nei confronti di PRRSV	Pag. 34
1.2.4. Diagnosi	Pag. 40
1.2.4.1. Di campo	Pag. 40
1.2.4.2. Di laboratorio	Pag. 40
1.2.4.2.1. Virologica	Pag. 40
1.2.4.2.2. Biomolecolare	Pag. 41
1.2.4.2.3. Sierologica	Pag. 42
1.2.5. Misure di profilassi	Pag. 44
1.2.5.1. Profilassi indiretta	Pag. 44

1.2.5.2. Profilassi diretta	Pag. 45
1.3.KP: Killer Peptide	Pag. 46
2. SCOPO DEL LAVORO	Pag. 48
3. MATERIALI e METODI	Pag. 49
4. STUDIO 1: “Associazione di cellule memoria, cellule citotossiche e cellule secernenti IFN-γ nella risposta immunitaria a PRRSV (Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino)”.	Pag. 65
4.1. Disegno sperimentale	Pag. 65
4.2. Parametri valutati	Pag. 66
4.3. Risultati	Pag. 67
4.4. Discussione	Pag. 72
5. STUDIO 2: “Valutazione della risposta immunitaria nei confronti di una vaccinazione contro PCV2 in suini riscontrati PRRSV viremici e non viremici alla vaccinazione”.	Pag. 77
5.1 Disegno sperimentale	Pag. 77
5.2. Parametri valutati	Pag. 78
5.3. Risultati	Pag. 79
5.4. Discussione	Pag.82
6. STUDIO 3: “Modulazione fenotipica di monociti CD14+, cellule natural killer (NK), T natural killer (NKT) e sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8α/β+ durante stimolazione con killer peptide (KP) nella specie suina”.	Pag. 87
6.1. Disegno sperimentale	Pag. 87
6.2. Parametri valutati	Pag. 87
6.3. Risultati	Pag. 89
6.4. Discussione	Pag. 100

7. CONCLUSIONI

Pag. 104

8. BIBLIOGRAFIA

Pag. 108

SUMMARY

The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus is one of the most spread pathogens in swine herds all over the world and responsible for a reproductive and respiratory syndrome that causes severe health and economical problems. This virus emerged in late 1980's but although about 30 years have passed by, the knowledge about some essential facets related to the features of the virus (pathogenesis, immune response, and epidemiology) seems to be still incomplete. Taking into account that the development of modern vaccines is based on how innate and acquired immunity react, a more and more thorough knowledge on the immune system is needed, in terms of molecular modulation/regulation of the inflammatory and immune response upon PRRSV infection. The present doctoral thesis, which is divided into 3 different studies, is aimed to increase the knowledge about the interaction between the immune system and the PRRS virus upon natural infection.

The objective of the first study entitled "*Coordinated immune response of memory and cytotoxic T cells together with IFN- γ secreting cells after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) natural infection in conventional pigs*" was to evaluate the activation and modulation of the immune response in pigs naturally infected by PRRSV compared to an uninfected control group. The course of viremia was evaluated by PCR, the antibody titres by ELISA, the number of IFN- γ secreting cells (IFN- γ SC) by an ELISPOT assay and the immunophenotyping of some lymphocyte subsets (cytotoxic cells, memory T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes) by flow cytometry. The results showed that the activation of the cell-mediated immune response against PRRSV is delayed upon infection and that however the levels of IFN- γ SC and lymphocyte subsets subsequently increase over time.

Furthermore, it was observed that the course of the different immune cell subsets is time-associated with the levels of PRRSV-specific IFN- γ SC and this can be interpreted based on the functional role that such lymphocyte subsets could have in the specific production/secretion of the immunostimulatory cytokine IFN- γ .

In addition, these data support the hypothesis that the age of the animals upon the onset of infection or the diverse immunobiological features of the field isolate, as typically hypothesized during PRRSV

infection, are critical conditions able to influence the qualitative and quantitative course of the cell-mediated immune response during PRRSV natural infection.

The second study entitled “*Immune response to PCV2 vaccination in PRRSV viremic piglets*” was aimed to evaluate whether PRRSV could interfere with the activation of the immune response to PCV2 vaccination in pigs. In this trial, 200 pigs were divided into 2 groups: PCV2-vaccinated (at 4 weeks of age) and PCV2-unvaccinated (control group). Some piglets of both groups got infected by PRRSV, as determined by PRRSV viremia detection, so that 4 groups were defined as follows:

PCV2 vaccinated - PRRSV viremic
PCV2 vaccinated - PRRSV non viremic
PCV2 unvaccinated - PRRSV viremic
PCV2 unvaccinated - PRRSV non viremic

The following parameters were evaluated in the 4 groups: number of PCV2-specific IFN- γ secreting cells, antibody titres by ELISA and IPMA. Based on the immunological data analysis, it can be deduced that:

- 1) The low levels of antibodies against PCV2 in the PCV2-vaccinated – PRRSV-viremic group at vaccination (4 weeks of age) could be related to a reduced colostrum intake influenced by PRRSV viremia.
- 2) Independently of the viremia status, serological data of the PCV2-vaccinated group by ELISA and IPMA does not show statistically different differences. Consequently, it can be stated that, under the conditions of the study, PRRSV does not interfere with the antibody response induced by the PCV2 vaccine.
- 3) The cell-mediated immune response in terms of number of PCV2-specific IFN- γ secreting cells in the PCV2-vaccinated – PRRSV-viremic group seems to be compromised, as demonstrated by the reduction of the number of IFN- γ secreting cells after PCV2 vaccination, compared to the PCV2-vaccinated – PRRSV-non-viremic group.

The data highlight and further support the inhibitory role of PRRSV on the development and activation of the immune response and highlight how a natural infection at early age can negatively influence the immune response to other pathogens/antigens.

The third study entitled “*Phenotypic modulation of porcine CD14⁺ monocytes, natural killer/natural killer T cells and CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T cell subsets by an antibody-derived killer peptide (KP)*” was aimed to determine whether and how the killer peptide (KP) could modulate the immune response in terms of activation of specific lymphocyte subsets. This is a preliminary approach also aimed to subsequently evaluate such KP with a potential antiviral role or as adjuvant.

In this work, pig peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with three KP concentrations (10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$) for three time points (24, 48 and 72 hours).

TIME POINTS (hours)	KP CONCENTRATIONS ($\mu\text{g/ml}$)
24	0-10-20-40
48	0-10-20-40
72	0-10-20-40

By using flow cytometry, the qualitative and quantitative modulation of the following immune subsets was evaluated upon KP stimulation: monocytes, natural killer (NK) cells, natural killer T (NKT) cells, and CD4⁺ and CD8 α/β ⁺ T lymphocyte subsets. Based on the data, it can be deduced that:

- 1) KP promotes a dose-dependent activation of monocytes, particularly after 24 hours of stimulation, by inducing a monocyte phenotypic and maturation shift mainly involved in sustaining the innate/inflammatory response.
- 2) KP induces a strong dose-dependent modulation of NK and NKT cells, characterized by an intense increase of the NKT cell fraction compared to NK cells, both subsets involved in the antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). The increase is observed especially after 24 hours of stimulation.
- 3) KP promotes a significant activation of the cytotoxic T lymphocyte subset (CTL).

- 4) KP can modulate both the T helper and T cytotoxic phenotype, by inducing T helper cells to acquire the CD8 α thus becoming double positive cells (CD4+CD8 α +) and by inducing CTL (CD4-CD8 α +^{high}) to acquire the double positive phenotype (CD4+CD8 α +^{high}).

Therefore, KP may induce several effects on different immune cell subsets. For this reason, further research is needed aimed at characterizing each “effect” of KP and thus identifying the best use of the decapeptide for vaccination practice, therapeutic purposes or as vaccine adjuvant.

RIASSUNTO

Il virus della PRRS (Porcine Reproductive Respiratory Syndrome) è uno dei più diffusi agenti patogeni negli allevamenti suini di tutto il mondo, responsabile di una sindrome riproduttiva e respiratoria causa di gravi danni ad impatto sanitario ed economico. Questo virus è emerso attorno alla fine degli anni '80 ma nonostante siano passati circa una trentina di anni, le conoscenze su alcuni punti essenziali che riguardano le caratteristiche del virus (patogenesi, risposta immunitaria, epidemiologia) appaiono ancora spesso incomplete. Considerando che lo sviluppo dei vaccini moderni è basato sui principi dell'immunità innata e acquisita è essenziale una sempre più completa conoscenza del sistema immunitario inteso come modulazione/regolazione molecolare della risposta infiammatoria e immunitaria in corso di tale infezione. Questo lavoro di tesi, suddiviso in tre diversi studi, ha l'intento di contribuire all'aumento delle informazioni riguardo l'interazione del sistema immunitario, con il virus della PRRS in condizioni di infezione naturale.

L'obiettivo del primo studio, intitolato *“Associazione di cellule memoria, cellule citotossiche e cellule secernenti IFN- γ nella risposta immunitaria in corso di infezione naturale da Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV)”* è stato di valutare l'attivazione e la modulazione della risposta immunitaria in suini naturalmente infetti da PRRSV rispetto ad un gruppo controllo non infetto. I parametri valutati sono stati la viremia mediante PCR, il titolo anticorpale mediante ELISA, il numero di cellule secernenti IFN- γ (IFN- γ SC) mediante tecnica ELISPOT e la fenotipizzazione di alcune sottopopolazioni linfocitarie (Cellule citotossiche, linfociti T memoria e linfociti T citotossici) mediante citofluorimetria a flusso. Dai risultati ottenuti è stato possibile osservare che l'attivazione della risposta immunitaria cellulo-mediata verso PRRSV appare ritardata durante l'infezione e che l'andamento, in termini di IFN- γ SC e dei cambiamenti delle sottopopolazioni linfocitarie, mostra comunque degli incrementi seppur successivi nel tempo.

E' stato inoltre osservato che gli andamenti delle diverse sottopopolazioni immunitarie cellulari appaiono temporalmente associati ai livelli di IFN- γ SC PRRSV-specifiche e ciò potrebbe essere interpretato sulla base del ruolo funzionale che tali sottopopolazioni linfocitarie potrebbero avere nella produzione/secrezione specifica della citochina immunoattivatrice IFN- γ .

Questi dati inoltre supportano l'ipotesi che l'età degli animali alla comparsa dell'infezione o, come tipicamente ipotizzato nell'infezione da PRRSV, le differenti caratteristiche immunobiologiche

dell'isolato di campo, sia condizioni critiche nell' influenzare l'andamento qualitativo e quantitativo della risposta cellulo-mediata durante l'infezione naturale da PRRSV.

Il secondo studio, dal titolo “*Valutazione della risposta immunitaria nei confronti di una vaccinazione contro PCV2 in suini riscontrati PRRSV viremici e non viremici alla vaccinazione*” ha avuto lo scopo di valutare se il virus della PRRS potesse andare ad interferire sull'attivazione della risposta immunitaria indotta da vaccinazione contro PCV2 nel suino. In questo lavoro sono stati arruolati 200 animali divisi in due gruppi, PCV2 Vaccinato (a 4 settimane di età) e PCV2 Non Vaccinato (controllo negativo). Alcuni suinetti di entrambi i gruppi, si sono naturalmente infettati con PRRSV, come determinato con l'analisi della viremia da PRRSV, per cui è stato possibile creare quattro sottogruppi, rispettivamente:

PCV2 vaccinato - PRRSV viremico
PCV2 vaccinato - PRRSV non viremico
PCV2 non vaccinato - PRRSV viremico
PCV2 non vaccinato - PRRSV non viremico

Su questi quattro sottogruppi sono stati valutati i seguenti parametri: numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche, ed i titoli anticorpali mediante tecniche ELISA ed IPMA. Dall'analisi dei dati immunologici derivati dalle suddette tecniche è stato possibile dedurre che:

- I bassi valori anticorpali nei confronti di PCV2 del gruppo Vaccinato PCV2-PRRSV viremico già al periodo della vaccinazione (4 settimane di età) potrebbero essere messi in relazione ad una ridotta assunzione di colostro legata allo stato di viremia da PRRSV
- Indipendentemente dallo stato viremico, i dati sierologici del gruppo vaccinato PCV2 provenienti sia da ELISA sia da IPMA non mostrano differenze statisticamente significative. Di conseguenza è possibile affermare che in questo caso PRRSV non interferisce con la risposta anticorpale promossa dal vaccino PCV2.

- La risposta immunitaria cellulo-mediata, intesa come numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche nel gruppo PCV2 vaccinato PRRS viremico sembra essere compromessa, come viene infatti dimostrato dalla diminuzione del numero di cellule secernenti IFN- γ dopo la vaccinazione contro PCV2, comparata con il gruppo PCV2 vaccinato- non viremico.

I dati evidenziano ed ulteriormente sostengono il ruolo inibitorio del virus della PRRSV sullo sviluppo ed attivazione della risposta immunitaria e come un infezione naturale ad età precoci possa influenzare negativamente la risposta immunitaria ad altri patogeni/antigeni.

Il terzo studio, intitolato “*Modulazione fenotipica di: monociti CD14+, cellule natural killer (NK), T natural killer (NKT) e sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8 α / β + durante stimolazione con killer peptide (KP) nella specie suina*” ha avuto come scopo quello di stabilire se e come il Peptide Killer (KP) potesse modulare la risposta immunitaria in termini di attivazione di specifiche sottopopolazioni linfocitarie. Si tratta di un approccio preliminare anche ai fini di successivamente valutare tale KP in un potenziale ruolo antivirale o come adiuvante.

In questo lavoro, periferal blood mononuclear cells (PBMC) suine sono state stimulate con KP a tre diverse concentrazioni (10, 20 e 40 μ g/ml) per tre diversi tempi (24, 48 e 72 ore).

TEMPI DI STIMOLAZIONE (ore)	CONCENTRAZIONE DI KP (μ g/ml)
24	0-10-20-40
48	0-10-20-40
72	0-10-20-40

Mediante la citometria a flusso è stato dunque possibile analizzare il comportamento qualitativo e quantitativo di alcune sottopopolazioni linfocitarie sotto lo stimolo del KP, tra cui: monociti, cellule Natural Killer (NK), cellule T Natural Killer (NKT) e linfociti T CD4 e CD8 α / β +. Dai dati ottenuti è stato possibile dedurre che:

- 1) KP promuove un'attivazione dei monociti dose-dipendente in particolare dopo 24 ore di stimolazione, inducendo uno “shift” fenotipico e di maturazione monocitaria maggiormente coinvolto nel sostegno della risposta innata/infiammatoria.
- 2) KP induce una forte modulazione dose-dipendente di cellule NK e NKT con un forte aumento della frazione delle cellule NKT rispetto alle NK, sottopopolazioni entrambe coinvolte nella citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC). L'aumento è riscontrabile soprattutto dopo 24 ore di stimolazione.
- 3) KP promuove una significativa attivazione della sottopopolazione dei linfociti T citotossici (CTL).
- 4) Per quanto riguarda la marcatura CD4+/CD8α+ è stato dimostrato che KP ha la capacità di modulare sia il fenotipo T helper che T citotossico, inducendo le cellule T helper ad acquisire CD8α diventando quindi doppio positive (CD4+CD8α+) ed inducendo il fenotipo CTL (CD4-CD8α^{high}) ad acquisire il fenotipo doppio positivo (CD4+CD8α^{high}).

Molti dunque potrebbero essere gli effetti che il decapeptide KP potrebbe esercitare sulle diverse sottopopolazioni del sistema immunitario, per questo motivo va evidenziata la necessità di impostare e attuare nuove ricerche che portino alla caratterizzazione di ciascuna “abilità” di KP e che conducano successivamente alla scoperta del migliore utilizzo che si possa fare del decapeptide sia dal punto di vista vaccinale, terapeutico oppure sotto forma di adiuvante vaccinale.

1. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

1.1.1. Storia

La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è una malattia in grado di diffondersi a dismisura e causare ingenti danni economici al comparto suinicolo mondiale (Dokland 2010). Verso la fine degli anni 80, gravi episodi di aborto e parto prematuro con mortalità neonatale, difficoltà respiratoria, riduzione degli accrescimenti giornalieri e aumento della mortalità furono descritti negli USA. Tra il 1990 e il 1991 episodi analoghi comparvero in Europa, dapprima in Germania e nei Paesi Bassi ed in seguito in tutti i paesi del continente. L'impossibilità di riconoscere l'agente eziologico portò a denominare questa sindrome come "Blue Ear Disease", "Mystery Swine Disease" (MSD) (Dea 1992). Dagli anni 90, PRRS è endemica nella maggior parte dei Paesi a produzione suinicola intensiva e le problematiche associate si correlano ad ingenti perdite economiche. Secondo uno studio condotto in Olanda nel 2012 è emerso che, per focolaio di malattia riproduttiva, PRRS determini un costo variabile tra i 59 e i 126 € per singola scrofa. La distribuzione geografica del virus della PRRS vede il coinvolgimento di tutti i Paesi europei a suinicoltura intensiva, fatte salve alcune eccezioni: Svezia, Norvegia, Finlandia e Svizzera che sono indenni. Sono indenni anche Argentina, Brasile, Cile, Cuba e alcuni paesi dell'area caraibica nonché l'Oceania. (Martelli et al. 2013)

1.1.2. Eziologia

L'agente eziologico della PRRS è un virus, a singolo filamento di RNA a polarità positiva (+RNA) dotato di envelope (Mengeling 2000), classificato nell'ordine dei *Nidovirales*, famiglia *Arteriviridae* assieme al virus dell'artrite equina (EAV), della lattato deidrogenasi (LDH) e della febbre emorragica delle scimmie (SHFV). Il virus della PRRS viene diviso in due varianti genetiche altamente divergenti, Tipo 1 in Europa Occidentale (virus di Lelystad) e Tipo 2 in Nord America (VR-2332) entrambi clinicamente, antigenicamente e geneticamente eterogenei (Thanawongnuwech R. 2010) e principali cause di numerosi focolai di malattie respiratorie acute e aborti (Eric J. Snijder 2013). La sequenza nucleotidica del genoma dei due ceppi, virus di Lelystad (tipo 1) e VR-2332 (tipo 2) risulta identica per il 50-60% (Allende R. et al., 1999; Fang et al., 2007; Forsberg 2005; Nelsen et al., 1999). Originariamente il virus di Lelystad (LV) prevaleva in Europa e il tipo 2 in Nord America ma oggi entrambi hanno una distribuzione mondiale con una predominanza del genotipo 1 (PRRSV-1) in Europa e del genotipo 2 (PRRSV-2) in Nord America e Asia.

L'analisi filogenetica, basata sull' Open Reading Frame (ORF) 5, che codifica per la maggiore glicoproteina dell'envelope (GP5) ha dimostrato che sia all'interno del tipo 1 che del tipo 2 vi è una ampia variabilità tra gli isolati e che questa variabilità può raggiungere anche il 30% nel genotipo 1 (EU) e il 21% nel genotipo 2 (NA) (Zimmerman et al., 2012).

All'interno del tipo 1 vengono riconosciuti diversi gruppi genetici (cluster o sottotipi): i cluster presenti in Russia, Bielorussia, Ucraina, Lituania e Lettonia che hanno una maggiore diversità tra loro e sono denominati sottogruppi 2, 3, 4 mentre i cluster presenti in Europa Occidentale, data la bassa diversità vengono considerati in un unico cluster denominato come sottotipo 1 (*Lelystad-like*, *Danish* e *Italian-like*;). Per quanto riguarda il tipo 2 sono stati identificati nove gruppi genetici, sette sono predominanti in Nord America e due sono costituiti esclusivamente da isolati dell'estremo Oriente asiatico.

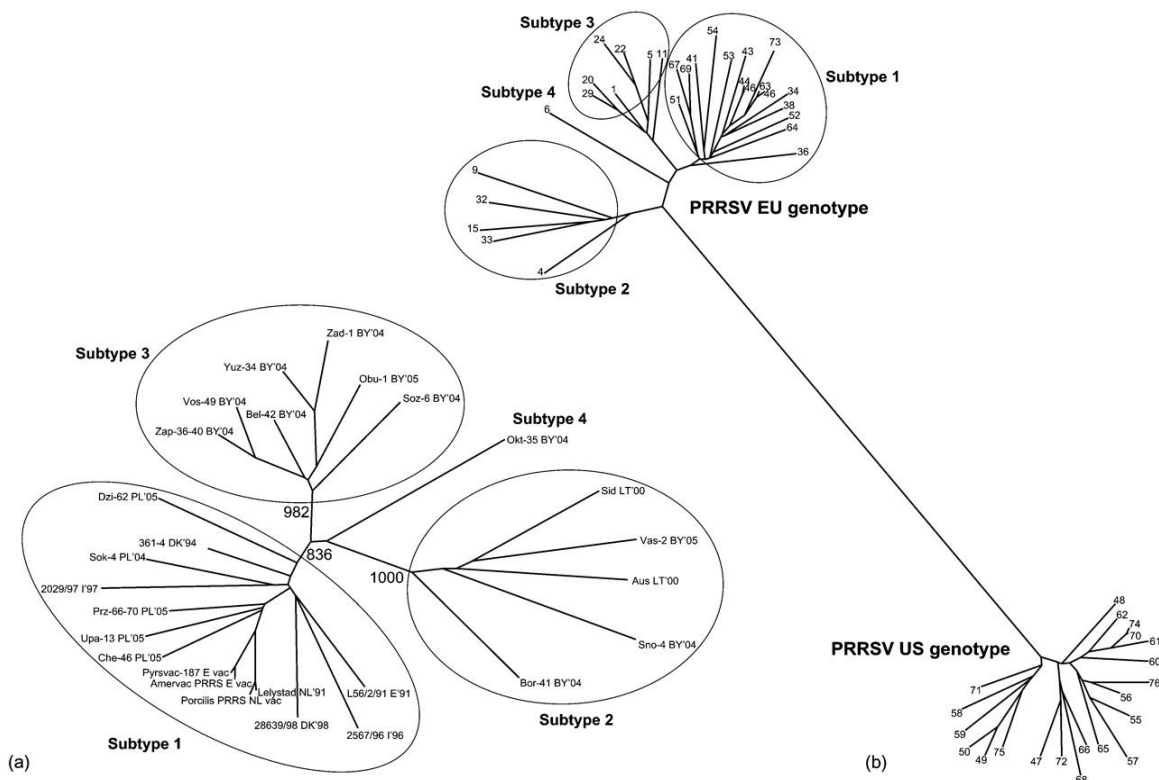


Fig. 1: Rappresentazione della distribuzione dei genotipi e sottotipi in relazione alla divergenza genetica (per gentile concessione del Prof. T. Stadejek- University of Warsaw).

1.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche e biologiche

PRRSV è labile e velocemente inattivato in ambiente caldo e secco (Baekbo, P. 2015) solamente in condizioni particolari: bassa temperatura, pH 6,5-7,5 e umidità stabile, il virus resta infettante e questa capacità persiste anche per 20 minuti a 56°C, 24 h a 37°C, per 6 giorni a 21°C e per 30 giorni a 4°C. (Van Alstine et al., 1993), in acqua resiste fino a 10 giorni e resiste anche al congelamento. Il virus è stabile a -70° C, in cultura, siero, omogenati di tessuto, mentre all'aumentare della temperatura la sua sopravvivenza decresce rapidamente. Questo virus viene inattivato dai solventi lipidici (etere e cloroformio) ed è altamente instabile in soluzioni contenenti basse concentrazioni di detergenti ionici o anionici che provocano dissoluzione dell'envelope. (Martelli et al., 2013)

1.1.2. Organizzazione del genoma

Il genoma di PRRSV è composto da un singolo filamento di RNA a polarità positiva lungo 15,1kb contenebte 9 segmenti di lettura (*Open Reading Frames* ORFs) ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 o M, ORF7 o N (Balka et al., 2010; Yu et al., 2010). Le ORF1a e ORF1b sono le più lunghe, costituiscono circa l'80% del genoma virale e codificano per la sintesi di enzimi responsabili della replicazione e della trascrizione di PRRSV (Balka et al., 2010) che funzionano come singole poliproteine poi processate in 12 proteine più piccole, dette Proteine Non Strutturali (NSP) tra cui: quattro proteasi NSP1a, NSP1b, NSP2 e NSP4, una RNA polimerasi RNA dipendente (NSP9), una elicasi (NSP10) ed una endonucleasi (NSP11) (den Boon et al., 1995; Snijder and Meulenberg, 1998; van Aken et al., 2006; Ziebuhr et al., 2000).

La porzione genomica compresa tra la ORF2a e ORF7 codifica per proteine strutturali (Dea et al., 2000; Snijder and Meulenberg, 1998). ORF2, ORF3 e ORF4 codificano per proteine associate al virione (GP2, GP3, GP4) (Martelli et al., 2013) e sono incorporate in un complesso multimerico nell'envelope di entrambi i tipi, Europeo e Nord americano (Das et al., 2011; Wissink et al., 2005) mentre ORF5, ORF6, ORF7 codificano per le 3 maggiori proteine strutturali (Therrien et al., 2000; Zimmerman et al., 2012), rispettivamente GP5, GP6 o M, GP7 o N (Dea et al., 2000; Snijder and Meulenberg, 1998):

- GP5: proteina principale dell'envelope (Therrien et al., 2000), riconosce il recettore sulla cellula bersaglio e induce apoptosi (Meulenberg, 2000) nei macrofagi e nelle cellule germinali; anticorpi monoclonali nei confronti di GP5 sono efficaci nella neutralizzazione del virus (Zimmerman et al., 2012; Dokland 2010, Opriessnig et al., 2005). GP5 non sembra responsabile del tropismo cellulare di PRRSV (Dobbe et al., 2001). GP6 o M: proteina non glicosilata di matrice, coinvolta nell'assemblaggio e nella gemmazione del virus. Come GP5, promuove la produzione di anticorpi neutralizzanti. (Zimmerman et al., 2012; Dokland 2010);
- GP7 o N: è una proteina che interagisce con l'RNA virale ed è associata all'assemblaggio del nucleocapside; è la proteina più immunogena e per questo viene utilizzata nei test diagnostici (Zimmerman et al., 2012; Dokland 2010). Gli anticorpi contro questa proteina non sono neutralizzanti e dunque non protettivi. (Murtaught et al., 2002; Zimmerman et al., 2012)

ORFs	PROTEINA	STRUTTURALE (SP)/ NON STRUTTURALE (NSP)	FUNZIONE
ORF1a	Con ORF 1b 12 proteine	NSPs	Proteasi, RNA polimerasi, elicasi, endonucleasi, sconosciuta
ORF1b	Con ORF 1a 12 proteine	NSPs	Proteasi, RNA polimerasi, elicasi, endonucleasi, sconosciuta
ORF2a	GP2a	SP	GP2, 3, 4 formano un complesso multimerico che lega CD163
ORF2b	GP2b	SP	Fusione/attaccamento
ORF3	GP3	SP	GP2, 3, 4 formano un complesso multimerico che lega CD163
ORF4	GP4	SP	GP2, 3, 4 formano un complesso multimerico che lega CD163
ORF5	GP5	SP	Riconoscimento recettoriale della cellula bersaglio
ORF6	GP6 o M	SP	Assemblaggio e gemmazione di PRRSV
ORF7	GP7 o N	SP	Regola la trascrizione di PRRSV nella cellula infetta

Tab. 1: Rappresentazione di ogni ORF e GP e relativa funzione (Dokland 2010)

1.1.2.1. Variabilità genotipica/fenotipica

Durante la crescita del virus, la precisa sequenza nucleotidica del genoma può cambiare, questo fenomeno è detto “*quasi-species*”, quindi PRRSV diffuso da un animale infetto ha spesso una sequenza nucleotidica leggermente differente rispetto al virus che ha infettato il successivo animale, le differenze sono causate da mutazioni e ricombinazioni. Questo fenomeno non ha scaturito significanti differenze poichè tali mutazioni non determinano effetti sul fenotipo del virus, inteso come proprietà biologiche e antigeniche.

I virus che hanno lo stesso genotipo sono considerati *omologhi* ossia quando le differenze nucleotidiche sono molto piccole (< 1-3% ossia omologia superiore al 99-97%) mentre i virus che hanno genotipi differenti ossia quando le differenze nucleotidiche sono molto grandi (> 5% ossia omologia inferiore al 95% di) sono considerati *eterologhi*, che quindi non hanno un recente antenato in comune. Tra il 3% e il 5% di divergenza la distinzione non è chiara e l'interpretazione diventa soggettiva. Nel caso venga identificato un isolato con il 96% di omologia (4% di diversità → range dubbio), è probabile che questo sia di nuova introduzione in allevamento, piuttosto che il risultato di una evoluzione all'interno della popolazione residente. (Martelli et al., 2012; Murtaugh MP., 2005)

Il gene ORF5 che codifica per la GP5 comprende il 4% del genoma di PRRSV ed il suo sequenziamento fornisce una stima delle somiglianze e delle variazioni genetiche degli isolati di PRRSV. (Martelli et al., 2012)

La sequenza di questo gene viene utilizzata per:

- Capire quali sono le fonti epidemiche di PRRSV;
- Differenziare virus residenti da quelli di nuova introduzione;
- Determinare la velocità di cambiamento degli isolati.

Queste informazioni permettono di differenziare un'epidemia sostenuta da un virus isolato in precedenza all'interno di un allevamento, rispetto ad una epidemia sostenuta da un isolato di nuova introduzione (Martelli et al., 2012). Inoltre è stato dimostrato *in vitro* che la ricombinazione è più facile che avvenga tra due ceppi dello stesso sottotipo (americano con americano o europeo con europeo) (Zimmerman et al., 2012).

La regione che viene maggiormente sequenziata è il gene ORF5, utile nella differenziazione degli isolati virali ma che a causa di una elevata “ipervariabilità”, che raggiunge anche il 20% (0,5-1% all'anno), diviene un fattore limitante; quindi in alternativa o in associazione viene utilizzato il

sequenziamento di una regione maggiormente conservata, sebbene anch'essa variabile ma meno predisposta a modificazioni, la ORF7.

Il confronto tra ORFs permette unicamente di effettuare una correlazione genetica tra isolati, senza fornire informazioni riguardo a:

- Capacità di infezione;
- Immunogenicità;
- Protezione crociata.

Sebbene sia difficile correlare le variazioni genetiche con gli effetti causati si ritiene che isolati diversi differiscano per:

- Virulenza (valutata in base ai livelli di replicazione dell'isolato in polmoni, linfonodi e tonsille);
- Tropismo d'organo;
- Connotati antigenici;
- Immunogenicità;
- Gravità delle lesioni.

La virulenza viene associata ad alti livelli di replicazione negli animali infetti ed è stata riportata una associazione diretta tra quantità di virus in polmoni, linfonodi, tonsille e virulenza.

Isolati a maggiore virulenza diffondono più agevolmente e per tempi più lunghi quindi la durata della viremia sarebbe correlata alla virulenza. Gli effetti del virus della PRRS sulle performance riproduttive sono dipendenti dalle caratteristiche dell'isolato implicato (Mengeling WL. Et al., 1996). Al momento però non si è ancora in grado di identificare porzioni di genoma o delezioni che siano riconducibili a specifiche variazioni di virulenza. L'esistenza di una marcata differenza antigenica tra isolati è stata ampiamente dimostrata e queste stesse variazioni sono una rilevante problematica per lo sviluppo di strumenti diagnostici, vaccini e adatte misure di controllo. Inoltre l'impatto di tali differenze antigeniche causa problemi riguardanti:

- Protezione crociata durante infezioni di campo da isolati diversi;
- Caratteristiche immunobiologiche: differente capacità di modulare il sistema immunitario sia innato che specifico (umorale e cellulo-mediato).
- Presenza di isolati ad alta patogenicità (HP). I primi episodi associati a ceppi di PRRSV-HP sono stati riscontrati nel 2006 in Cina. Il meccanismo principale che utilizzano questi particolari ceppi per eludere la risposta immunitaria è l'apoptosi che simultaneamente promuove la

patogenesi virale (Collins M et al., 1995). Il meccanismo di apoptosi indotto da PRRSV è stato osservato in diversi organi quali: timo, linfonodi, polmoni e testicoli (Chang HC et al., 2008; Labarque G. et al., 2003). E' stato dimostrato che ceppi HP-PRRSV inducono apoptosi in vari tipi cellulari nel timo ed in organi immunitari periferici e che l'apoptosi indotta dai ceppo HP-PRRSV è molto più grave di quella indotta dai ceppi classici (He Y et al., 2012; - Wang G et al., 2014). E' stato studiato un secondo meccanismo che attua PRRSV per eludere la risposta immunitaria, l'autofagia (Wang G et al., 2014). Studi hanno dimostrato che PRRSV può indurre autofagia in linee cellulari permissive quali MARC 145 e PAMs (Polmonary Alveolar Macrophages), meccanismo che promuove la replicazione virale in vitro.

Questi ceppi HP-PRRSV presentano elevata gravità e l'infezione è caratterizzata da febbre alta, alta morbidità (dal 50% al 100%) e alta mortalità (dal 20% al 100%) (Tian K. et al., 2007; Tong G.Z. et al., 2007).

Inoltre nei suinetti appena nati sono state riscontrate atrofia timica e apoptosi dei timociti (Wang G. et al., 2015).

1.1.2.2. *Replicazione di PRRSV*

Il virus della PRRS ha un particolare tropismo nei confronti di:

- 1) macrofagi alveolari polmonari (PAMs) (Duan et al., 1997 a, b; Wenswoort et al., 1991 Meulenberg, 2000);
- 2) macrofagi di tonsille, linfonodi, milza, fegato, timo, placche del Peyer, microglia (Allende et al., 2000; Therrien et al., 2000; Cano et al., 2009).
- 3) E' stata dimostrata anche la replicazione virale nelle cellule germinali dei testicoli di verri infetti (Therrien et al., 2000).

PRRSV non replica nelle cellule del sangue e la viremia è data dall'intensità di replicazione nei tessuti (Diaz et al., 2005).

Le linee cellulari permissive a PRRSV sono: MA104 (a monkey cell lines) e suoi derivati MARC145 e CL2621, utilizzate per la replicazione virale in vitro (Bautista et al., 1993; Kim et al., 1993). Il tropismo sembra determinato principalmente dalla presenza/assenza di particolari recettori sulla superficie della cellula ospite (Meulenberg, 2000). A riguardo sono state identificate e proposte diverse molecole recettoriali, co-recettori e mediatori per PRRSV tra cui Eparina solfato, Sialoadesina Porcina

(PoSn) ed emoglobina scavenger receptor CD163 che hanno dimostrato essere rilevanti rispettivamente per: attacco, internalizzazione e uncoating virale. (Van Breedam 2010)

- 1) Eparina solfato (GAGs). Jusa et al., (1997) hanno studiato delle molecole, eparin-like sulla superficie delle cellule MARC145 coinvolte nell'infezione di queste cellule. L'incubazione del virus con eparina, prima dell'incubazione con le cellule ha mostrato una forte diminuzione dell'infettività, e lo stesso risultato si è avuto con i macrofagi alveolari. Si ritiene che tale molecola sia coinvolta nel promuovere l'attacco di PRRSV e di concentrare i virioni sulla superficie cellulare, aumentando così l'efficienza di infezione, nonostante ciò è stato dimostrato che non è strettamente richiesta (Van Breedam W. et al., 2010)
- 2) Sialoadesina. È stato dimostrato che l'espressione di sialoadesine porcine ricombinanti (pSn) in linee cellulari di mammifero non permissive, promuove l'efficienza di legame e l'internalizzazione di PRRSV (Vanderheijden et al., 2003), per cui vengono considerate dei recettori per l'attacco e l'internalizzazione del virus. Sulla base di ciò è stato ipotizzato che l'acido sialico sull'envelope virale interagisca con pSn presente sulla membrana macrofagica. (Van Breedam W. et al., 2010 a, Van Breedam W. et al., 2010 b)
- 3) CD163: è la glicoproteina transmembranaria maggiormente espressa dai monociti/macrofagi e svolge un ruolo essenziale nell'"uncoating" (scapsidamento) (Van Gorp H. et al., 2008) del virus e nel rilascio del genoma di PRRSV nella cellula ospite, interagendo con GP2 e GP4 (Van Breedam W et al., 2010 a).

L'infezione della cellula ospite si sviluppa in diverse tappe:

- 1) Inizia con il processo di attacco all'eparina solfato presente sulla membrana dei macrofagi ed in seguito il virus si lega ai recettori sialoadesinici con il complesso M/GP5 sull'envelope virale;
- 2) Durante il legame alle molecole di sialoadesina il complesso virus-recettore viene internalizzato mediante endocitosi mediata da molecole di clatrina;
- 3) Durante l'internalizzazione, il genoma virale viene rilasciato dal precoce endosoma nel citoplasma della cellula ospite;
- 4) Successivamente iniziano i processi di trascrizione e traduzione necessari per la formazione di nuove particelle virali (virioni) (Van Breedam W. et al., 2010 a). Va ricordato che proteasi cellulari (Catepsina E) e un abbassamento del pH all'interno dell'endosoma sono eventi molto importanti per il rilascio del genoma virale (Van Breedam W. et al., 2010 a).

- 5) Dopo 3-6 ore dall'infezione si formano vescicole derivanti dal reticolo endoplasmatico, dotate di doppia membrana che veicolano il complesso replicativo (Meulenberg JJ. Et al., 2000).

Il legame di PRRSV ai macrofagi alveolari avviene secondo un meccanismo dose-dipendente e si completa entro un'ora. Il numero di recettori presenti sulla superficie di un singolo macrofago è piuttosto variabile, ma in genere supera i 10^4 recettori/cellula (Nauwynck H. et al., 2000).

L'assemblaggio delle particelle virali avviene mediante gemmazione (*budding*) del nucleocapside all'interno del lume del reticolo endoplasmatico liscio e/o delle membrane del Golgi; in seguito i virioni si accumulano in vescicole che vengono trasportate verso la membrana citoplasmatica, a livello della quale si fondono per liberare il virus. Prove sperimentali indicano che il rilascio massimo di PRRSV avviene 10-20 ore post-infezione (P.I.), con titoli che raggiungono i $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) per ml (Meulenberg JJ. Et al., 2000).

1.1.3. Vie di diffusione e trasmissione di PRRSV

Il virus della PRRS può essere diffuso e trasmesso tramite due diverse vie, diretta e indiretta:

1.1.3.1. Via diretta

L'eliminazione di PRRSV attraverso la via *diretta* comprende secrezioni ed escrezioni, per periodi di tempo variabili:

- 1) Saliva fino a 42 giorni P.I.
- 2) Secrezioni nasali fino a 38 giorni P.I.
- 3) Urina fino a 28 giorni P.I.
- 4) Feci (e quindi nel liquame) fino a 35 giorni P.I. (Prieto e Castro, 2005)
- 5) Secrezioni mammarie di scrofe sensibili che contraggono l'infezione in gestazione avanzata (Zimmerman et al., 2012; Kang et al., 2010).

L'eliminazione del virus attraverso il materiale seminale a causa del sempre più elevato utilizzo dell'inseminazione artificiale è particolarmente insidiosa. La durata dell'eliminazione del virus tramite seme può durare fino a 90 giorni post inoculazione sperimentale e nelle ghiandole bulbo uretrali è rintracciabile fino a 100 giorni circa post-infezione (Martelli P. et al., 2013). Mediante PCR, l'RNA virale è rintracciabile nell'eiaculato in maniera intermittente fino a 92 giorni P.I. (Christopher-Hennings et al., 1995; Zimmerman et al., 2012).

L'eliminazione del virus tramite seme ha durata variabile, in base a:

- fattori individuali
- ceppo virale
- tecnica diagnostica utilizzata (Prieto e Castro, 2005)

Risulta quindi indispensabile che un centro verri possa garantire la distribuzione di seme negativo quando tutta la popolazione è indenne (tutta sieronegativa). (Martelli P. et al., 2013). Tra le vie di trasmissione dirette troviamo:

- 1) Intranasale;
- 2) orale;
- 3) intrauterina e vaginale;
- 4) parenterale.

Ogni via di esposizione necessita di una specifica dose per conferire l'infezione ad esempio la dose infettante (Infectious Dose → ID) il 50% degli animali esposti al virus (in vitro TCID₅₀ Tissue Culture Infection Dose) per via orale è $1 \times 10^{5,3}$ TCID, intranasale 1×10^4 e venerea 1×10^4 (Zimmerman 2012).

Gli animali sono solitamente molto più sensibili all'infezione per via parenterale (soluzioni di continuo della cute) piuttosto che per via orale. Vie parenterali possono essere rappresentate in campo dalle pratiche manageriali, come il taglio della coda, la limatura dei denti, le iniezioni e i tatuaggi identificativi (Pitkin et al., 2009; Martelli P. et al., 2012); inoltre anche le lotte tra gli animali sono causa di possibili vie di trasmissione del virus, attraverso morsicature con saliva infetta sia alla coda che alle orecchie, spellature ed abrasioni (Zimmerman et al., 2012).

Un'ulteriore via di trasmissione del virus è quella transplacentare da scrofa viremica ai feti. In seguito all'infezione dei feti in utero possono conseguire morte fetale, mummificazione o nascita di suinetti viremici, è infatti raro che vengano messi alla luce suinetti non viremici. I suinetti viremici alla nascita possono presentarsi disvitali o vivi e vitali. (Nielsen J. Et al., 2002)

1.1.3.2. Vie indirette

La trasmissione per via *indiretta* avviene mediante contatto dell'animale suscettibile con:

- fomite contaminate (stivali, attrezzature per il governo, contenitori, lettiera, aghi infetti e strumenti chirurgici);
- personale addetto all'allevamento contaminato con sangue e secrezioni orali;
- sostanze come acqua e cibo;
- vettori (mosche e zanzare). (Zimmerman et al., 2012).

È stato dimostrato che l'attuazione di misure di biosicurezza permette di limitare od impedire la trasmissione del virus: cambiare la tuta e gli stivali, lavare le mani, fare la doccia prima e dopo essere venuti a contatto con gli animali, utilizzare calzature monouso e indossare guanti e vestiti puliti prima di entrare in azienda rappresentano i principali accorgimenti adottabili (Cho e Dee, 2006; Pitkin et al., 2009). Il controllo delle popolazioni di insetti all'interno dell'allevamento può essere condotto tramite il monitoraggio periodico delle prese d'aria, l'uso di insetticidi ed una corretta gestione ambientale (Cho e Dee, 2006; Pitkin et al., 2009).

La trasmissione per via aerosolica a lunghe distanze può essere un'altra modalità di trasmissione ma dipende dall'isolato di campo e da fattori ambientali come venti, basse temperature, elevata umidità relativa e poche ore di luce solare. Questi sono tipicamente riscontrabili nel periodo invernale, promuovendo così la trasmissione indiretta del virus e l'incidenza di nuovi focolari anche a distanza.

La trasmissione tra allevamenti avviene prevalentemente a causa di:

- Introduzione di animali infetti;
- Seme contaminato;
- Allevamenti vicini per via aerosolica, trasmissione aerea ("*area spread*")

Il rischio di infezione aumenta in modo direttamente proporzionale alla densità di popolazione suina nel territorio e si riduce con l'aumentare della distanza tra allevamenti (500 m di distanza alto rischio, 1 Km distanza di rischio ridotto) (Martelli et al., 2012). Anche l'utilizzo di mezzi di trasporto contaminati può essere un'importante via di trasmissione soprattutto nel periodo invernale (Dee S. et al., 2004). Inoltre l'assenza o l'inadeguatezza dei sistemi di biosicurezza è una frequente causa predisponente di infezione.

La simultanea presenza di soggetti persistentemente infetti e di animali suscettibili alla nascita è la principale causa di trasmissione del virus all'interno di un allevamento (trasmissione orizzontale e verticale). Il momento di maggiore criticità per quanto riguarda la trasmissione orizzontale è il periodo produttivo post-svezzamento poichè la maggior parte della popolazione si infetta proprio in questo periodo ed intorno alle 9-10 settimane di età il 90-100% della popolazione risulta infetta (Martelli et al., 2013).

1.1.4. Patogenesi

La PRRS viene descritta come un'infezione acuta che causa problemi respiratori nei giovani animali e aborti tardivi nelle scrofe ma è noto anche essere in grado di provocare infezioni persistenti. L'infezione da PRRSV può essere distinta in due stadi patologici:

- *stadio acuto*, della durata di circa 2 settimane, si rilevano elevati titoli virali all'esame degli organi virus-specifici. Questa fase coincide con la malattia e la comparsa delle lesioni linfoidi e polmonari. (Martelli et al., 2013).
- *stadio persistente*, dopo le 2 settimane, può durare sino a 4 mesi ed è caratterizzato da bassi livelli di replicazione, ristretta solo ad alcuni organi.

1.1.4.1. Stadio acuto dell'infezione

Successivamente all'ingresso del virus nell'organismo, l'infezione prevede la replicazione di PRRSV ed in seguito la disseminazione delle nuove particelle virali in circolo.

Gli isolati più virulenti possono causare viremia già nelle prime 12 ore dall'inoculazione del virus e comunque entro 24 ore in tutti gli animali. I titoli virali raggiungono il loro picco 7-14 giorni P.I. Le cellule che costituiscono il substrato primario per la replicazione virale sono i macrofagi alveolari polmonari (PAMs), quelli polmonari intravasali (PIMs) e quelli dei tessuti linfoidi (Martelli et al., 2013). La selettività nei confronti dei PAMs risulta marcata in animali in giovane età o in soggetti immunologicamente immaturi. Si può dire che maggiore è l'età dell'animale e minore è la sensibilità dei macrofagi all'infezione (Suarez P., 2000).

Successivamente al picco virale i titoli diminuiscono rapidamente a tal punto che molti soggetti non mostrano più viremia già 28 giorni P.I., sebbene l'RNA virale sia stato rinvenuto nel siero a 251 giorni dall'infezione (Wills RW. et al., 2003). Questo stadio è caratterizzato da anoressia, letargia, linfopenia e stati febbrile (39-41°C) in animali di tutte le età.

1.1.4.2. Stadio persistente dell'infezione

PRRSV continua a replicarsi a bassi livelli nei tessuti linfoidi anche quando la viremia è terminata. (Van Reeth, 1997) (Zimmerman et al., 2012).

Quando la replicazione del virus è ristretta ai tessuti linfoidi (tonsille, milza e linfonodi) o a sedi immuno-privilegiate come i testicoli, ci si trova di fronte ad una infezione persistente. La replicazione risulta invece assente a livello polmonare, nei macrofagi alveolari (Benfield et al., 1998).

I meccanismi patogenetici di PRRSV causano la comparsa di sintomi e lesioni attraverso varie modalità:

- Apoptosi: primaria causa di morte cellulare dovuta a PRRSV, sia delle cellule infette (apoptosi diretta) sia di quelle non infette (apoptosi indiretta o “bystander”).
L’apoptosi diretta potrebbe essere riconducibile alla presenza di GP5 sull’envelope virale (Suarez P. et al., 1996) mentre l’induzione di una apoptosi indiretta è dimostrata dal fatto che, le cellule che vanno incontro ad apoptosi, sono in numero maggiore di quelle infette e raramente contengono il virus (Suarez P. 2000). Il rilascio di particolari sostanze tra cui citochine e ROS (“Reactive Oxygen Species”), da parte dei macrofagi infettati potrebbe essere il meccanismo su cui si basa l’apoptosi indiretta (Zimmerman et al., 2012).
- Secrezione di citochine: i macrofagi infetti secernono TNF- α , IL-1 e IL-6 che promuovono il richiamo e l’attivazione dei leucociti, l’aumento della permeabilità capillare dando origine ad edema polmonare e broncocostrizione, effetti sistemici come ipertermia, anoressia e letargia (Zimmerman et al., 2012);
- Attivazione di cellule B policlonali: è associata alla comparsa di iperplasia linfoide, di livelli estremamente elevati di immunoglobuline sieriche e di immunocomplessi circolanti (Zimmerman et al., 2012);
- Diminuzione della capacità fagocitaria: la capacità di fagocitare dei macrofagi infatti si riduce e questo porta ad una maggiore predisposizione ad infezioni secondarie e a setticemia. (Zimmerman et al., 2012).
- Meccanismi di immuno-modulazione: secrezione di citochine ad attività immunomodulatoria-soppressoria. (Martelli et al., 2012)

Questa fase è caratterizzata da turbe riproduttive in scrofe che hanno contratto il virus nel terzo trimestre e da problemi respiratori e da alta mortalità in suinetti pre-svezzamento.

1.2 La risposta immunitaria

La risposta immunitaria (risposta protettiva) è un insieme di meccanismi di difesa volti a prevenire, combattere e distruggere agenti infettivi o insulti in generale che penetrano attraverso le barriere dell'organismo. La risposta immunitaria viene divisa in due principali tipologie, una risposta innata o naturale (precoce) ed una risposta acquisita o specifica (tardiva).

1.2.1. Immunità innata o naturale

Questo primo tipo di immunità consiste di meccanismi di difesa cellulare e biochimici preesistenti all'infezione e pronti a reagire con rapidità. Le caratteristiche principali che caratterizzano questo tipo di immunità sono:

- è la prima ad intervenire in caso di infezione da parte di agenti patogeni
- è la più rapida (insorge poche ore dopo l'infezione)
- non è dotata di specificità
- non è dotata di memoria immunologica

Le principali componenti dell'immunità innata sono:

- Barriere fisico-chimiche/meccaniche (cute, muco, ciglia, starnuto, colpo di tosse etc...)
- Proteine del sistema del complemento
- Cellule: -Granulociti polimorfonucleati (neutrofili, eosinofili, basofili)
 - Monociti
 - Macrofagi
 - Cellule dendritiche (DCs)
 - Cellule natural killer (NK)
 - Cellule NKT
 - Linfociti $T\gamma/\delta$
- Citochine

Non appena il patogeno riesce a superare le barriere chimico-fisiche, ha inizio l'attivazione della componente innata del sistema immunitario che prevede, come primo step il riconoscimento delle molecole associate al patogeno di diversa natura , i PAMP ("Pathogen Associated Molecular

Patterns”) con i recettori di membrana, PRRs Pattern Recognition Receptors (di membrana o citoplasmatici) associati a macrofagi, monociti, cellule dendritiche, neutrofili, cellule epiteliali, ma anche a cellule del sistema immunitario adattativo. Questo riconoscimento tra PAMPs e PRRs determina l’innescio della risposta immunitaria innata.

In questo lasso di tempo avviene la produzione di elementi umorali e l’attivazione di elementi cellulari:

Elementi umorali:

- **Defensine:** molecole con attività battericida, promotori della fagocitosi e del reclutamento dei linfociti Thelper (LTh), linfociti T citotossici (LTc), Cellule Dendritiche (DCs) e monociti. La loro secrezione avviene non appena il patogeno si lega e viene riconosciuto dalla componente cellulare (macrofagi, cellule epiteliali, neutrofili (Borghetti P. “Principi di immunologia nella specie suina” Cap. 5 in Martelli et al. 2013 Casa editrice Point Veterinarie Italie)
- **Catelecidine:** molecole con attività tossica diretta, espresse da neutrofili e da cellule delle mucose gastrointestinale e respiratoria e della cute.
- **Interferoni di tipo I (IFN- α IFN- β):** molecole fornite di attività antivirale diretta, aumentano la citotossicità delle cellule NK e l’espressione di molecole di MHC I sulla superficie delle cellule infette per poter essere riconosciute dai linfociti LTc CD8+ inoltre conferiscono uno stato antivirale alle cellule limitrofe.
- **Elementi del complemento:** non appena la frazione C3b del complemento lega il virus vengono promosse opsonizzazione e fagocitosi di quest’ultimo.

Elementi cellulari:

- **Fagociti:** le funzioni principali sono l’internalizzazione, l’uccisione e presentazione del patogeno. Neutrofili e macrofagi inoltre rispondono producendo citochine che promuovono l’infiammazione e stimolano le funzioni antimicrobiche delle cellule tissutali (Borghetti P. “Principi di immunologia nella specie suina” Cap. 5 in Martelli et al. 2013 Casa editrice Point Veterinarie Italie) Nello specifico i macrofagi sono noti per essere cellule altamente plastiche, che possono rispondere a sottili cambiamenti del microambiente, iniziando diversi programmi di attivazione che possono avvenire secondo due principali tipi di programmi:

M1 (ad attivazione infiammatoria classica), i cui stimoli attivatori sono molecole batteriche (LPS) e citochine infiammatorie (es. IFN- γ);

M2 (ad attivazione alternativa) i cui stimoli attivatori sono citochine anti-infiammatorie (es. IL-4 e IL-10, TGF- β) immunocomplessi o glucocorticoidi. La risposta infiammatoria iniziale attiva la polarizzazione M1 dei macrofagi, che diventano capaci di eliminare i microorganismi invasori e promuovono la risposta infiammatoria, mentre durante la fase di risoluzione dell'infiammazione i macrofagi vengono ripolarizzati in direzione M2, perdendo la reattività agli stimoli infiammatori e assumendo la capacità di eliminare cellule e tessuti danneggiati, e di promuovere angiogenesi e rimodellamento tissutale.

- NK: sono presenti nel sangue e nei tessuti linfoidei, vengono stimulate da varie citochine tra cui IL-12, IL-15, IL-18 e IFN I α e β prodotte da macrofagi e DCs per promuovere la produzione di IFN- γ e l'aumento della sua attività citotossica mediata da perforine e granzimi.
- Linfociti T γ/δ : noti anche come null cells o doppie negative poiché non possiedono sulla superficie né CD4 né CD8. Svolgono un'attività apoptotica attraverso il ligando FAS sulla superficie cellulare, hanno attività citotossica mediata dal rilascio di perforina e granzimi, producono citochine immunomodulatorie coinvolte nell'immunità contro i virus (TNF- α , IFN- γ), contro batteri extracellulari (IL-17), contro parassiti (IL-4, IL-5, IL-13) inoltre svolgono un ruolo down-regolatorio attraverso la produzione di citochine immunosoppressive (TGF- β , IL-10). (Bonneville et al. 2010; Abbas et al., 2012). Sono inoltre importanti fonti precoci di IFN- γ che va ad agire su macrofagi e NK (Martelli et al., 2013 capitolo Borghetti).
- Cellule Dendritiche (DC): sono la classe principale di APCs (Antigen Presenting Cells), sono presenti negli epiteli della cute, del tratto gastrointestinale, delle vie aeree e nella maggior parte degli organi parenchimatosi. Le DC vengono distinte in due sottopopolazioni, in base all'espressione di marcatori di superficie e del loro ruolo nella risposta immunitaria.

DC convenzionali dette anche mieloidi costituiscono la maggiore sottopopolazione presente negli organi linfoidei ed hanno una spiccata capacità di stimolare le risposte T. Una volta a contatto con l'antigene, le DC residenti nei tessuti maturano e migrano ai linfonodi drenanti, dove danno inizio alle risposte dei linfociti T.

DC plasmacitoidi assomigliano morfologicamente alle plasmacellule e acquisiscono la morfologia e la funzione tipiche delle DC solo dopo l'attivazione. Sono presenti nel sangue e negli organi linfoidei in numero limitato. La loro funzione principale è la produzione e secrezione di grandi quantità di IFN di tipo I in risposta ad infezioni virali. (Abbas et al. 2012)

L'immunità innata non è un meccanismo dissociato dall'immunità adattativa, ma contribuisce a stimolarla e ad influenzarla tramite alcuni mediatori e segnali molecolari che fungono da ponte tra i due tipi di immunità.

1.2.2. Immunità Acquisita o Specifica

Questo secondo tipo di immunità consiste di meccanismi di difesa aumentati in ampiezza e capacità difensiva ad ogni successiva esposizione allo stesso patogeno. Questa immunità si sviluppa e si adatta in risposta all'infezione ma è coordinata sempre con la risposta aspecifica sia per l'attivazione della presentazione antigenica che di distruzione dei patogeni. Quattro sono le caratteristiche principali che caratterizzano questo tipo di immunità:

- Spiccata specificità per molecole diverse
- Memoria immunologica → capacità di rispondere sempre più vigorosamente ad esposizioni successive dello stesso patogeno grazie alla presenza di cellule che hanno acquisito una memoria immunologica specifica
- Attivazione tardiva rispetto all'immunità innata
- Attivazione più duratura nel tempo
- Produzione di Immunoglobuline (Ig) dette anche Anticorpi (Ab)

L'immunità acquisita viene a sua volta suddivisa in immunità umorale la cui funzione è determinata dall'attivazione dei linfociti B, che una volta maturi producono immunoglobuline (IgM, IgG, IgE, IgA) ed immunità cellulo-mediata la cui funzione è determinata dall'attivazione dei linfociti T helper, cellule che attivano, regolano ed indirizzano la risposta tramite la secrezione di citochine mentre i linfociti T citotossici esplicano citotossicità verso le cellule infettate coadiuvando e potenziando l'attività delle cellule NK e la fagocitosi dei macrofagi infiammatori (Borghetti P. "Principi di immunologia nella specie suina" Cap. 5 in Martelli et al. 2013 Casa editrice Point Veterinarie Italie); Abbas et al., 2012).

1.2.2.1. Immunità Umorale

Non appena il patogeno oltrepassa le barriere chimico-fisiche può seguire due diverse vie che portano all'attivazione della risposta umorale:

- 1) Una volta processato dalle cellule presentanti l'antigene (APC: "Antigen Presenting Cells") che sono le cellule dendritiche (DC" Dendritic Cells) nell'attivazione primaria, i Linfociti B (nella cooperazione ("Help") tra Linfociti T helper- Linfociti B e macrofagi attivati nell'attivazione secondaria, il patogeno viene presentato mediante l'MHC di tipo II, al TCR dei linfociti T. Questo riconoscimento porta ad una attivazione dei linfociti T e ad una successiva secrezione di citochine che promuovono al maturazione dei linfociti B a plasmacellule secernenti IgG o IgA o IgE.
- 2) Il patogeno, attraverso la via ematica o linfatica, può presentarsi direttamente ai linfociti B così com'è legandosi al BCR, determinando la proliferazione e la maturazione dei linfociti B a plasmacellule secernenti IgM.

Quindi le Ig prodotte dalle plasmacellule nelle prime fasi della risposta umorale sono della classe IgM, in seguito avviene uno scambio (switch) isotipico in IgG o IgA o IgE specifiche nei confronti dello specifico patogeno. Questo scambio si amplifica in velocità e consistenza all'aumentare del numero di volte a cui l'organismo va incontro al medesimo patogeno. Le tipologie di Ig sono diverse:

IgG: si legano alla superficie del patogeno e se presenti in numero sufficiente possono interagire con la componente C1 del complemento determinando opsonizzazione e fagocitosi del patogeno. Inoltre possono neutralizzare diverse tossine, impediscono ai virus di colonizzare le cellule. Inoltre possono si legare a macrofagi, NK, neutrofili determinando l'ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) Vengono trasmesse, durante la gravidanza attraverso la placenta conferendo al neonato un'immunità passiva durante le prime settimane di vita.

IgM: sono le prime Ig prodotte e secrete al primo contatto con l'antigene, se prodotte in forma monomerica si legano alla membrana del linfocita B naïve (vergine) e fungono da recettore per l'antigene, se invece vengono prodotte in forma pentamerica vengono secrete nell'ambiente extracellulare e svolgono un'importante funzione di opsonizzazione e di attivazione del complemento. Sono le prime Ig secrete in risposta ad una stimolazione dei linfociti B.

IgA: sono la classe anticorpale maggiormente presente nelle secrezioni (saliva, muco, lacrime, colostro e latte) dove impediscono la penetrazione e la colonizzazione dei patogeni. A livello delle mucose si trovano in forma dimerica mentre nel sangue in forma monomerica.

IgE: sono associate alle reazioni allergiche e si ritrovano principalmente a livello delle superfici corporee dove mediano fenomeni di ipersensibilità di tipo I; il loro legame con i recettori dei mastociti provoca infatti la massiccia liberazione di mediatori dell'infiammazione, prima tra tutti l'istamina. Le IgE sono estremamente importanti anche nella protezione contro le infezioni parassitarie che coinvolgono Th2 e la produzione di IL-4 che promuove un'ulteriore produzione di IgE.

IgD: si ritrovano soltanto sulla superficie dei linfociti B immaturi, assieme alle IgM, ed hanno come unica funzione quella di attivare i linfociti B e di promuovere la loro maturazione verso lo stadio di plasmacellule quando vengono a contatto con l'antigene. (Borghetti P. "Principi di immunologia nella specie suina" Cap. 5 in Martelli et al. 2013 Casa editrice Point Veterinarie Italie)

Le Ig svolgono diversi ruoli funzionali:

Gli *anticorpi neutralizzanti* agiscono legando l'antigene e bloccandone l'attività. È il classico caso dell'anticorpo che si lega ad un antigene virale impedendone così il legame con la cellula bersaglio. Oppure il caso di anticorpi che legano tossine batteriche impedendone l'azione.

Gli *anticorpi opsonizzanti* con la loro presenza ricoprono la superficie del batterio o del virus favorendone la fagocitosi da parte dei macrofagi o di altre cellule specializzate. Questa attività richiede da parte dei fagociti la presenza di recettori specializzati capaci di legare diverse classi di immunoglobuline riconoscendone il dominio Fc (frammento cristallizzabile dell'anticorpo), questi recettori prendono il nome di recettori per l'Fc delle immunoglobuline.

Gli *anticorpi fissanti il complemento* hanno la proprietà di innescare la cascata del complemento attraverso la componente C1q, una glicoproteina esamerica. Questa proteina plasmatica riconosce il frammento FC e lega gli anticorpi a loro volta legati alla superficie dei microrganismi. Quando C1q si lega ad almeno 2-3 immunoglobuline oppure ad una IgM pentamerica, si induce una modifica nella struttura delle immunoglobuline che viene ad attivare le sub unità C1r e C1s. Questa attivazione a sua volta induce la lisi dell'agente patogeno (Swanson CL. et al., 2013).

1.2.2.2. Immunità Cellulo-mediata

Nell'immunità cellulo-mediata, il ruolo principale di difesa nei confronti del patogeno è svolto dai linfociti T i quali vengono suddivisi in tre principali popolazioni linfocitarie:

- Linfociti T helper (Th CD4+)
- Linfociti T citotossici (Tct CD8+)
- Linfociti T regolatori/soppressori (Treg CD4+CD25+FoxP3+)

Linfociti T helper:

- Reclutano popolazioni linfocitarie
- Attivano i leucociti reclutati
- Amplificano la risposta
- Attivando il declino della risposta immunitaria (Abbas et al., 2012)

Sono localizzati a livello degli organi linfoidi secondari (linfonodi, milza, MALT). Per poter svolgere la loro azione regolatoria devono riconoscere lo specifico patogeno e ciò avviene grazie alla sua presentazione, mediante molecole di MHC II (sulle APCs), al corrispondente specifico TCR sul linfocita Th. A loro volta i linfociti T helper si suddividono in tre principali sottopopolazioni Th 1, Th 2, Th 17 e si sviluppano tutti a partire da linfociti T CD4+ naïve in risposta a specifiche citochine presenti durante le fasi precoci della risposta immunitaria

Sottopopolazione Linfocita Th	Stimoli differenziativi	Citochine prodotte	Funzioni (post-attivazione)
Th 1	IL-12, IL-18, IFN-I prodotte da APCs (DCs e macrofagi) <u>in risposta a</u> patogeni intracellulari o antigeni proteici	IFN-γ IL-12 TNF Chemochine IL-10	- Attivazione macrofagica - Attivazione linfociti B + switch - Differenziamento Th 1 e inibizione Th 2 e Th 17
Th 2	IL-4 prodotta da mastociti, basofili e eosinofili <u>in risposta ad</u> infezioni elmintiche ed allergeni	IL-4 IL-5 IL-10 IL-13	- Attivazione linfociti B + produzione di IgE e IgA - Differenziamento in Th 2 - Inibizione dello sviluppo di Th 1 e Th 17
Th 17	IL-6, IL-1 e IL-23 prodotte da DCs <u>in</u> <u>risposta a</u> infezioni fungine e batteri	IL-17 IL-22	- Reclutamento leucocitario (soprattutto neutrofili) - Stimola la produzione di sostanze antimicrobiche

Tabella. 2: rappresentazione delle principali sottopopolazioni linfocitarie T helper

La citochina che caratterizza i linfociti Th 1 è l'IFN- γ e la sua secrezione è stimolata dalla presenza di IL-12 (secreta da macrofagi e DCs attivati). Questa citochina inoltre non viene secreta esclusivamente dai linfociti T attivati ma anche ad opera delle cellule NK e va ad interferire sulla replicazione virale. (Abbas et al., 2012).

IL-12 e IFN- γ possono essere ritenuti degli “immuno-indicatori” (“markers”) sottolineando una predominanza della risposta cellulo-mediata.

Linfociti T citotossici (Tct): linfociti T effettori che una volta attivati, eliminano i microrganismi intracellulari andando principalmente ad eliminare le cellule infette, quindi con un'azione di eliminazione diretta. Come i Th 1, secernono IFN- γ contribuendo all'azione dei macrofagi. Il raggiungimento dell'eliminazione prevede alcuni steps comuni all'attivazione del linfocita Th 1:

- 1) Stimolazione da parte dell'antigene presentato su MHC I della cellula bersaglio;
- 2) Espansione clonale;
- 3) Differenziazione;
- 4) Uccisione delle cellule bersaglio mediante granuli contenenti proteine citotossiche.

Il ruolo dei Tct nelle infezioni da microrganismi intracellulari è importante per eradicare il serbatoio dell'infezione sia quando il patogeno sopravvive e si replica nella cellula bersaglio, sia quando il microrganismo fagocitato riesce a fuoriuscire dal fagosoma e a sopravvivere nel citoplasma.

La stimolazione non avviene solo mediante l'interazione dell'MHC I della cellula infetta con il TCR del Tct ma sono necessari anche dei legami co-stimolatori mediati dal CD8 e da molecole di adesione come ICAM-1. Tali interazioni portano all'attivazione funzionale e seguente espansione clonale di Tct "maturi" che possono così riconoscere selettivamente lo specifico patogeno presentato dalla cellula infetta. Il principale meccanismo attraverso il quale i Tct eliminano la cellula bersaglio è il rilascio di proteine citotossiche contenute nei loro granuli citoplasmatici (lisosomi secretori). Il riconoscimento della cellula bersaglio con il Tct porta ad un avvicinamento dei granuli citoplasmatici verso la membrana, nel punto della sinapsi immunologica, segue una fusione tra la membrana del Tct e le membrane dei granuli che porta alla fuoriuscita delle proteine citotossiche.

Le proteine citotossiche (presenti anche nelle cellule NK) comprendono granzimi, perforina e serglicina.

- Granzimi: A, B e C svolgono il ruolo di proteasi;
- Perforina: molecola omologa alla frazione C9 del complemento, in grado di alterare la struttura della membrana cellulare andando a creare pori attraverso i quali entrerebbero i granzimi;
- Serglicina: molecola che ha il ruolo di facilitare l'ingrasso dei granzimi nel citoplasma della cell bersaglio.

I granzimi una volta entrati inducono apoptosi mediante meccanismi caspasi-dipendenti.

In aggiunta esiste un secondo meccanismo per indurre la morte della cellula infetta che prevede l'interazione tra la proteina FasL (ligando di Fas) sul Tct e il suo recettore Fas sulla cellula bersaglio; questa interazione causa l'attivazione delle caspasi e dunque dell'apoptosi.

Linfociti T regolatori/soppressori: i linfociti T regolatori sono una sottopopolazione dei linfociti CD4⁺ deputati al controllo e allo spegnimento della risposta immunitaria, una volta avvenuta la clearance del patogeno e di mantenere la tolleranza al self. La sottopopolazione dei T regolatori può ulteriormente essere suddivisa in: Treg PRRSV-indotti (CD4⁺CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺), Treg naturali (CD4⁺CD8⁻

CD25+FoxP3+) ed in una sottopopolazione non ancora nominata (CD4-CD8+CD25+FoxP3+) (Silva-Campa et al., 2012) Poiché IL-2 è un importante fattore di crescita per questa sottopopolazione linfocitaria, la maggior parte di queste cellule esprime elevati livelli di della catena α (CD25) del recettore di IL-2.

FoxP3, un fattore trascrizionale, svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella funzione di questa sottopopolazione. Sia CD25 sia FoxP3 sono essenziali per la generazione, il mantenimento e la funzione di queste cellule. I meccanismi d'azione dei linfociti T regolatori sono di due tipi:

- 1) Produzione di IL-10 e TGF- β , citochine in grado di inibire la risposta immunitaria
- 2) Inibizione dell'attività stimolatoria delle APCs, tramite il blocco o l'internalizzazione di B7, molecola espressa sulle APCs, determinandone una riduzione della capacità co-stimolatoria.

Infine c'è un'ultima sottopopolazione, i linfociti a TCR γ/δ , presenti fin da età precoce in elevate percentuali nel sangue (fini al 30-40 %) ma si possono ritrovare anche a livello periferico, in cute, epiteli intestinali, esofago trachea, vescica e ghiandola mammaria. Questi linfociti sono presenti a livello extra-timico (sangue e parete intestinale) nell'ultima fase della gravidanza e già pochi giorni dopo la nascita sono a livelli percentuali significativi rispetto ai linfociti T helper (LTh) e ai linfociti T citotossici (Tct) (Borghetti P. "Principi di immunologia nella specie suina" Cap. 5 in Martelli et al. 2013 Casa editrice Point Veterinarie Italie)

Tutti questi processi della risposta immunitaria inoltre portano alla produzione di una specifica sottopopolazione composta da cellule della memoria a lunga sopravvivenza. Queste cellule saranno più efficaci dei linfociti naïve nel combattere l'infezione, poiché costituiscono una popolazione di linfociti (sia T che B) che, una volta incontrato l'antigene alla prima esposizione, sopravvivono e sviluppano una memoria specifica nei suoi confronti. Ad esposizioni successive allo stesso patogeno le cellule della memoria risponderanno in tempi sempre più brevi e più efficacemente.

1.2.3. Risposta immunitaria nei confronti di PRRSV

Non appena PRRSV supera le barriere chimico-fisiche va a replicarsi nei macrofagi permissivi nella sede di entrata, diffondendosi poi rapidamente nel tessuto linfoide e nei polmoni. La massiva replicazione delle particelle virali in queste cellule, che riduce di oltre il 40% il numero totale di cellule fagocitanti, è causa di immunosoppressione e aumentata incidenza ad infezioni secondarie.

La viremia si realizza entro le 12-24 ore post-infezione (P.I.) raggiungendo il picco di massimo titolo a 7-14 giorni P.I. per poi non essere più rintracciabile nel sangue a 28-35 giorni P.I. (Borghetti P. et al., 2011; Martelli et al., 2013)

Lo sviluppo dell'immunità protettiva nei confronti del virus della PRRS si sviluppa molto lentamente (un paio di mesi), soprattutto se paragonato con quanto si realizza in corso di altre infezioni. La suscettibilità all'infezione decresce con l'età, cosicché le scrofe appaiono meno suscettibili agli effetti del virus rispetto ai giovani animali anche se nei soggetti adulti la durata della protezione sembra essere minore. (Martelli et al., 2013)

La risposta innata a PRRSV

La più efficace risposta immunitaria innata nei confronti di un virus è la produzione di IFN I (IFN- α e IFN- β) molecole promotrici dello stato antivirale (Baum e Garcia-Sastre, 2010).

Esistono due principali tipi di cellule che potenzialmente mediano la risposta IFN-I nei confronti di PRRSV, macrofagi e pDCs, entrambi attori principali che fungono da ponte tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa. I macrofagi e principalmente i PAM sono le cellule target per la replicazione di PRRSV.

Tra i 2 e i 4 giorni post inoculazione di PRRSV per via respiratoria, l'infezione diventa sistemica, risultando in una viremia (Borghetti P. et al., 2011) che persiste per 21 o più giorni. Successivamente a questo periodo PRRSV può essere rilevato nei tessuti linfoidi secondari per diversi mesi (Borghetti P. et al., 2011).

Purtroppo la produzione di IFN- α nei polmoni di suini infetti da PRRSV risulta scarsa o nulla, rispetto alla produzione determinata da altri tipi di virus (PRCV, SIV) (Buddaert et al., 1998; Jung et al., 2009; Van Reeth et al., 1999). La limitata risposta innata, intesa come produzione di IFN I potrebbe essere causata o da un'attività di bloccaggio della produzione stessa di IFN I o da una rapida distruzione dei PAM, attività ben nota nei polmoni dei suini infetti. (Weesendorp et al., 2013).

La produzione di IFN I da parte delle pDCs in risposta a PRRSV, è stata descritta come moderata (Baumann et al., 2013) o trascurabile (Calzada-Nova et al., 2010) se paragonata alla risposta nei confronti di altri virus che stimolano invece una forte risposta in termini di IFN I.

Si ritiene che l'inadeguata (scarsa) attivazione delle pDCs, mediata da PRRSV, risulti in una inadeguata attivazione della risposta T citotossica (Swiecki and Colonna, 2010). Ad ogni modo, dato che le pDCs non sono permissive a PRRSV, si ritiene che l'effetto inibitorio che PRRSV ha su questa

popolazione cellulare non sia causato dall'uccisione di queste cellule ma dall'attivazione di un segnale che regola negativamente la secrezione di IFN I sulla superficie cellulare (Calzada-Nova et al., 2011), che potrebbe essere mediato dall'interazione tra i recettori della pDCs e il virus. (Swiecki and Colonna, 2010).

La scarsa stimolazione della risposta innata potrebbe essere una delle cause della deficitaria risposta umorale e cellulo-mediata nei confronti di PRRSV (Borghetti et al., 2011; Murtaugh et al., 2002; Xiao et al., 2004). Perché si attivi un'adeguata immunità acquisita sono necessari un'efficiente immunità innata ed un'efficiente risposta infiammatoria con precoce attivazione cellulare e produzione di citochine. Durante l'infezione da PRRSV la risposta innata è debole sia in termini di liberazione di citochine (Borghetti et al., 2011; Van Reeth et al., 1999; Royae et al., 2004) che per quanto riguarda l'azione citotossica delle cellule NK (Lamontagne et al., 2003).

COORDINAZIONE TRA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA E ACQUISITA DURANTE INFEZIONE DA PRRSV

Durante un'infezione virale è ben nota l'importanza di un efficiente collegamento tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa. (Loving et al., 2015)

L'inadeguata produzione di IFN- α in risposta ad infezione da PRRSV, nell'immunità innata, contribuisce significativamente allo sviluppo di un altrettanto inadeguata attivazione della risposta cellulo-mediata PRRSV specifica. (Meier et al., 2003).

A conferma di ciò, in sperimentazioni, la presenza di IFN- α al momento o dell'esposizione a PRRSV o della vaccinazione ha modificato (positivamente) sia la risposta innata sia quella specifica (Brockmeier et al., 2012; Royae et al., 2004); quindi la presenza di IFN- α nel sangue e nei tessuti degli animali potrebbe essere responsabile delle variazioni individuali che si osservano nella cinetica e nell'intensità della risposta cellulo-mediata in risposta ad infezione o vaccinazione. Royae et al., 2004; Brockmeier et al., 2009, 2012)

La risposta umorale a PRRSV

Dopo esposizione a PRRSV, intorno ai 7-9 giorni P.I. si osserva una forte risposta anticorpale anti-PRRSV, nonostante ciò si ritiene che questa produzione di anticorpi non svolga un ruolo protettivo nei confronti di PRRSV (Labarque et al., 2000; Yoon et al., 1994). Questa precoce produzione di anticorpi non ha infatti attività neutralizzante, al contrario si ritiene abbia un effetto negativo, noto come ADE

(Antibody-Dependent Enhancement) che contribuirebbe ad aumentare la patologia facilitando la replicazione virale a livello alveolare.

Le IgM si possono riscontrare nel siero già a partire da 5-7 giorni P.I., con un picco a 14 giorni, che si attenua gradatamente fino a scomparire al 42° giorno.

A 7-10 giorni P.I. si possono riscontrare IgG con un picco tra i 14 e i 21 giorni, una fase di persistenza fino a 28 giorni e un successivo decremento fino a 40 giorni P.I. La precoce produzione di questi anticorpi è diretta contro le proteine N, M e GP5. (Loemba et al., 1996)

Per quanto riguarda gli anticorpi sieroneutralizzanti l'andamento risulta ritardato rispetto al momento dell'infezione, intorno a 4 settimane P.I., non prima. Osorio et al., hanno osservato che il trasferimento di anticorpi sieroneutralizzanti PRRSV specifici con specifici titoli, possono da soli sia pienamente prevenire l'infezione transplacentare in scrofe gravide sia prevenire l'infezione in femmine gravide. (Osorio et al., 2002). Ad ogni modo si ritiene che la presenza di anticorpi sieroneutralizzanti nel siero coincida con l'eliminazione del virus. (Lopez et al., 2004) anche alcuni studi dimostrano che la viremia e la replicazione virale possono persistere anche in presenza degli anticorpi sieroneutralizzanti (Rossow KD. 1998; Lopez OJ et al., 2007) e che la viremia può essere risolta prima della comparsa di questi anticorpi (Nelson EA et al 1994; Vezina SA et al 1996; Mateu E et al., 2008).

La risposta cellulo-mediata a PRRSV:

Le cellule T svolgono un ruolo critico in vari aspetti dell'immunità nei confronti di PRRSV a causa della loro centrale attività nello sviluppo e regolazione della risposta immunitaria antigene-specifica, andando a determinare:

- Attivazione delle cellule B
- Attivazione delle cellule citotossiche
- Regolazione del processo infiammatorio e di reazioni autoimmuni (Loving et al., 2015)

Nel suino le sottopopolazioni T linfocitarie sono caratterizzate dai Cluster of Differentiation (CD), (markers fenotipici come) CD3, CD4, CD8 e dalla secrezione di interferon-gamma (IFN- γ).

Nel suino è stata osservata una particolare sottopopolazione linfocitaria, i linfociti doppio positivi CD4/CD8 che rappresentano le cellule T memoria (Zuckermann FA, Husmann RJ. 1996). Queste cellule hanno la capacità di produrre IFN- γ e si posizionano nei siti dell'infiammazione, suggerendo un ruolo protettivo (Zuckermann FA 1999). Per quanto riguarda l'andamento di queste sottopopolazioni si osserva, in corso di infezione da PRRSV, un decremento delle cellule CD4+ nel sangue a 3-7 giorni

P.I., con un ritorno a livelli normali tra i 7 e i 14 giorni P.I. (Martelli et al., 2007; Loving et al., 2015) e un incremento delle cellule CD8⁺ tra le 4 e le 5 settimane P.I. (Martelli et al., 2007; Dwiwedi et al., 2012; Shimizu et al., 1996). Le cellule CD8⁺ aumentano anche nei polmoni infettati, contrariamente alle CD4⁺ che sono scarse (Tingstedt JE., Nielsen J. 2004). L'aumento di CD8⁺ e CD4⁺/CD8⁺ è riscontrabile anche nei tessuti linfoidei. Inoltre la risposta cellulo-mediata all'infezione da PRRSV induce l'attivazione di un'altra sottopopolazione linfocitaria, i T γ/δ . La proliferazione linfocitaria antigene-specifica si può osservare a 4 settimane P.I., con un picco a 7 ed un successivo declino dopo le 11 settimane P.I. (Loving et al., 2015) Per seguire nel tempo l'evoluzione della risposta T PRRSV-specifica ci si avvale della tecnica ELISpot che da una misura del numero di cellule secernenti IFN- γ PRRSV (NK, Th e/o T_{cit}) (Loving et al., 2015). Inoltre, durante l'infezione da PRRSV la secrezione di IFN- γ è stata utilizzata come indicatore dello switch nei confronti di una risposta Th 1, al fine di realizzare trattamenti che potessero potenziarne l'attività antivirale (Meier et al., 2004). Ad ogni modo la secrezione di IFN- γ non è chiaramente definibile poiché diverse sottopopolazioni linfocitarie sono in grado di produrlo e secernerlo. Ad ogni modo la secrezione di questa citochina è un evento fondamentale per l'efficacia di una risposta immunitaria efficace (sia innata sia specifica) nei confronti di PRRSV e di altre infezioni virali. (P. Borghetti et al., 2011)

A 35 giorni post vaccinazione (P.V.) da Ferrari e colleghi è stata osservata una bassa risposta di cellule T CD8⁺ PRRSV specifiche secernenti IFN- γ le quali sono state correlate con un'attivazione della risposta T citotossica (LTc) ed inoltre l'attivazione della risposta è stata influenzata dal tipo di isolato e non dalla via di somministrazione utilizzata. (Ferrari et al., 2013)

La proliferazione dei Tct memoria è stata osservata a 14 giorni P.I. ma l'attività non è stata rintracciabile sino al giorno 49 P.I. (Costers et al., 2009). Ad ogni modo, in altri studi, la presenza prolungata di PRRSV è stata associata ad elevati livelli di cellule T CD8⁺ in linfonodi mesenchimali, tonsille e successivamente nel sangue e nella milza (Lamontagne et al., 2003).

L'infezione da PRRSV aumenta la frequenza di un'altra sottopopolazione linfocitaria, i linfociti T regolatori (Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) che producono citochine antinfiammatorie come TGF- β e IL-10 (Silva-Campa et al., 2012). L'infezione di DCs con il tipo 1 (EU) causa la secrezione di IL-10 (Silva-Campa et al., 2010) mentre il tipo 2 (NA) promuove la secrezione di TGF- β (Silva-Campa et al., 2009) mentre l'infezione di monociti di derivazione dendritica, con entrambi i ceppi, non causa l'incremento della frequenza dei linfociti Treg in vitro (Rodriguez-Gomez et al., 2015).

Silva-Campa e colleghi in un loro studio hanno dimostrato che PRRSV induce un aumento della percentuale di linfociti Treg CD4+CD8+CD5+FoxP3+ intorno ai 14 giorni P.I., aumento correlato con i livelli viremici (Silva-Campa et al., 2012). Inoltre questa sottopopolazione linfocitaria secerne elevate quantità di una citochina antinfiammatoria quale TNF- β (Silva-Campa et al., 2012) promuovendo un abbassamento dell'attività immunitaria

Per quanto riguarda le PBMC si ritiene che l'attivazione dei Treg causi la soppressione della loro proliferazione. (Loving et al., 2015).

Alcune proteine non strutturali (Nsp) di PRRSV (nsp1, nsp2, nsp11 e N) che svolgono diverse funzioni durante la replicazione virale sono state trovate essere antagoniste dell'induzione di IFN:

- Nsp1, una volta clivata in nsp1a e nsp1b inibisce fortemente l'espressione di IFN- β e sia la fosforilazione sia la traslocazione di IRF3 (dsRNA-induced) (Butler et al., 2014) anche se Kim et al non ha riscontrato la stessa inibizione (Kim et al., 2010).

- Nsp2, inibisce l'induzione di IFN bloccando IRF3 ed inibisce l'attività antivirale di ISG15 (IFN-stimulated genes) (Sun Z. et al., 2010)

- Nsp11, è una endonucleasi, antagonista di IFN. (Beura LK. 2010)

- N, inibisce l'induzione di IFN β interferendo anch'essa con IRF3.

Oltre a queste quattro proteine anche nsp7, nsp12 e GP3 pare siano coinvolte con l'inibizione di IFN (Wang R. et al., 2013) ma ancora poco si sa a riguardo. PRRSV interferisce negativamente non solo sull'attivazione di IFN ma anche su fattori di trascrizione andando ad inibire vie di trasduzione del segnale (JAK/STAT e NF- κ B) compromettendo così il corretto sviluppo delle cellule T (Patel D. et al 2010; Wang R. et al., 2013)

PRRSV per eludere la risposta immunitaria, all'interno del timo, può causare linfopenia riscontrabile poco dopo l'inizio dell'infezione, atrofia timica e linfopenopatia accompagnata da una perdita di cellule T immature nel timo. Proprio a causa di questi effetti, si ritiene che venga meno lo sviluppo di un'immunità adattativa PRRSV-specifica protettiva (Butler et al., 2014). Inoltre studi hanno riportato il negativo impatto che ha PRRSV sulle cellule timiche determinando una perdita di linfociti T CD4CD8 (doppio positivi) (Feng et al., 2001). Le APCs infettate da PRRSV interagiscono nel timo di feti o neonati con i timociti determinando, come detto in precedenza, una alterata produzione di citochine (IFN) e fattori di trascrizione (JAK/STAT, NF- κ B); nonostante ciò l'effetto soppressivo sulle DCs si pensa sia dipendente dallo specifico ceppo infettante. Infine la presentazione di PRRSV nel timo potrebbe indurre tolleranza, intesa come perdita di cellule naïve che potrebbero riconoscere il virus

determinando uno switch nei confronti della sottopopolazione T_{reg} (Silva-Campa et al., 2012). E' necessario ottenere ulteriori informazioni per promuovere una maggiore chiarezza sul ruolo di questa sottopopolazione in presenza di PRRSV.

In conclusione, PRRSV determinando una inibizione della risposta immunitaria innata, altera la corretta attivazione e funzionalità di macrofagi e DCs, determina una tardiva e lenta attivazione della risposta immunitaria cellulo-mediata. Si ritiene inoltre che l'andamento della risposta immunitaria è dipendente dallo specifico ceppo PRRS, dall'età e dallo stato sanitario degli animali.

1.2.4. Diagnosi

A causa della compatibilità della sintomatologia con altre infezioni, è importante sospettare di PRRS ogni volta che si presentino alterazione dei parametri riproduttivi, malattia respiratoria e mortalità neonatale soprattutto pre-svezzamento. La diagnosi può essere di campo o di laboratorio (di tipo virologico, biomolecolare e sierologico).

1.2.4.1. Diagnosi di campo

E' possibile tentare una diagnosi di PRRS in campo, basandosi sulle manifestazioni cliniche tra cui problemi respiratori in animali da dallo svezzamento alla fase di ingrasso, problemi a carico della sfera riproduttiva delle scrofe e dei verri dimagrimento, letargia, febbre, aborti. (Zimmerman et al., 2012). Dall'esame anatomo-patologico, dissezionata la cavità toracica e addominale è possibile apprezzare un'iperplasia dei linfonodi superficiali e tracheo-bronchiali mentre a carico dell'apparato respiratorio si riscontra una polmonite interstiziale. (Zimmerman et al., 2012)

Poichè diversi agenti patogeni possono causare questo tipo di sintomatologia sono necessarie analisi di laboratorio per poter confermare con certezza l'infezione da PRRSV.

1.2.4.2. Diagnosi di laboratorio

1.2.4.2.1. Virologica

L'isolamento virale viene eseguito su PAMs poichè maggiormente sensibili a PRRSV e perché sono una coltura primaria; un'alternativa sono le MARC-145. Poiché alcuni ceppi del genotipo EU mostrano difficoltà a replicare sulle MARC-145, vengono utilizzati entrambi i tipi di cellule per l'isolamento (Dewey et al., 2000; Yoon et al., 2003).

L'effetto citopatico viene riscontrato dopo 3-5 giorni d'incubazione sui PAMs ma a volte sono necessari passaggi successivi, in particolare quando vengono utilizzate le MARC-145. Per confermare l'isolamento del virus sulle linee cellulari si può fare affidamento a tecniche complementari come l'IFD (immunofluorescenza diretta) o l'IPMA o mediante la RT-PCR nel secondo o terzo passaggio.

Gli organi favoriti per l'isolamento virale sono siero, omogenati di polmoni, linfonodi e tonsille raccolti tra i 4 ed i 28 giorni P.I.; lo stesso reperimento vale in caso di parto precoce, ma solo da soggetti nati vivi, poiché nei soggetti nati morti o mummificati i processi autolitici diminuiscono la sopravvivenza virale. Per le infezioni persistenti invece i campioni migliori sono dati da tonsille, linfonodi e raschiati faringei piuttosto che da siero e polmoni (Zimmerman et al., 2012).

Per quanto riguarda lo sperma: a causa della citossicità del seme, la ricerca di PRRSV va eseguita soltanto mediante Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) o prova biologica su suino recettivo (Mengeling et al., 2000).

Tra le altre diagnosi virologiche è possibile utilizzare, per la ricerca degli antigeni virali e partendo da tessuti congelati, l'IFD (immunofluorescenza diretta) e l'IHC (immunoistochimica). L'IHC è più sensibile e ha il grande vantaggio di poter essere effettuata su tessuti fissati in formalina. Gli aspetti negativi di questa tecnica sono il costo e la tempistica (Yoon et al., 2003)

1.2.4.2.2. Biomolecolare

La RT-PCR, RT-PCR Real Time quantitativa e la Nested PCR sono tecniche utilizzate per ricercare l'acido nucleico virale in omogenati tissutali, siero, seme, raschiati orofaringei, liquidi di lavaggio polmonare (BALF), tamponi, saliva e altre matrici. I vantaggi offerti dalla RT-PCR rispetto all'isolamento virale, IHC e IF sono dati da:

1. sensibilità e specificità più alte;
2. maggiore probabilità di identificare infezioni persistenti con basso livello di concentrazione virale;
3. ritrovamento di RNA virale in tessuti autolitici o tossici per le colture cellulari, come seme e feci;
4. tempi di risposta rapidi, con risultati ottenibili in 1-3 giorni;
5. effettuare il sequenziamento del genoma virale e quindi.

Il lato negativo di questa tecnica è la mancata discriminazione tra ceppo di campo e ceppo vaccinale.

Le prestazioni dei test possono variare da un laboratorio a un altro in funzione della tipologia di PCR e della tecnica utilizzata per amplificare e ricercare il genoma virale. E' importante prestare particolare attenzione al disegno dei primers e al frammento di RNA da rilevare, per la grande variabilità che

questo virus presenta. Gli ORF 6 e 7 sono i più indicati per fare la diagnosi perché sono i più conservati contrariamente alla ORF 5. Secondo quanto riportato in letteratura, l'RNA di PRRSV è rintracciabile fino a 86 giorni P.I. nei linfonodi, 92 giorni nel siero, 105 giorni nei raschiati dell'orofaringe, 251 giorni negli omogeneizzati di siero e tonsille (Zimmerman et al., 2012).

1.2.4.2.3. Sierologica

Le tecniche per il rilevamento degli anticorpi contro il PRRSV sono IFA, SVN, IPMA, ELISA. (Zimmerman et al., 2012) generalmente i primi tre vengono utilizzati per confermare i risultati positivi provenienti dal test ELISA (Martelli et al., 2013). I risultati provenienti dall'utilizzo di queste metodiche hanno dimostrato che le loro prestazioni dipendono da:

- A) Tecnica scelta
- B) Antigene utilizzato nel test
- C) Stadio d'infezione
- D) Origine degli anticorpi (Nodelijk G., 2002)

-La tecnica IFA (immunofluorescenza) è una tecnica ad alta specificità. Può rilevare IgM e IgG PRRSV specifiche rispettivamente da 5 e da 9-14 giorni, con una persistenza per 21-28 e 30-50 giorni sino a 3-5 mesi P.I. Tra gli aspetti negativi c'è l'interpretazione dei risultati che risulta in parte soggettiva e i valori possono variare tra i laboratori, tra gli operatori che eseguono il test ma soprattutto a causa delle differenze antigeniche tra il ceppo virale di campo (che ha indotto la produzione di specifici anticorpi) e il ceppo utilizzato in laboratorio. La sensibilità può dunque essere un limite di questa tecnica. Questa metodica viene impiegata di solito per confermare un risultato sospetto positivo all'ELISA.

-La SN (sieroneutralizzazione o virus-neutralizzazione) è una tecnica con elevata sensibilità ed ha l'obiettivo di ricercare nel siero gli anticorpi capaci di neutralizzare PRRS, fornendo così una misura plausibile dell'immunità umorale protettiva. Il test è altamente specifico, ma gli anticorpi neutralizzanti non si formano prima di 1-2 mesi P.I. fino ad 1 anno P.I. (Zimmerman et al., 2012).

-La tecnica IPMA (immuno-perossidasi su monostrato) usa come supporto antigenico colture primarie di PAMs o derivati della linea cellulare MA-104 (MARC-145), infette con un virus di referenza; su queste colture previamente fissate si aggiunge il siero campione ed un coniugato anti-suino marcato

con perossidasi. È una tecnica molto specifica, altamente sensibile, laboriosa e a volte complessa da interpretare. Gli anticorpi vengono riscontrati tra i 7 e i 15 giorni fino a 2-3 mesi P.I.

-La tecnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorting Assay) è la più usata nei laboratori diagnostici per il basso costo, le buone caratteristiche analitiche, la facile esecuzione, la possibilità di meccanizzazione e la rapidità di ottenimento dell'esito. La maggior parte degli ELISA commerciali sono rivolti verso la proteina N, perché conservata per entrambi i genotipi EU e NA. Esistono diversi tipi di kit ELISA:

1 competitivi ed indiretti;

2 in grado di distinguere gli anticorpi verso il ceppo EU e US;

3 per differenziare infezioni recenti da precedenti attraverso il rilevamento di anticorpi IgM e IgG.

La presenza di questi anticorpi è determinata dalla valutazione del rapporto tra la reazione del campione in esame e quella del controllo positivo (S/P). Il campione è considerato positivo con cut-off di $S/P \geq 0,40$. Come tutte le metodiche analitiche anche la tecnica ELISA ha dei limiti, presenta falsi positivi e falsi negativi. La percentuale di falsi positivi è intorno all'1-3% dei campioni (Keay et al., 2002). Questo dato è di vitale importanza quando si tratta della valutazione di aziende indenni che possono perdere il loro status per un falso positivo. In questi casi è indispensabile la ripetizione con un'ulteriore analisi come un ELISA di tipo competitivo (Keay et al., 2002; Ferrin et al., 2004), IFI, IPMA e SN al fine di avere una conferma. Si ritiene che ci sia correlazione tra il valore S/P dell'ELISA Idexx e il momento o lo stato dell'infezione: più alto è il valore S/P, più recente è stata l'infezione. Quest'ipotesi è stata rifiutata da Cuartero et al. (2002) che non ha trovato una relazione tra il valore S/P e il momento della viremia in un gruppo di suinetti svezzati durante un focolaio acuto da PRRS. Tanto l'IFI come l'IPMA sono tecniche con buone caratteristiche analitiche, che possono rilevare la sierconversione prima dell'ELISA, sono però laboriose e la loro sensibilità dipende dall'omologia tra il ceppo utilizzato per allestire la prova e il ceppo di campo (Kim et al., 2007).

1.2.5. Misure di profilassi

1.2.5.1. Profilassi indiretta

Il forte impatto economico e la grande diffusione della PRRS sull'industria suinicola in tutti i paesi hanno portato a ricercare vaccini in grado di controllare la patologia. L'obiettivo della vaccinazione è di stimolare una risposta immunitaria proteggente nei confronti delle manifestazioni cliniche della malattia.

Tutt'ora i vaccini non sono ancora in grado di conferire una completa protezione nei confronti di PRRSV poichè inducono una scarsa e ritardata attivazione della risposta cellulo-mediata e anticorpale (sieroneutralizzante) (Meier et al., 2003). L'elevata variabilità genetica che caratterizza questo virus limita l'efficacia dei vaccini (Labarque et al., 2004) anche se è stato dimostrato un certo livello di cross-protezione (Mengeling et al., 2003a - 2003b; Martelli et al., 2007).

VACCINI VIVI ATTENUATI (Modified Live Viruses, MLV)

In commercio sono disponibili i vaccini vivi attenuati sia per il genotipo EU sia NA e la loro efficacia e sicurezza sono state studiate da diversi gruppi di ricerca per poter spiegare la variabilità dei risultati ottenuti con la somministrazione di questo tipo di vaccino. Diversi studi sono stati eseguiti per valutare la funzionalità vaccinale:

- Martelli et al. (2007) hanno dimostrato che un MLV ha protetto contro un'infezione eterologa ed i risultati hanno portato alla luce che sia l'incidenza che il titolo virale si sono ridotti in animali vaccinati rispetto ai non vaccinati.
- Cano et al. (2007) hanno studiato l'effetto di un MLV su una popolazione infetta, successivamente vaccinata e nuovamente infettata con un ceppo eterologo. Le conclusioni di questo lavoro hanno sottolineato che la vaccinazione ha conferito una parziale protezione, riducendo la gravità delle manifestazioni cliniche ed il calo dell'incremento ponderale giornaliero.

I MLV mostrano però effetti negativi:

- Capacità di riacquisizione della virulenza, producendo così viremia, infettando animali non vaccinati (Bøtner et al., 1997);
- Attraversare la barriera placentare ed infettare la progenie (Benfield et al., 1997).

VACCINI SPENTI (INATTIVATI)

Rispetto ai MLV, i vaccini spenti hanno il vantaggio di non riacquisire la virulenza. Lo svantaggio è però una scarsa stimolazione della risposta immunitaria (Nilubol et al., 2004) quindi un basso potere immunogeno. La sieroneutralizzazione, è stata osservata in maiali infetti o che si sono infettati dopo la vaccinazione, contrariamente ad animali non infetti in cui non è stata osservata alcuna produzione di anticorpi sieroneutralizzanti (Nilubol D. et al., 2004).

1.2.5.2. Profilassi diretta

Per quanto riguarda la profilassi diretta è molto importante il concetto di biosicurezza al fine di prevenire l'ingresso in azienda di un ceppo esterno di PRRSV. Con il termine biosicurezza ci si riferisce a quelle misure da applicare per prevenire l'introduzione di malattie in una popolazione di animali indenni o nel caso in cui invece queste malattie fossero presenti, sono le misure che ne limitano la diffusione. (Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Aprile 2009; Lasagna C. 2013). E' di fondamentale importanza che un allevamento negativo acquisti sia animali sia materiale seminale da una fonte certificata come negativa. Il principale obbiettivo è limitare gli effetti del virus nei diversi reparti dell'allevamento seguendo alcune misure:

1. Acclimatamento della rimonta: se eseguito correttamente si può avere successo nell'ottenimento della stabilizzazione dei sintomi clinici, nel miglioramento dei parametri riproduttivi e nella produzione di suinetti PRRS negativi allo svezzamento.
2. Spopolamento parziale: ha l'obiettivo d'interrompere la trasmissione orizzontale del PRRSV per riuscire in questo modo a controllare o eradicare il virus dallo svezzamento.
3. Sistema tutto pieno – tutto vuoto: molto efficace nel controllo di tanti patogeni, compresa la PRRS. (Zimmerman et al., 2012)
4. Vaccinazione (Dee S. et al., 2004):
5. Controlli interni all'azienda: sperma, scarti, morti, disinfezioni, personale, ahi e strumentazione, derattizzazione.

1.3. KP: Killer Peptide

La tossina killer (KT) prodotta dal lievito *Pichia Anomala* è stato dimostrato mediare effetti antimicrobici diretti contro agenti patogeni procarioti e eucarioti, come la *Candida albicans*, *carinii* *Pneumocystis* e *Mycobacterium tuberculosis*, mediante interazione con un recettore KT-specifico (KTR) sulla parete cellulare composta da beta-glucani (Magliani et al, 1997a; Séguy et al, 1998).

Così come si trova in natura, KT non può essere utilizzata a causa della sua instabilità, antigenicità e tossicità. Pertanto, sono stati prodotti, mediante immunizzazione, degli anticorpi monoclonali neutralizzanti KT, capaci di indurre anticorpi anti-idiotipici che rappresentano l'immagine interna del dominio attivo di KT. Questi anticorpi anti-idiotipici sono in grado di legare il KTR (recettore della tossina killer) sulla superficie del patogeno determinando effetti benefici sia in vitro che in vivo. Successivamente, a partire da questo anticorpo anti-idiotipico è stato sintetizzato e ottimizzato un peptide killer (KP) di 10 aminoacidi (AKVTMTCSAS) capace di mediare effetto antimicrobico e immunomodulatorio simile o potenziato rispetto alla KT (Polonelli L. et al., 2003).

Diversi studi hanno dimostrato che KP è in grado di svolgere effetti benefici nei confronti di infezioni causate da funghi, come *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *C. neoformans*, *M. pachydermatis* e virus come il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e il virus dell'influenza umana. Per quanto riguarda le infezioni fungine da *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *C. neoformans* è stato dimostrato che KP gioca un forte effetto candidicida sia in vitro che in vivo, sostenendo la protezione in modelli murini e di ratto contro candidosi sistemica sia in animali immunocompetenti che gravemente immunocompromessi (SCID) (Polonelli L. et al., 2003, Travassos et al., 2004). L'effetto positivo di KP nei confronti di *C. neoformans* pare sia mediato da una maggiore suscettibilità delle cellule fungine rispetto alla stimolazione delle cellule del sistema immunitario (Cenci et al., 2004). Per quanto riguarda gli animali domestici, l'attività KP è stata valutata anche in cani infetti da *Malassezia pachydermatis*, in cui l'effetto benefico è stato osservato sia in vitro che in vivo (Cafarachia et al., 2014).

Precedenti studi condotti in modelli di infezione virale, compreso l'HIV-1 e virus influenzale A, hanno dimostrato che KP può inibire la replicazione determinando un forte down-regulation dei recettori per l'interazione cellula-virus e diminuendo la produzione di proteine virali (Conti et al., 2008). Nei topi, è stato dimostrato che gli effetti immunomodulatori di KP coinvolgevano il legame con cellule dendritiche (DCs) e in secondo luogo con macrofagi mediante molecole tra cui SIGN-R1,

MHC-II, CD16 / CD32; il legame con DCs induce up-regulation dei co-recettori CD8 α , CD80 e CD40, e sostiene la proliferazione dei linfociti CD4⁺ che potrebbe essere il meccanismo cardine nella risposta immunitaria Th1. Tuttavia, KP è stato dimostrato non legarsi significativamente a neutrofili e linfociti T CD4⁺ (Cenci et al., 2006).

A causa della scarsità di dati in letteratura riguardo l'interazione tra il decapeptide KP e le cellule del sistema immunitario, questo lavoro si propone di saggiare l'attività di KP su PBMC suine mediante citofluorimetria valutando se e come questa molecola svolge un'attività immuno-modulatoria nei confronti di alcune delle sottopopolazioni linfocitarie tra cui linfociti T helper (Th), linfociti T citotossici (Tct), linfociti T memoria (T_{memoria}), cellule Natural Killer (NK), linfociti NKT e monociti.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato di valutare la modulazione della risposta immunitaria nella specie suina durante infezione naturale da virus della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) ma anche di studiare l'attività immunomodulatoria in vitro di un decapeptide noto come Peptide Killer a potenziale attività antivirale.

PRRSV è infatti considerato uno dei principali agenti infettivi coinvolti nelle patologie del suino e rappresenta una delle maggiori cause di problemi respiratori in animali di giovane età (lattonzoli e suinetti) con esiti anche letali, e problemi riproduttivi in suini di età adulta, causando un forte impatto economico in campo suinicolo-zootecnico.

Inoltre il periodo dello svezzamento è caratterizzato da una maggiore suscettibilità, da parte dei giovani animali, nei confronti di infezioni secondarie come Circovirus (PCV2), M. Hyopneumoniae, virus dell'influenza suina (SIV), diarrea epidemica suina (PED) e molte altre che vanno ad aggravare ulteriormente il quadro clinico.

Tutta questa serie di eventi negativi vanno quindi ad influire sullo sviluppo, funzionalità e modulazione delle varie componenti del sistema immunitario.

Il primo obiettivo di questo lavoro è quindi stato quello di poter meglio comprendere la modulazione della risposta immunitaria e l'attivazione di specifici "patterns" cellulari in corso di infezione da PRRSV. L'attivazione/modulazione della risposta immunitaria è stata valutata monitorando vari parametri tra cui: titoli anticorpali, numero di cellule secernenti IFN- γ e immunofenotipizzazione di alcune sottopopolazioni linfocitarie.

Il secondo step di questo lavoro ha invece previsto lo studio dell'attività della molecola Killer Peptide (KP), un decapeptide noto per alcune sue proprietà immunostimolatorie/modulatorie e terapeutiche nei confronti di vari patogeni (Cafarchia et al., 2013; Conti et al., 2008).

In considerazione delle scarse informazioni presenti in letteratura sull'attività immunostimolatoria/modulatoria di KP e nello specifico nella specie suina, questa parte del lavoro di tesi ha avuto come obiettivo quello di valutare se e come KP può interagire modulando la risposta immunitaria cellulare nella specie suina. Mediante citofluorimetria, sono state immunofenotipizzate e quantificate le sottopopolazioni linfocitarie e monocitarie partendo da PBMC suine prima stimulate con KP e poi processate al citofluorimetro.

3. MATERIALI e METODI

3.1. Estrazione degli acidi nucleici di PRRSV e di PCV2 da siero

L'estrazione dell'RNA di PRRSV e di DNA di PCV2 costituenti i rispettivi genomi è stata eseguita mediante *TRIZol-LS*[®] con protocollo modificato rispetto a quello indicato dal produttore.

Procedura:

- 1) Centrifugare il campione di sangue intero a 120 xg (circa 600 rpm) per 20 min., per separare il siero dalla parte corpuscolata costituente il coagulo;
- 2) Preparare una provetta contenente 600 µl di *TRIZol-LS*[®] e 180 µl di cloroformio;
- 3) Aggiungere 200 µl di siero;
- 4) Agitare mediante vortex e incubare per 15 min. a temperatura ambiente (T.A.);
- 5) Centrifugare a 12.000 xg per 10 min. a 4°C;
- 6) Trasferire 400 µl della fase incolore contenente l'RNA totale in un'altra provetta;
- 7) Aggiungere 400 µl di isopropanolo;
- 8) Agitare mediante vortex ed incubare per 10 min. a T.A.;
- 9) Centrifugare a 12.000 xg per 8 min. a 4°C ed eliminare il surnatante;
- 10) Aggiungere 500 µl di etanolo 75% e agitare mediante vortex;
- 11) Centrifugare a 12.000 xg per 5 min. a 4°C ed eliminare il surnatante;
- 12) Fare asciugare per 3-5 min. a T.A.;
- 13) Aggiungere H₂O DEPC (contenente dietilpirocarbonato, inibitore delle RNAsi) in base alle dimensioni del pellet (35-45 µl) e risospendere.

3.2. Retrotrascrizione (RT) dell'RNA e PCR del genoma di PRRSV

RETROTRASCRIZIONE

L'ottenimento di una copia di DNA (cDNA: *copy* DNA o *complementary* DNA) da una molecola stampo di RNA necessita l'attività dell'enzima trascrittasi inversa, un enzima DNA polimerasi RNA-dipendente, in grado di formare molecole di cDNA a partire da molecole di RNA, grazie alla presenza di RNA stampo in presenza di dNTP, primers e buffer di reazione.

La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando il kit *Invitrogen superscript II Reverse Transcriptase* (con protocollo modificato rispetto alle istruzioni del produttore).

Procedura:

1) Aggiungere a ciascuna provetta:

- Oligo(dT)12-18 (500 µg/mL)	1 µL
- RNA	5 µL
- dNTPs Mix (10 mM)	1 µL
- Acqua distillata sterile	7,5 µL

2) Porre la Mix di reazione a 65°C per 5 minuti e quindi raffreddare rapidamente in ghiaccio.

In seguito aggiungere:

- 5x First-Strand Buffer	4 µL
- 0,1 M DTT (ditiotreitolo)	1 µL
- RNaseOUT™ (40 units/µL)	0,25 µL

3) Risospendere e incubare a 42°C per 2 minuti;

4) Aggiungere 0,25 µl di SuperScript II RT e risospendere;

5) Incubare a 42°C per 50 minuti;

6) Inattivare la reazione a 70°C per 15 minuti.

PCR (polymerase chain reaction)

La PCR (polymerase chain reaction) è una tecnica di amplificazione degli acidi nucleici che può essere utilizzata per la valutazione della presenza o assenza di una specifica sequenza appartenente ad un patogeno. Il kit utilizzato per la rilevazione del genoma di PRRSV è stato il GoTaq Flexi G2 (Promega).

Reagenti della Mix	Volume (µl) in 25 µl totali
GoTaq Flexi buffer 5x	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTPs 10 mM	2
Primer SHS-PRRSV forward 20 mM 5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3'	1
Primer IZR-PRRSV reverse 20 mM 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACT-3'	1
Polimerasi GoTaq Flexi 5 u/ml	0,2
Betaine (Sigma)	4
H ₂ O DEPC	6,8
cDNA	3
Volume totale	25 µl

Tab. 1: Reagenti e rispettivi volumi per la PCR.

Il profilo termico prevede:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5
Temperatura	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Tempo	5 minuti	30 secondi	30 secondi	30 secondi	10 minuti

Tab. 2: Profilo termico di PCR. Gli step 2-3-4-5 sono ripetuti per 40 cicli.

Le sequenze amplificate sono state analizzate su gel di agarosio al 2% (in TBE) per valutare la presenza delle bande attese (398 bp per PRRSV genotipo europeo e 433 bp per PRRSV genotipo americano).

3.3. Real-time PCR quantitativa (qPCR) per PCV2

La PCR real-time quantitativa è una tecnica di amplificazione degli acidi nucleici che può essere utilizzata per la valutazione della presenza/assenza di una specifica sequenza appartenente ad un patogeno e per la sua quantificazione in termini di numero di copie genomiche.

La master mix utilizzata per la rilevazione e quantificazione di PCV2 è stata la TaqMan Real-Time master mix (Applied Biosystems). I primer utilizzati sono riportati in Olvera et al. (2004).

Reagenti	Volume (µl) in 25 µl totali
H ₂ O DEPC	9,02
2x Master mix	12,5
Primer PCV2 forward (50 mM) seq 5'-CCAGGAGGGCGTTGTGACT-3'	0,45
Primer PCV2 reverse (50 mM) seq 5'-GCTACCGTTGGAGAAGGAA-3'	0,45
Sonda PCV2 (50 mM) seq 5'-ATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT-3'	0,08
Volume finale	22,5

Tab. 3: Reagenti e rispettivi volumi per la qPCR.

Protocollo:

- 1) Preparare le provette per i campioni da analizzare e per i 3 punti della retta standard;
- 2) Preparare la Master mix;
- 3) Dispensare in ogni provetta 22,5 µl di Master mix;
- 4) Aggiungere 2,5 µl di DNA totale;
- 5) Trasferire le provette nel termociclatore;
- 6) Sottoporre i campioni ad amplificazione secondo il ciclo termico previsto:

	Step 1	Step 2	Step 3
Temperatura	95°C	94°C	60°C
Tempo	10 min	15 secondi	60 secondi

Tab. 4: Profilo termico della qPCR. Gli step 2 e 3 sono ripetuti per 45 cicli.

- 7) Lettura e calcolo del titolo di copie del genoma di PCV2.

Si considera positivo un campione che presenta un valore di Ct superiore o uguale a 40. Il titolo di copie di genoma di PCV2 viene calcolato per ml di siero secondo la seguente formula:

Titolo del campione in copie/ μ l x 0,15 (volume di partenza di DNA in ml) x 1000 = N° di copie di DNA genomico per ml di siero

3.4. Isolamento di PBMC (peripheral blood mononuclear cells)

Le PBMC (peripheral blood mononuclear cells) di suini vaccinati contro PRRSV e degli animali controllo negativi sono state isolate mediante separazione per gradiente di densità in soluzione *Histopaque-1077*[®] (Sigma), con un rapporto 1:1 tra volume di sangue periferico in soluzione anticoagulante (litio-eparina) e soluzione *Histopaque-1077*[®].

Procedura:

- 1) Stratificare 4 ml di sangue su 4 ml di *Histopaque-1077*[®];
- 2) Centrifugare per 30 minuti a 400 xg (1800 rpm) per ottenere il gradiente di densità e separare le componenti del sangue;
- 3) Prelevare l'interfase che si presenta come un anello opalescente costituito soprattutto da linfociti e monociti (cellule mononucleate) detto *buffy coat*;
- 4) Eseguire due lavaggi in PBS sterile addizionato con 1% FBS inattivato a 300 xg per 7 min.;
- 5) Dopo aver eliminato il surnatante, risospendere il sedimento cellulare (pellet) in terreno RPMI-1640 completo [FBS (Fetal Bovine Serum) inattivato 7,5%, glutammina 1%, Antibiotici 1%, antimicotici 1%, amminoacidi on essenziali 1%] addizionato di 10% FBS inattivato.
- 6) Per ciascun campione aggiungere 50 μ l di Trypan blue e 50 μ l di sospensione cellulare in una provetta, risospendere, prelevare 10 μ l circa, porli nella camera di Burker;
- 7) Contare il n° di cellule vive e morte in almeno due quadranti, fare la media delle cellule vive, moltiplicare per la diluizione in Trypan blue (x2) e moltiplicare per 1000 (n° di cellule in 1 ml).
- 8) Se si utilizza un contatore di cellule automatico (es. Countess, Biorad), aggiungere 50 μ l di Trypan blue e 50 μ l di sospensione cellulare in una provetta, risospendere, prelevare 10 μ l, porli nell'apposita camera di lettura;
- 9) Inserire la camera nello strumento che leggerà automaticamente il numero di cellule vive rapportandole ad 1 ml, il numero di cellule morte e la percentuale di vitalità.

3.5. Estrazione di RNA totale da PBMC

Le PBMC isolate da sangue periferico sono state utilizzate per estrarre l'RNA totale, e quindi l'mRNA delle citochine di interesse mediante *TRI-Reagent*[®]. Il *TRI-Reagent*[®] è composto da fenolo e guanidina tiocianato in una soluzione monofasica che rapidamente inibisce l'attività delle RNAsi.

Procedura:

- 1) Centrifugare le cellule a 300-400 xg (1600-1800 rpm) per 5 min. in modo da formare un pellet;
- 2) Eliminare il surnatante;
- 3) Aggiungere 500 µl di *TRI-Reagent*[®];
- 4) Agitare mediante vortex e incubare 7 min a T.A.;
- 5) Aggiungere 50 µl di BCP (bromo-cloro-propano) (1/10 rispetto al volume iniziale);
- 6) Agitare mediante vortex e incubare 8 min. a T.A.;
- 7) Centrifugare a 12.000 xg per 12 min. a 4°C;
- 8) Trasferire la fase incolore contenente l'RNA totale in un'altra provetta;
- 9) Aggiungere 250 µl di isopropanolo (1/2 rispetto al volume iniziale);
- 10) Agitare mediante vortex e incubare 8 min. a T.A.;
- 11) Centrifugare a 12.000 xg per 8 min. a 4°C e eliminare il surnatante;
- 12) Aggiungere 500 µl di etanolo 75%;
- 13) Agitare mediante vortex;
- 14) Centrifugare a 12.000 xg per 5 min a 4°C e eliminare il surnatante;
- 15) Fare asciugare 3-5 min a T.A.;
- 16) Aggiungere H₂O DEPC in base alle dimensioni del pellet (35-45 µl) e risospendere;
- 17) Prelevare 5 µl e aggiungerli a 45 µl di H₂O DEPC (1/10);
- 18) Quantificare la concentrazione di RNA mediante spettrofotometro (GENEQUANT-pro[®], Amersham Pharmacia) a 260 nm, determinandone la purezza mediante rapporto 260/280 nm.

3.6. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

L'ELISA è un test rapido che può essere utilizzato per rilevare e quantificare anticorpi contro virus e batteri. Nell'ELISA, la fase solida è costituita da una piastra di polistirene a 96 pozzetti, anche se altri materiali possono essere utilizzati. La funzione della fase solida, a cui è fissato lo specifico antigene, è di legare anticorpi che si trovano nel siero del campione, in modo tale da formare un immuno-complesso antigene-anticorpo sulla membrana del pozzetto. Dopo l'incubazione, le piastre vengono sottoposte a lavaggi per rimuovere il materiale che non si è legato. Seguono poi l'aggiunta dell'anticorpo coniugato e l'incubazione. Il coniugato consiste in un anticorpo coniugato con un enzima e la porzione enzimatica del coniugato consente il rilevamento. Le piastre sono sottoposte di nuovo a lavaggi e viene aggiunto un substrato enzimatico (es. perossido di idrogeno e un cromogeno) e lasciati incubare. La colorazione si sviluppa grazie alla conversione dei substrati in prodotti cromogenici da parte dell'enzima (reazione colorimetrica) e la densità ottica viene letta con un lettore di piastre ELISA.

- Per la ricerca degli anticorpi PRRSV-specifici (rapporto S/P) e per la loro quantificazione è stato utilizzato il kit commerciale ELISA HerdChek 1 PRRSV antibody Test Kit (IDEXX). La classificazione dei campioni è basata sul rapporto S/P (rapporto tra campione e controllo positivo "Sample/Positive control"), con risposta positiva per $S/P \geq 0,4$.

Procedura:

- 1) Diluire ciascun campione con rapporto 1:40 (non diluire i campioni di controllo inclusi nel kit);
- 2) Distribuire 100 µl di controllo NEGATIVO in doppio;
- 3) Distribuire 100 µl di controllo POSITIVO in doppio;
- 4) Distribuire 100 µl di CAMPIONE in singolo;
- 5) Incubare 30 +/- 2 minuti a T.A.;
- 6) Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto;
- 7) Effettuare 3-5 lavaggi con 300 µl di soluzione di lavaggio e all'ultimo lavaggio scuotere leggermente la piastra su carta assorbente;
- 8) Distribuire 100 µl di anticorpo anti-IgG di suino coniugato con perossidasi (HRP);
- 9) Incubare 30 +/- 2 minuti a T.A.;
- 10) Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto;
- 11) Effettuare 3-5 lavaggi con 300 µl di soluzione di lavaggio e all'ultimo lavaggio scuotere leggermente la piastra su carta assorbente;

- 12) Distribuire 100 µl di soluzione di TMB (substrato);
- 13) Incubare per 15 minuti +/- 1 a T.A.;
- 14) Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante;
- 15) Misurare il valore di assorbanza a 650 nm;
- 16) Calcolare i risultati (vedi kit commerciale ELISA HerdChek 1 PRRSV antibody Test Kit - IDEXX).

- Per la ricerca degli anticorpi PCV2-specifici (rapporto S/P) e per la loro quantificazione è stato utilizzato il kit commerciale ELISA INGEZIM Circovirus IgG/IgM indiretto (INGENASA). La classificazione dei campioni è basata sul rapporto S/P, con risposta positiva per $S/P \geq 0,4$.

Procedura:

- 1) Diluire ciascun campione con rapporto 1:200 (non diluire i campioni di controlli inclusi nel kit);
- 2) Distribuire 100 µl di controllo NEGATIVO in doppio;
- 3) Distribuire 100 µl di controllo POSITIVO in doppio;
- 4) Distribuire 100 µl di CAMPIONE;
- 5) Incubare 1 ora a T.A. coprendo le piastre;
- 6) Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto;
- 7) Effettuare 4 lavaggi con 300 µl di soluzione di lavaggio e all'ultimo lavaggio scuotere leggermente su carta assorbente;
- 8) Distribuire 100 µl di anticorpo anti-immunoglobuline di suine Ig coniugato con perossidasi;
- 9) Incubare 30 minuti a T.A.;
- 10) Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto;
- 11) Effettuare 6 lavaggi con 300 µl di soluzione di lavaggio e all'ultimo lavaggio picchiare leggermente su carta assorbente;
- 12) Distribuire 100 µl di substrato (con perossidasi sviluppa una reazione colorimetrica);
- 13) Mantenere le piastre a T.A. per 10 minuti;
- 14) Aggiungere 100 µl di stop solution;
- 15) Misurare il valore di assorbanza a 450 nm e calcolare i risultati (vedi kit commerciale ELISA INGEZIM Circovirus IgG/IgM indiretto - INGENASA);

3.7. Tecnica ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot)

La tecnica ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) è una procedura altamente sensibile e rapida per l'identificazione e la quantificazione del numero di cellule secernenti citochine; è applicabile a vari campioni cellulari quali PBMC e sospensioni cellulari derivanti da organi linfoidi. Permette di identificare la produzione di una determinata citochina a livello di singola cellula (Czerkinsky 1988). Può essere sfruttata per l'identificazione del numero di cellule responsive in modo antigene-specifico nel sangue di animali immunizzati o vaccinati, grazie ad una stimolazione ex vivo.

Tale metodica viene sfruttata per ottenere informazioni su un'effettiva risposta funzionale del sistema immunitario dell'organismo e i dati ottenuti possono inoltre venire associati e integrarsi alle informazioni ottenute con altre diverse tecniche quali Real-Time PCR semi-quantitativa, analisi citofluorimetrica, saggi di proliferazione e di dosaggio dei livelli plasmatici di citochine (ELISA).

In campo veterinario, e più specificatamente nel suino, questa metodica è stata applicata soprattutto per la quantificazione della risposta cellulare in termini di cellule secernenti IFN- γ ed in minor misura di cellule secernenti IL-10 e IL-4.

La tecnica ELISpot è stata utilizzata per la ricerca delle cellule secernenti IFN- γ (IFN- γ SC) PRRSV-specifiche in PBMC isolate con Histopaque-1077[®] a seguito di stimolazione con ceppo virale di campo o vaccino. La quantificazione della risposta è stata effettuata con lettore ELISpot AID[®] (AID[®] ELISpot Software v.4).

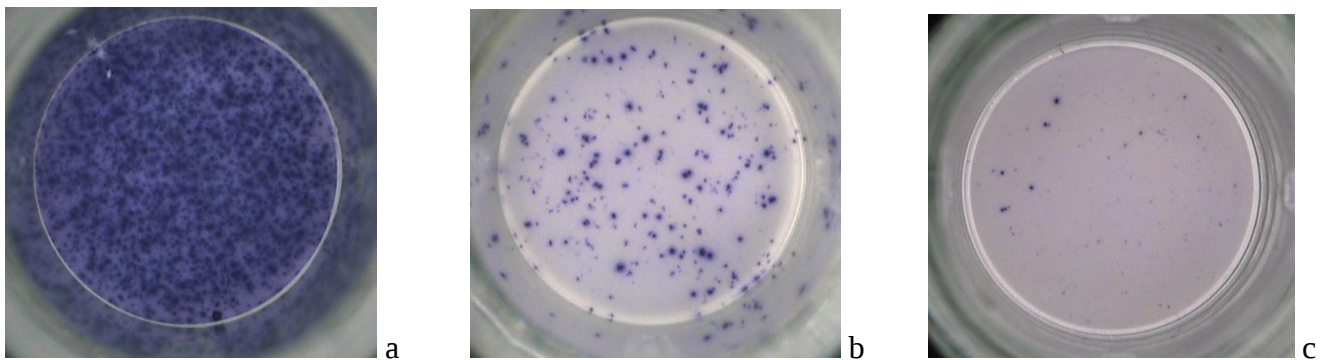


Fig. 1: Rappresentazione di tre pozzetti facenti parte di una piastra ELISpot stimolati rispettivamente con fitoemoagglutina [PHA] (a), stimolo virale [PRRSV] (b) e controllo negativo non stimolato (c).

Procedura:

- 1) COATING → Aggiungere 50 µl/pozzetto di anticorpo anti-IFN- γ di suino (5 µg/ml, 1/100) e incubare O/N a 4°C;
- 2) Effettuare 4 lavaggi con PBS sterile;
- 3) BLOCKING → Aggiungere 200 µl/pozzetto di RPMI-1640 completo (7,5% FBS) e incubare 2 ore in termostato a 37°C, 5% CO₂;
- 4) Eliminare il medium per inversione delle piastre, e far asciugare per 2 ore sotto cappa a flusso laminare;
- 5) Seminare le cellule ed aggiungere lo stimolo specifico (PRRSV: 1 MOI; PCV2: 0,1 MOI) e l'attivatore policlonale PHA (10 µg/ml) nei controlli positivi;
- 6) Incubare 20 ore in termostato a 37°C, 5% CO₂;
- 7) Eliminare la sospensione cellulare per inversione e effettuare 6 lavaggi con PBS + 0,05% Tween-20;
- 8) Aggiungere 50 µl/pozzetto di anticorpo anti-IFN- γ biotinilato (1/1000) in PBS + 0,5% BSA e incubare 1 ora in termostato a 37°C, 5% CO₂
- 9) Effettuare 4 lavaggi in PBS + 0,05% Tween-20
- 10) Aggiungere 100 µl/pozzetto di anticorpo secondario anti-biotina (1/750) coniugato con fosfatasi alcalina (AP) in PBS + 0,5% BSA e incubare 1 ora in termostato a 37°C, 5% CO₂
- 11) Effettuare 4 lavaggi con PBS + 0,05% Tween-20
- 12) Aggiungere 75 µl/pozzetto di BCIP e NBT (1/100) in soluzione di sviluppo e mantenere 8 minuti al buio a T.A.
- 13) Controllare lo sviluppo ottimale della reazione colorimetrica basandosi sul segnale a saturazione dei controlli positivi (cellule stimulate con PHA), quindi eliminare la soluzione per inversione e lavare più volte la piastra con acqua distillata ed asciugarla sotto cappa per 2 ore o fuori cappa O/N.

ANTICORPI (Ab) e SOLUZIONI (Sol)	CLONE	DITTA	DILUIZIONE
Ab COATING	Mouse-Anti Pig IFN- γ	BD Pharmingen	1/100
Ab I°	Biotin Mouse- Anti Pig IFN- γ	BD Pharmingen	1/1000
Ab II°	Goat-Anti Pig Alcaline Phosphatase Anti-Biotin	Vector Laboratories	1/750
PBS sterile	-	-	Diluizione di lavoro (1X)
BSA (Sol PBS+BSA 0,5%)	-	Sigma	0,5%
Buffer di Sviluppo	-	Bio Rad	1/25
H ₂ O distillata	-	-	-
BCIP/NBT	-	Bio Rad	1/100

Tab. 5: Anticorpi e soluzioni utilizzate per la tecnica ELISPOT (studio 1 e studio 2).

3.8. Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che consente un'analisi multiparametrica qualitativa e quantitativa di cellule all'interno di una popolazione eterogenea in sospensione. E' infatti una tecnica che permette di analizzare rapidamente e con precisione un elevato numero di cellule valutandone simultaneamente parametri quali dimensioni, complessità intracellulare, contenuto in DNA e RNA, espressione di marcatori fenotipici, fase del ciclo cellulare, variazioni di permeabilità di membrana.

In ambito immunologico, la capacità di rivelare segnali di fluorescenza emessi da una popolazione cellulare marcata con differenti sonde costituite da anticorpi specifici coniugati con fluorocromi permette la caratterizzazione immunofenotipica e funzionale delle principali sottopopolazioni cellulari in relazione all'espressione di molecole di superficie e/o intracellulari.

Al fine di immunofenotipizzare e quantificare le diverse sottopopolazioni linfocitarie di suino in corso di infezione in vivo o a seguito di stimolazione in vitro, le PBMC isolate sono state marcate con anticorpi verso antigeni di superficie e analizzate mediante citofluorimetro a flusso (Cytomics FC500 e CXP software, Beckman Coulter).

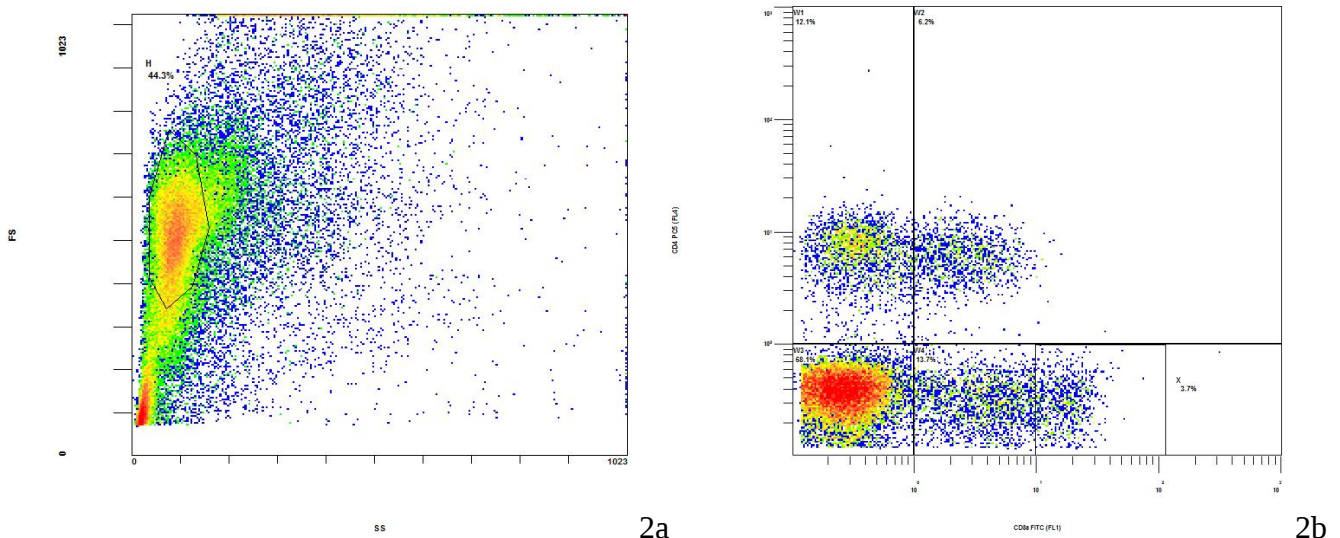


Fig 2: Rappresentazione del gate linfocitario (2a) e della doppia marcatura CD4/CD8 [CD4-CD8-; CD4+CD8- (linfociti T helper); CD4-CD8+ (cellule citotossici); CD4-CD8+high (linfociti T citotossici); CD4+CD8+ (linfociti T memoria)].

Procedura:

- 1) Dopo aver determinato la concentrazione e la vitalità delle PBMC isolate, trasferire un volume contenente 400.000 cellule in ciascuna provetta da citometria per ciascuna marcatura e centrifugare a 300 xg per 5 minuti;
- 2) Eliminare il surnatante;
- 3) Marcare con 5 µl di anticorpo diretto verso antigene di superficie coniugato con fluorocromo (marcatura diretta) o non coniugato (marcatura indiretta), agitare mediante vortex e incubare 15 minuti al buio;
- 4) Effettuare un lavaggio con 1 ml di PBS + 1%FBS;
- 5) Centrifugare a 300 xg per 5 minuti ed eliminare il surnatante;
- 6) In caso di marcatura indiretta, aggiungere 5 µl di anticorpo secondario coniugato con fluorocromo, agitare mediante vortex e incubare per 15 minuti al buio;
- 7) Effettuare un lavaggio con 1 ml di PBS + 1%FBS;
- 8) Centrifugare a 300 xg per 5 minuti ed eliminare il surnatante;
- 9) Risospendere il pellet cellulare in 500 µl di PBS + 1%FBS, agitare mediante vortex e procedere con l'analisi al citofluorimetro con gate sui linfociti o sulle PBMC totali (linfociti + monociti).
Come controllo negativo, utilizzare cellule non marcate.

SOTTOPOPOLAZIONE LINFOCITARIA	STUDIO	MARCATURA
Cellule citotossiche	1, 3	CD4-CD8 α +
Linfociti T citotossici attivati	1, 3	CD8 β +CD25+
Linfociti T helper (Th)	3	CD4+CD8 α -
Linfociti T helper memoria (Tmem) Linfociti T citotossici (LTC)	1, 3	CD4+CD8 α + ^{low} CD4-CD8 α + ^{high} β +
Cellule NK e NKT attivate	3	CD16+CD25+
NK	3	CD3-CD16+
NKT	3	CD3+CD16+
Monociti	3	CD172 α +CD14+ ^{high} CD172 α +CD14+ ^{low}

Tab. 6: Sottopopolazioni linfocitarie e rispettive marcature valutate in citofluorimetria a flusso (studio 1 e studio 3).

ANTICORPI	CLONE	DITTA	DILUIZIONE	STUDIO
CD3 ϵ	mouse anti-pig-CD3 ϵ -PE: clone PPT3, IgG $_1$ κ	Southern Biotech (Valter Occhiena)	1:10	3
CD4 α	mouse anti-pig-CD4 α -PE: clone 74-12-4, IgG $_{2b}$ κ	Southern Biotech (Valter Occhiena)	1:10	1, 3
CD8 α	mouse anti-pig-CD8 α -FITC: clone 76-2-11, IgG $_{2a}$ κ	Southern Biotech (Valter Occhiena)	1:10	1, 3
CD172 α (SWC3 α)	mouse anti-pig-SWC3 α -PE: clone 74-22-15, IgG $_1$ κ (Southern Biotech)	Southern Biotech (Valter Occhiena)	1:5	3
CD16 (FcRIII)	mouse anti-pig-CD16 -FITC: clone G7, IgG $_1$	Serotec (Space-DBA)	1:5	3
CD25 (IL-2R) I°	mouse anti-pig-CD25 (α -chain): clone K231.3B2, IgG $_1$ (AbD Serotec,)	Serotec (Space-DBA)	Non Diluito	3
II° CD25 (IL-2R)	goat anti-MOUSE IgG1 (γ 1 chain)	Southern Biotech (Valter Occhiena)	1:5	3
CD8 β I°	mouse anti-pig-CD8 β : cell line PG164A, IgG $_{2a}$	Kingfisher Biotech (Euroclone-exVMRD)	1:10	1, 3
II° CD8 β	goat anti-mouse IgG $_{2a}$ secondary Ab (M32201; Caltag Labs, Burlingame, CA, USA)	Invitrogen-Molecular Probes (Life Technologies)	1:5	1,3
CD14 I°	mouse anti-pig-CD14: cell line CAM36A (Kingfisher Biotech)	Serotec (Space-DBA)	1:5	3
CD14 II°	goat anti-mouse immunoglobulins FITC conjugated F(ab') $_2$ (R0479; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)	Dako Cytomation	1:5	3

Tab. 7: Anticorpi utilizzati per l'analisi citofluorimetrica (studio 1 e studio 3).

3.9. IPMA (ImmunoPeroxidase Monolayer Assay)

L'IPMA (*ImmunoPeroxidase Monolayer Assay*) è un test altamente specifico e sensibile per la ricerca di anticorpi specifici verso un determinato patogeno.

Procedura:

- 1) Inoculare la linea cellulare PK15 suscettibile a infezione da PCV2 (1×10^7 cellule con 5×10^5 TCID₅₀ di PCV2) in fiasche da 175 cm²;
- 2) Seminare le cellule in una piastra da 96 pozzetti e incubare 5 giorni a 37°C, 5% CO₂;
- 3) Rimuovere il terreno;
- 4) Effettuare un lavaggio con PBS sterile e far asciugare a 37°C per 1 ora (se la piastra non viene utilizzata subito, congelare a -20°C fino all'uso);
- 5) Aggiungere 100 µl/pozzetto di metanolo + 1% H₂O₂ e incubare 30 minuti al buio;
- 6) Effettuare 3 lavaggi con PBS;
- 7) Aggiungere 50 µl/pozzetto di siero in diluizione da 1:20 a 1:20480 (in base 2) in PBS +0,05% Tween-20;
- 8) Incubare per 1 ora a 37°C, 5% CO₂;
- 9) Effettuare 2 lavaggi con PBS;
- 10) Aggiungere µl/pozzetto di soluzione di Proteina A (1:250 in PBS + Tween-20) coniugata con perossidasi;
- 11) Incubare per 1 ora a 37°C, 5% CO₂;
- 12) Effettuare 2 lavaggi con PBS;
- 13) Aggiungere 50 µl di carbazolo in 0,1 M buffer di acetato (tampone di acido acetico-acetato) pH5 + 0,05% H₂O₂;
- 14) Incubare per 10 minuti a T.A. al buio;
- 15) Effettuare 2 lavaggi con PBS;

- 16) Far asciugare all'aria e quantificare il titolo anticorpale al microscopio ottico mediante lettura dei singoli pozzetti.

Il titolo IPMA viene definito come il reciproco della diluizione del siero che mostra almeno 5 pozzetti con cellule presentanti effetto citopatico, identificato dal colore rossastro.

4. STUDIO 1

“Associazione di cellule memoria, cellule citotossiche e cellule secernenti IFN- γ nella risposta immunitaria in corso di infezione naturale da Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV)”.

4.1. Disegno sperimentale

Questo studio è stato svolto su suini convenzionali selezionati da un all'allevamento con anamnesi positiva di infezione da PRRSV. Un gruppo di animali (n.200) è stato monitorato per 22 settimane dallo svezzamento (4 settimane di età) attraverso la fase di ingrasso, fino a 26 settimane di età mediante prelievi di sangue ed indagini sierologiche.

Nello specifico, su campioni di sangue prelevati ogni 2 settimane a partire da 4 a 26 settimane di età sono stati effettuati:

- La viremia da PRRSV mediante PCR nel siero;
- Gli anticorpi PRRSV specifici mediante tecnica ELISA nel siero.
- L'isolamento delle cellule mononucleate del sangue (PBMC) isolate dal sangue intero che sono state conservate in azoto liquido fino al momento delle analisi citofluorimetriche.

A seguito della comparsa di infezione (fig. 1) è stato possibile selezionare retrospettivamente 20 animali che sono stati suddivisi in due gruppi:

- Un gruppo di animali esposto ad infezione da PRRSV (N=10) risultato infetto da PRRSV alle indagini virologiche e sierologiche;
- Un gruppo di animali che non è risultato viremico per tutto il periodo di studio e che è stato utilizzato come controllo (N=10).

4.2. Parametri valutati

La viremia da PRRSV è stata quantificata mediante real-time RT-qPCR.

Gli anticorpi PRRSV-specifici (rapporto S/P) sono stati determinati mediante kit commerciale ELISA (HerdChek 1 PRRSV antibody Test Kit, IDEXX). La classificazione dei campioni è basata sul rapporto S/P. Risposta positiva per $S/P \geq 0.4$.

Le cellule secernenti IFN- γ (IFN- γ SC) PRRSV-specifiche sono state valutate come numero di IFN- γ SC in PBMC isolate con Histopaque-1077® a seguito di stimolazione con 1 MOI di ceppo vaccinale vivo attenuato DV (Porcilis® PRRS).

Immunofenotipizzazione e quantificazione delle sottopopolazioni linfocitarie: effettuata mediante citofluorimetria a flusso (cellule CD8 α^+ totali, T helper memoria CD4 $^+$ CD8 α^{+low} e T citotossiche CD4 $^-$ CD8 β^+).

Viremia e parametri immunitari sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA (analisi della varianza) e test di Dunnet per evidenziare differenze all'interno del gruppo e tra i gruppi durante il periodo di tempo analizzato. Il grado di significatività è stato definito per $p < 0,05$.

TECNICHE	MATRICE	UTILIZZO
Real-Time PCR	Siero	VIREMIA (PRRSV+)
ELISA	Siero	Titolo anticorpale (S/P) PRRSV specifico
ELISpot	PBMC	N° cellule secernenti IFN- γ PRRSV-specifiche (IFN- γ SC)
Citometria	PBMC	Sottopopolazioni linfocitarie: CD8 α^+ (Cellule citotossiche totali) CD4 $^+$ CD8 α^{+low} (Linfociti T memoria) CD4 $^-$ CD8 β^+ (Linfociti T citotossici)

4.3. Risultati

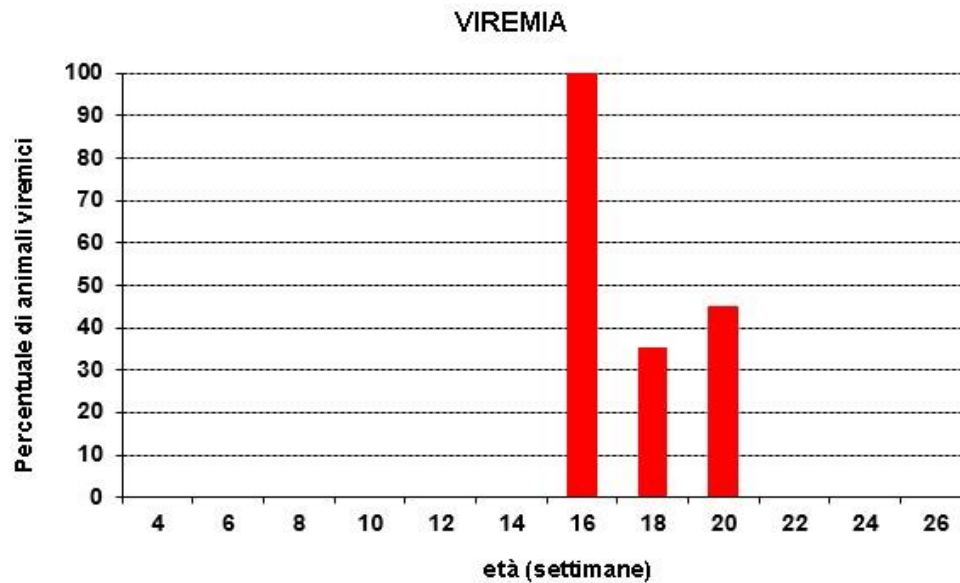


Fig. 1: Percentuale di animali PRRSV viremici.

Nel gruppo Non Viremico (NV) non è stata riscontrata viremia per tutto il periodo di indagine.

Nella figura 1 è possibile osservare che i 10 suinetti del gruppo Viremico (V) sono risultati tutti positivi per PRRSV a 16 settimane di età (4 mesi) e la viremia è durata fino a 20 settimane in circa la metà degli animali.

Fig. 2a

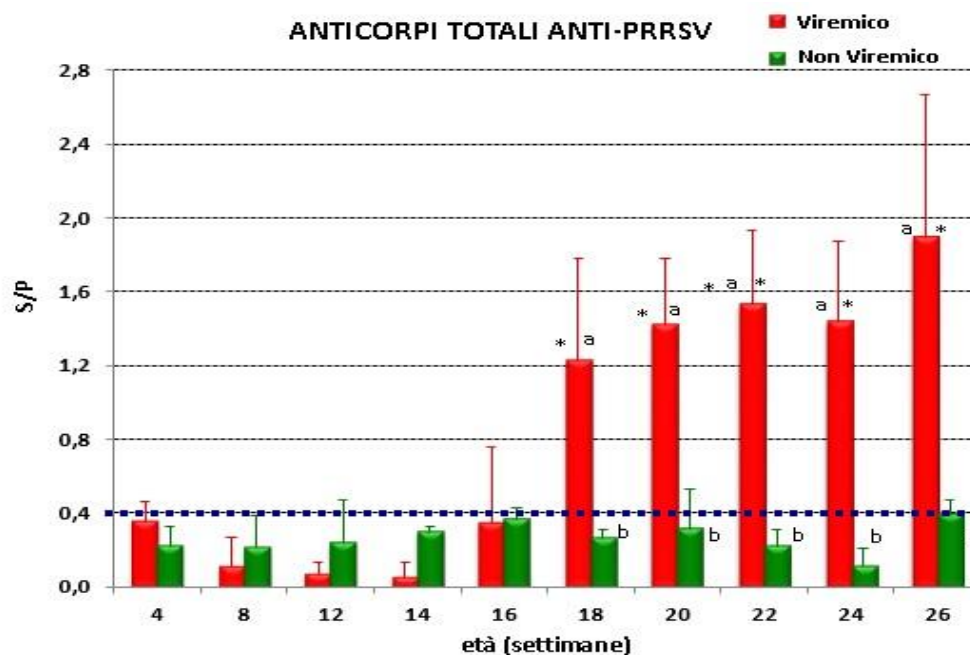


Fig. 2b

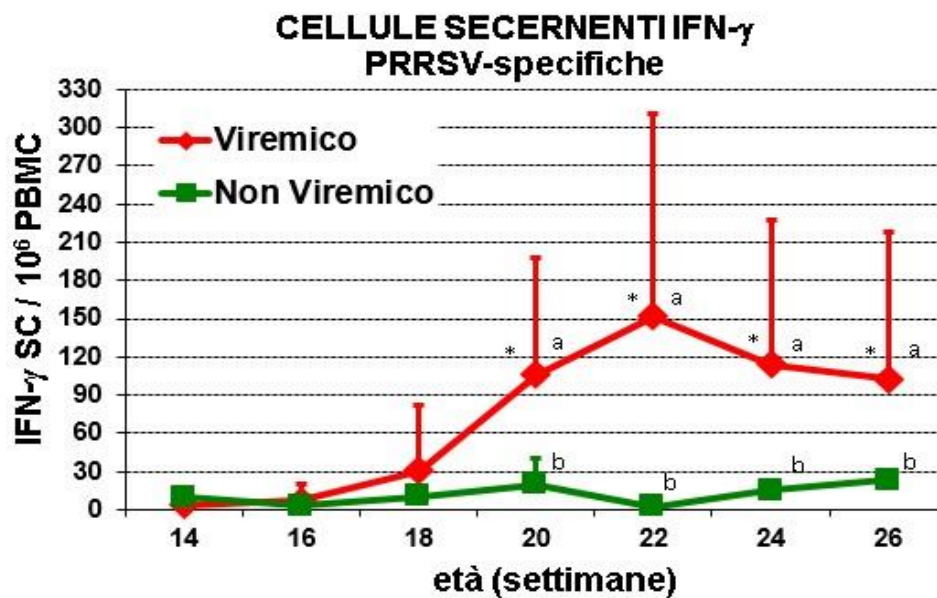


Fig. 2: Titolo anticorpale nel siero dei gruppi Viremici e Non Viremici (2a) e livelli di cellule secernenti IFN- γ PRRSV-specifiche (2b).

*: differenza statisticamente significativa tra i tempi.

Lettere (a, b): differenza statisticamente significativa tra i gruppi.

Come osservabile dalla figura 2 la risposta anticorpale del gruppo V si è sviluppata a partire dalla 18^a settimana e si è mantenuta nelle settimane successive mentre quella relativa al gruppo NV è rimasta sotto la soglia di positività senza subire variazioni.

Nella figura 2 b si osserva che la presenza di cellule secernenti IFN- γ PRRSV specifiche inizia a manifestarsi dopo la 18^a settimana con incremento significativo a 20 settimane di età ($p<0,05$) mostrando successivamente un picco a 22 ($p<0,05$) settimane per poi decrescere gradualmente; tale andamento si associa all'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie valutate in citometria (Figure 3 a, b, c)

Fig. 3a

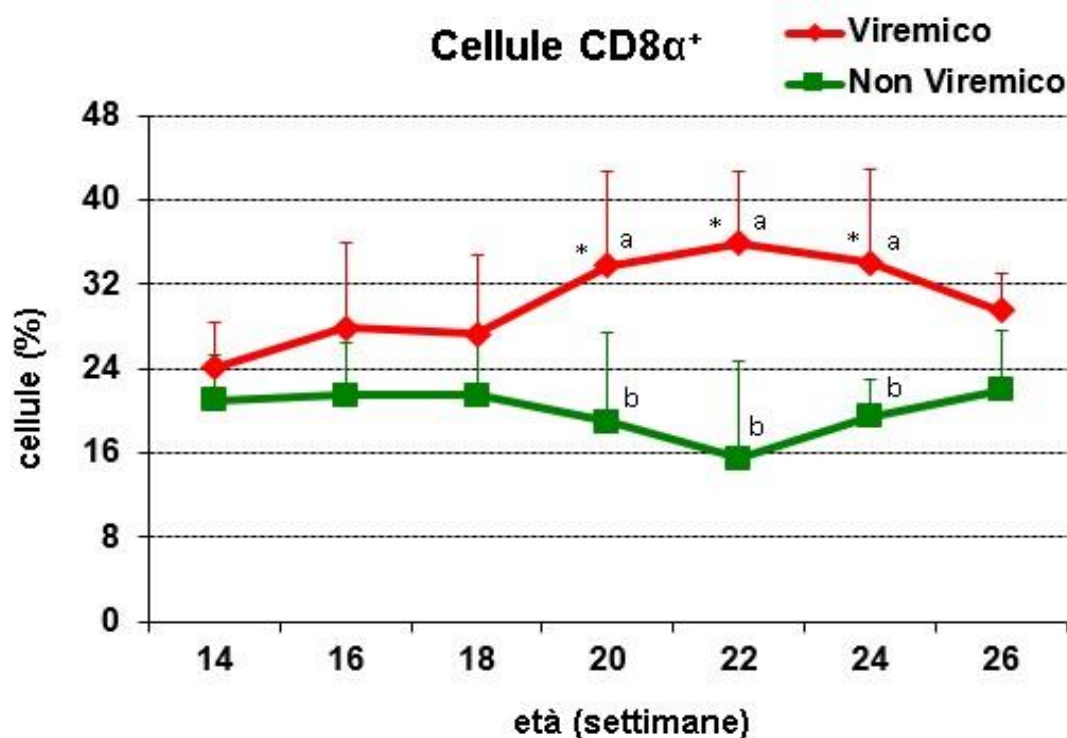


Fig. 3b

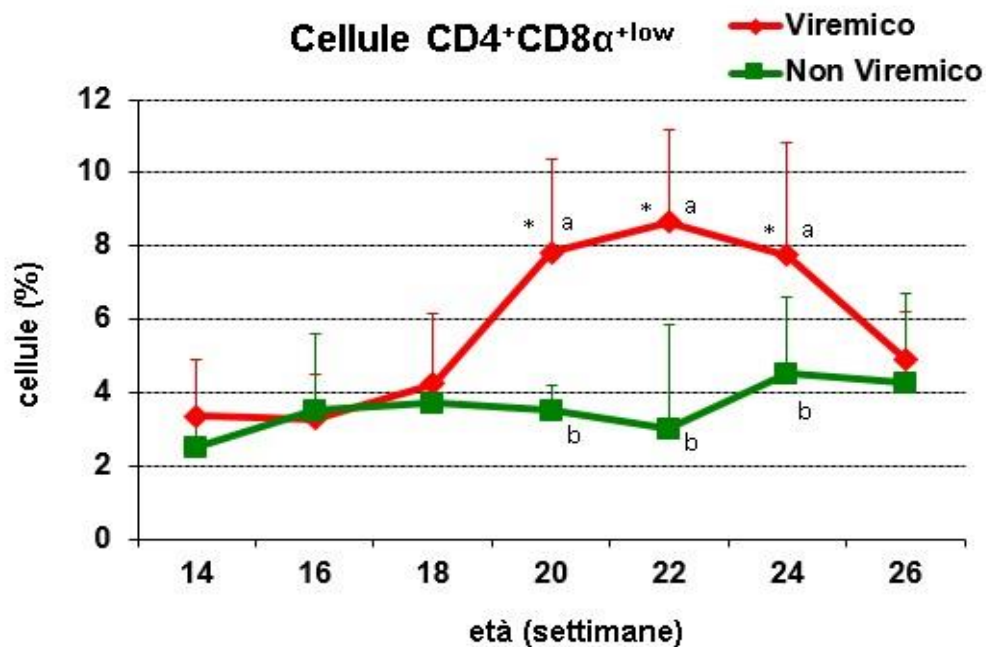


Fig. 3c

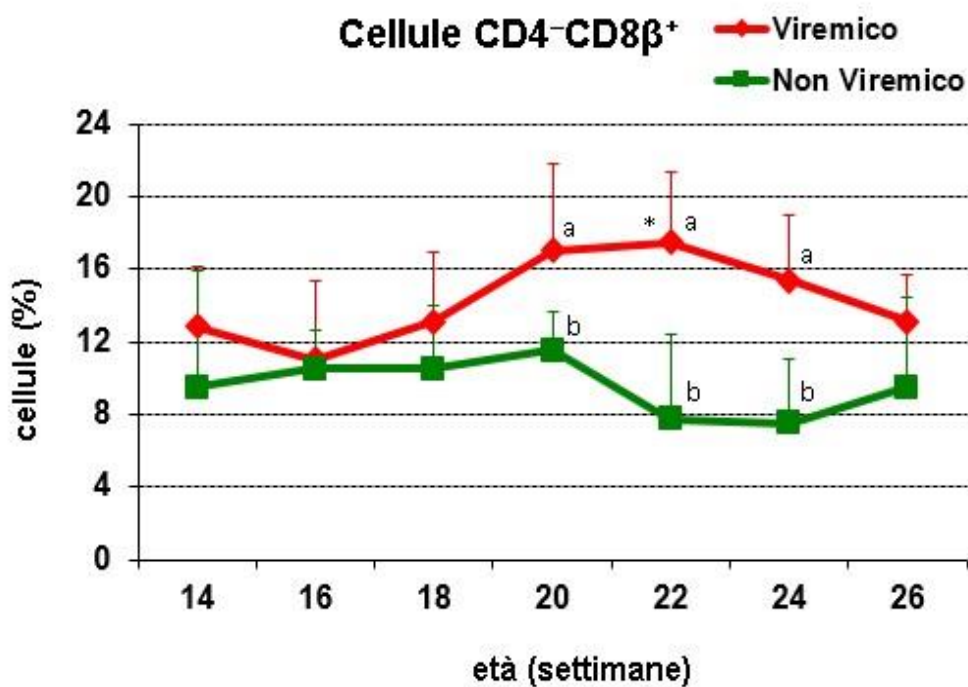


Fig. 3: Sottopopolazioni linfocitarie nei gruppi Viremici e Non viremici: cellule citotossiche CD8⁺, T helper memoria (CD4⁺CD8 α ^{+low}) e T citotossici (CD4⁻CD8 β ⁺).

*: differenza statisticamente significativa tra i tempi.

Lettere (a, b): differenza statisticamente significativa tra i gruppi.

Per quanto riguarda le tre sottopopolazioni linfocitarie valutate in citometria (Figura 3) l'andamento delle cellule citotossiche totali ($CD8\alpha^+$) negli animali viremici mostra un aumento a partire dalla 18^a settimana di età che risulta statisticamente significativo ($p<0,05$) a 20, 22, 24 settimane ($p<0,05$).

Dopo la 22^a settimana si può notare un graduale decremento che ad ogni modo resta significativo anche a 24 settimane ma non oltre.

Dai successivi due grafici rappresentanti gli andamenti linfocitari delle popolazioni dei linfociti T memoria $CD4+CD8\alpha^{low}$ (Fig. 3 b) e T citotossici $CD4-CD8\beta^+$ (Fig. 3 c).

Negli animali viremici (figura 3 b: linfociti T memoria $CD4+CD8\alpha^{low}$), è possibile riscontrare, anche in questo caso, un aumento della percentuale dalla 18^a settimana che risulta poi statisticamente significativo ($p<0,05$) sia tra i tempi (20, 22 e 24 settimane) sia tra i due gruppi di animali viremici e non viremici. Dalla 22^a settimana inizia un calo che si normalizza a 26 settimane rispetto al gruppo controllo.

Per quanto riguarda il grafico che rappresenta la sottopopolazione dei linfociti T citotossici ($CD4-CD8\beta^+$) anche per questa sottopopolazione linfocitaria si nota un aumento della percentuale di cellule $CD4-CD8\beta^+$ a partire da 18 settimane di età che risulta statisticamente significativo ($p<0,05$) sia tra i tempi (20, 22 e 24 settimane) sia tra i due gruppi (V e NV). Anche questa sottopopolazione mostra un decremento a partire dalla 22^a settimana che gradualmente si normalizza a 26 settimane con i livelli del gruppo NV

Negli animali viremici non si evidenziano modificazioni significative delle sottopopolazioni immunitarie ed i livelli di cellule IFN- γ SC PRRSV specifiche risultano al di sotto di un limite di aspecificità.

4.4. Discussione

Lo scopo di questo primo studio è stato di valutare l'attivazione della risposta immunitaria, in termini di cellule secernenti IFN- γ e di caratterizzazione fenotipica di cellule immunitarie attivate, in corso di infezione naturale da PRRSV in animali infetti nei confronti di animali non infetti (controllo).

Si è constatato che l'attivazione dell'immunità nei confronti del virus della PRRS si sviluppa molto lentamente sia come risposta umorale che cellulo-mediata.

Per quanto riguarda la risposta umorale anche se si tratta di anticorpi non sieroneutralizzanti, in questo studio, si è rilevato un certo incremento della produzione di anticorpi PRRSV specifici che appare anticipata rispetto alla risposta cellulo-mediata.

Diversi studi hanno ipotizzato che epitopi virali presenti sull'envelope di PRRSV, come le proteine/glicoproteine N, M, GP5 e GP3, possano promuovere la produzione e attività di Ab PRRSV-specifici che legandosi alle particelle virali ne facilitano l'ingresso all'interno delle cellule bersaglio. (Cancel-Tirado et al., 2004).

Gu e colleghi hanno dimostrato che CD16, fortemente espresso dai PAM (Pulmonary Alveolar Macrophages) legandosi specificamente al complesso Ab-PRRSV media l'internalizzazione del virus all'interno dei PAM, determinando un aumento della produzione di particelle virali (Gu et al., 2015).

Studi condotti da Dengke e colleghi hanno dimostrato che PRRSV, una volta all'interno della cellula sopprime l'espressione di geni antivirali andando ad interferire negativamente sulla trascrizione di fattori quali: interferon regulatory factor-1 (IRF-1), interferon regulatory factor-3 (IRF-3) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Dengke B. et al., 2013)

Generalmente questa precoce produzione di anticorpi è diretta contro le proteine N, M e GP5. (Loemba et al., 1996) e non è correlata alla produzione di Ab protettivi sieroneutralizzanti.

Per quanto riguarda la risposta cellulo-mediata è stato possibile osservare che la sua attivazione appare nettamente ritardata come tipicamente si evidenzia durante l'infezione da PRRSV (Ferrari et al., 2013; Rodríguez-Gómez 2013).

Soprattutto è descritto un ritardo nell'induzione delle cellule citotossiche PRRSV specifiche ed una differente attivazione di questa sottopopolazione tra suinetti e suini adulti (Butler et al., 2014; Costers et al., 2009). La capacità di creare una risposta citotossica adeguata da parte di suinetti infettati precocemente appare compromessa a causa del non completo sviluppo dei precursori dei CTL a sua volta determinato da una scorretta selezione timica e da una inadeguata presentazione da parte delle

APCs (Antigen Presenting Cells) infettate da PRRSV che inoltre non producono una sufficiente quantità di IFN- α .

Al contrario in animali adulti PRRSV-infetti, in cui i precursori dei Tct avevano subito un normale sviluppo, anche se l'infezione compromette l'immunità innata, la presenza di cellule infettate da virus potrebbe ad ogni modo portare ad uno sviluppo di una risposta moderata mediata da Tct.

La riduzione della risposta cellulo-mediata e nello specifico citotossica viene spiegata dal fatto che PRRSV determina una scarsa attivazione della risposta innata a sua volta correlata con una ritardata e poco efficace attivazione della risposta specifica cellulo-mediata.

Costers e colleghi affermano che probabilmente l'attività citotossica e la produzione di IFN- γ potrebbe essere determinata inizialmente da cellule della risposta innata tra cui Linfociti T γ/δ , cellule NK. (Costers et al., 2009)

Il ritardo nell'attivazione della risposta immunitaria e della clearance del patogeno viene in parte spiegato dal fatto che l'infezione da PRRSV possa anche aumentare la frequenza di un'altra sottopopolazione linfocitaria, i linfociti T regolatori/soppressori (T_{reg} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Fisiologicamente questa sottopopolazione svolge il suo ruolo nello spegnimento della risposta immunitaria una volta avvenuta la clearance del patogeno, al fine di evitare una continua ed eccessiva attivazione immunitaria che andrebbe a causare danni ai tessuti ed organi. I linfociti T reg sono precocemente stimolati durante l'infezione da PRRSV e la sua attivazione va a determinare un precoce ed immatura inattivazione delle componenti del sistema immunitario.

Il meccanismo principale che utilizzano i linfociti T_{reg}, in presenza di PRRSV per eludere la risposta immunitaria, è la produzione di citochine antinfiammatorie come TGF- β e IL-10 aumento positivamente correlato ai valori della viremia (Silva-Campa et al., 2012; Ferrarini G. et al., 2015). Queste citochine andando ad interagire sulla componente cellulare attiva della risposta immunitaria nei confronti di PRRSV ne determinano una prematura inattivazione (Ferrarini G. et al., 2015).

Questa inattivazione immunitaria può essere intesa come una scarsa espressione genica di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β ed IL-8 coinvolte nelle prime fasi dell'infezione (Ferrarini G. et al., 2015). L'attivazione della sottopopolazione linfocitaria T_{reg} da parte del virus della PRRS causa

un'inibizione della risposta immunitaria innata ed infiammatoria, down-regolando i principali segnali attivatori. (Darwich et al 2010).

Sempre nelle prime fasi di infezione da PRRSV si osserva una riduzione dell'espressione genica sia di TNF- α (Borghetti et al., 2011) sia di IFN- γ associato ad un incremento dei livelli di viremia (Ferrarini G. et al., 2015; Meier et al., 2003; Royae et al., 2004).

Riguardo la produzione di IFN- γ studi hanno dimostrato che la vaccinazione può modulare positivamente l'espressione genica in vivo inducendo la produzione di IFN- γ quando le cellule vengono ristimate in vitro. Vi è la necessità di ulteriori ed approfondite ricerche per poter meglio comprendere l'attività ed i meccanismi che PRRSV utilizza per l'attivazione di questa sottopopolazione nota come linfociti T_{reg}.

Un'ulteriore ipotesi per spiegare la ritardata attivazione immunitaria si basa su fatto che PRRSV sopprime l'immunità innata e di conseguenza viene meno anche l'attivazione di un'adeguata risposta adattativa. A scaturire una bassa risposta innata è la scarsa produzione di IFN I che a sua volta porta ad una deficitaria attivazione di APCs e NK che in modo correlato promuovono una mancata attivazione/differenziazione di cellule CD4⁺ e CD8⁺ (Butler et al., 2014). Questo effetto è fortemente riscontrabile in suini di giovane età, fatto che spiega il motivo per cui i suinetti sviluppano la malattia in modo più grave ed una scarsa risposta immunitaria protettiva durante il critico periodo di sviluppo a cavallo dello svezzamento. Ad ogni modo è stato riportato che anche una eccessiva produzione di IFN I può risultare in un danno infiammatorio (Butler et al., 2014). Al riguardo Murtaugh e colleghi suggeriscono che ceppi ad alta patogenicità (HP-PRRSV) inducano eccessivi livelli di IFN I a tal punto da causare una elevata mortalità, determinata sia dall'attività del virus stesso sia da una eccessiva produzione di IFN I (Murtaugh et al., 2002).

Nel suino le cellule T svolgono un ruolo importante in vari aspetti dell'immunità nei confronti di PRRSV a causa della loro centrale attività nello sviluppo e regolazione della risposta immunitaria PRRSV-specifica, determinando l'attivazione delle cellule B, delle cellule citotossiche e regolando il processo infiammatorio (Loving et al., 2015).

Butler e colleghi, hanno proposto che PRRSV eluda la risposta immunitaria nel timo determinando linfopenia riscontrabile poco dopo l'inizio dell'infezione, atrofia timica e linfoadenopatia

accompagnata sia da una perdita di cellule T immature nel timo, sia da effetti inibitori sullo sviluppo di un'immunità adattativa PRRSV-specifica protettiva. (Butler et al., 2014).

La replicazione di PRRSV negli organi linfoidi provoca l'attivazione di cellule B policlonali che è associata alla comparsa: di iperplasia linfoide, di livelli estremamente elevati di immunoglobuline sieriche e di immunocomplessi circolanti (Zimmerman et al., 2012);

La capacità di fagocitare appartenente ai macrofagi infettati si riduce e questo porta ad una maggiore predisposizione ad infezioni secondarie e a setticemia. (Zimmerman et al., 2012).

L'insieme di tutti questi meccanismi porta a determinare un forte ritardo dell'attivazione della risposta immunitaria che si traduce in un correlato ritardo per quanto riguarda la clearance del patogeno.

E' noto inoltre che APCs infettate da PRRSV provocano anche un'alterata produzione di citochine (IFN) e fattori di trascrizione (JAK/STAT, NF- κ B) che a loro volta portano ad una scorretta attivazione immunitaria. (Butler et al., 2014).

Una considerazione che si desume dai risultati di questo studio è che, nonostante l'evidente ritardo dell'attivazione della risposta immunitaria all'infezione, l'andamento qualitativo (modulazione temporale delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue) e quantitativo [numero di cellule secernenti IFN- γ (IFN- γ SC)] della risposta immunitaria cellulo-mediata, appaiono tra loro associati facendo pensare ad un ruolo funzionale delle sottopopolazioni cellulari linfocitarie analizzate.

Infatti l'osservazione che gli andamenti delle diverse sottopopolazioni immunitarie cellulari vanno di pari passo con i livelli di IFN- γ SC PRRSV-specifiche durante il tempo della sperimentazione, potrebbe spiegare, seppur indirettamente, che proprio queste sottopopolazioni linfocitarie (Linfociti T citotossici e Linfociti T helper) siano coinvolte nella produzione/secrezione PRRSV specifica di IFN- γ (Martelli et al 2009, López Fuertez L. 1999) e che siano le principali cellule immunitarie che intervengono nell'infezione da PRRSV e quelle più importanti da analizzare in termine di attivazione/inibizione di una risposta Th1.

In definitiva, si assume che il virus della PRRS, andando ad agire su vari fronti della risposta immunitaria e compromettendo la corretta e tempestiva attivazione dapprima della risposta innata e successivamente di quella adattativa sia umorale sia cellulo-mediata, ritardi di gran lunga la clearance del patogeno provocando così una persistente e prolungata infezione.

Inoltre, l'osservazione che, seppur con una attivazione ritardata, ci sia comunque un significativo incremento delle sottopopolazioni e della risposta IFN- γ nel tempo, può essere interpretata

considerando che l'effetto immuno-inibitorio dell'infezione da PRRSV possa variare in base all'età degli animali al momento della comparsa dell'infezione, che in questo studio si verifica tardivamente, e/o può essere messa in relazione alle differenti caratteristiche immunobiologiche dell'isolato di campo che influenza diversamente l'andamento della risposta cellulo-mediata durante l'infezione naturale da PRRSV (Ferrari et al. 2013).

5. STUDIO 2

“Valutazione della risposta immunitaria nei confronti di una vaccinazione contro PCV2 in suini riscontrati PRRSV viremici e non viremici alla vaccinazione”.

5.1. Disegno sperimentale

In questo studio sono stati inclusi 200 suini da un allevamento con anamnesi positiva instabile verso l'infezione da PRRSV (Martelli et al., 2013).

Allo svezzamento (4 settimane di età) i suinetti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla vaccinazione verso PCV2:

- 1) **Gruppo A** (n° = 100) → vaccinato intramuscolo nei confronti di PCV2 (Porcilis® PCV - MSD)
- 2) **Gruppo B** (n° = 100) → non vaccinato

I campioni di sangue sono stati raccolti dal giorno dello svezzamento (I^a vaccinazione 4 settimane di età) ogni 4 settimane fino a 16 settimane di età. Da ciascun campione di sangue sono stati ricavati:

- Siero → per analisi virologiche e per la valutazione della risposta anticorpale anti-PCV2;
- PBMCs → per la valutazione della risposta cellulo-mediata (IFN- γ SC) PCV2 specifica.

Alla luce dei dati preliminari, basati sul rilevamento della viremia da PRRSV al momento della vaccinazione (4 settimane di età) valutata mediante RT-PCR (Martelli et al., 2013), gli animali di entrambi i gruppi (A e B) sono stati retrospettivamente suddivisi in due sottogruppi ciascuno, in maniera tale da poter creare 4 sottogruppi composti da 20 maiali come riportato di seguito.

PCV2 vaccinato - PRRSV viremico
PCV2 vaccinato - PRRSV non viremico
PCV2 non vaccinato - PRRSV viremico
PCV2 non vaccinato - PRRSV non viremico

I campioni di siero sono stati analizzati per la determinazione dei livelli di anticorpi PCV2 specifici mediante un kit ELISA commerciale (Ingenzim Circo, Ingenasa, Madrid, Spain) and i risultati sono stati espressi come S/P ratio considerando positivi i valori >0.4 . Gli anticorpi anti-PCV2 sono stati determinati anche mediante test IPMA in diluizione seriale da 1/20 a 1/160.

Il numero delle cellule PCV2 specifiche secernenti IFN gamma sono state determinate tramite tecnica ELISpot.

5.2. Parametri valutati

TECNICHE	MATRICE	UTILIZZO
ELISA	Siero	Ab anti PCV2
IPMA	Siero	Ab anti PCV2
ELISpot	PBMC	Cellule secernenti IFN- γ (IFN- γ SC) PCV2-specifiche

Le indagini statistiche sono state effettuate usando il sistema SAS V.9.1.3 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) con livello di significatività fissato a 0.05. Le differenze tra i gruppi a ciascun tempo analizzato sono state analizzate mediante il test ANOVA test e il test di Kruskal–Wallis.

5.3. Risultati

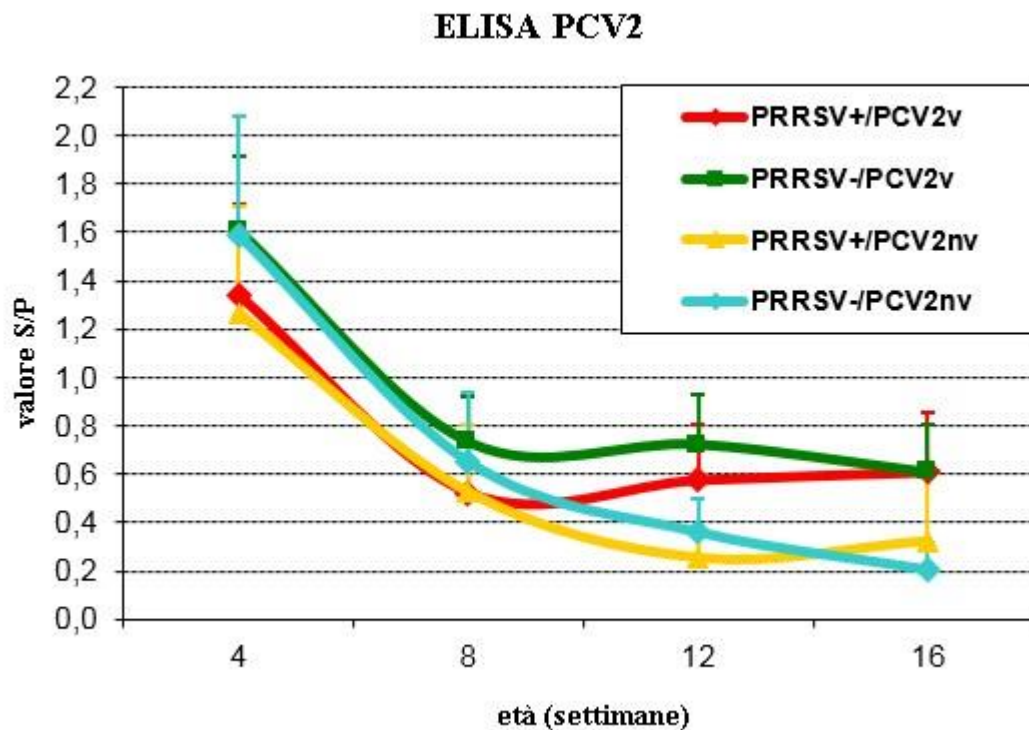


Fig 1: Titolo anticorpale PCV2-specifico mediante tecnica ELISA. Legenda dei gruppi:

- PRRSV + / PCV2v → PRRSV infetto / PCV2 vaccinato
- PRRSV - / PCV2v → PRRSV non infetto / PCV2 vaccinato
- PRRSV + / PCV2nv → PRRSV infetto / PCV2 non vaccinato
- PRRSV - / PCV2nv → PRRSV non infetto / PCV2 non vaccinato

Nella figura 1 viene presentato l'andamento anticorpale dei 4 sottogruppi valutato mediante ELISA.

Al momento della vaccinazione (4 settimane di età), i risultati della sierologia hanno evidenziato che i suinetti PRRSV viremici hanno un più basso valore S/P rispetto al gruppo PRRSV non viremico ($p < 0.05$).

I sottogruppi vaccinati contro PCV2 sia PRRS viremico sia non viremico mostrano un andamento parzialmente simile.

Dopo la vaccinazione l'andamento degli anticorpi ELISA ed IPMA mostra un limitato decremento nel tempo mentre negli animali non vaccinati si assiste ad una forte diminuzione degli anticorpi di derivazione materna (MDA) In questo gruppo si assiste ad forte tra la 4^a settimana e l'8^a.

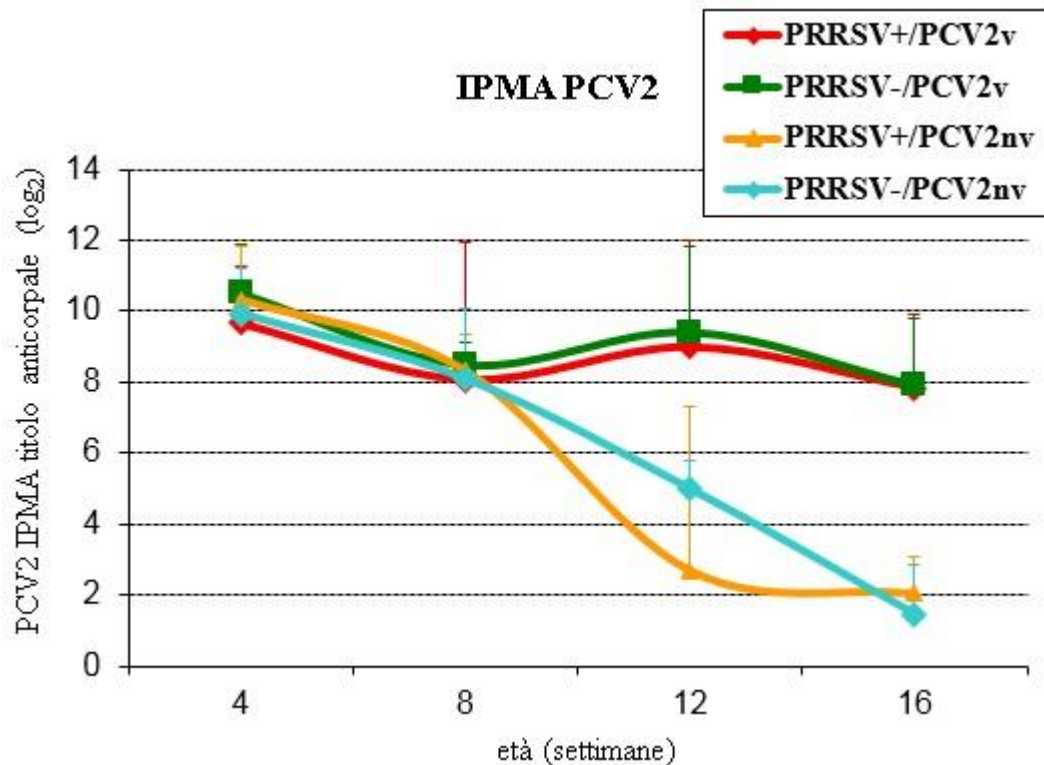


Fig 2: Titolo anticorpale PCV2 specifico mediante tecnica IPMA. Legenda dei gruppi:

- *PRRSV + / PCV2v* → *PRRSV infetto / PCV2 vaccinato*
- *PRRSV - / PCV2v* → *PRRSV non infetto / PCV2 vaccinato*
- *PRRSV + / PCV2nv* → *PRRSV infetto / PCV2 non vaccinato*
- *PRRSV - / PCV2nv* → *PRRSV non infetto / PCV2 non vaccinato*

Per quanto riguarda i titoli anticorpali valutati mediante tecnica IPMA, contrariamente ai valori ELISA non evidenziano differenze statisticamente significative tra tutti e quattro i gruppi.

Dalla Figura 2 rappresentante il titolo anticorpale valutato mediante tecnica IPMA   possibile osservare che a 4 settimane il titolo   pressappoco uguale per tutti i gruppi.

Segue un calo fino all'8^a settimana, dopo il quale si pu  notare una divisione, i due gruppi vaccinati PCV2, indipendentemente dall'essere infetti o meno mantengono il titolo anticorpale mentre nei due gruppi non vaccinati vi   un calo molto pi  marcato.

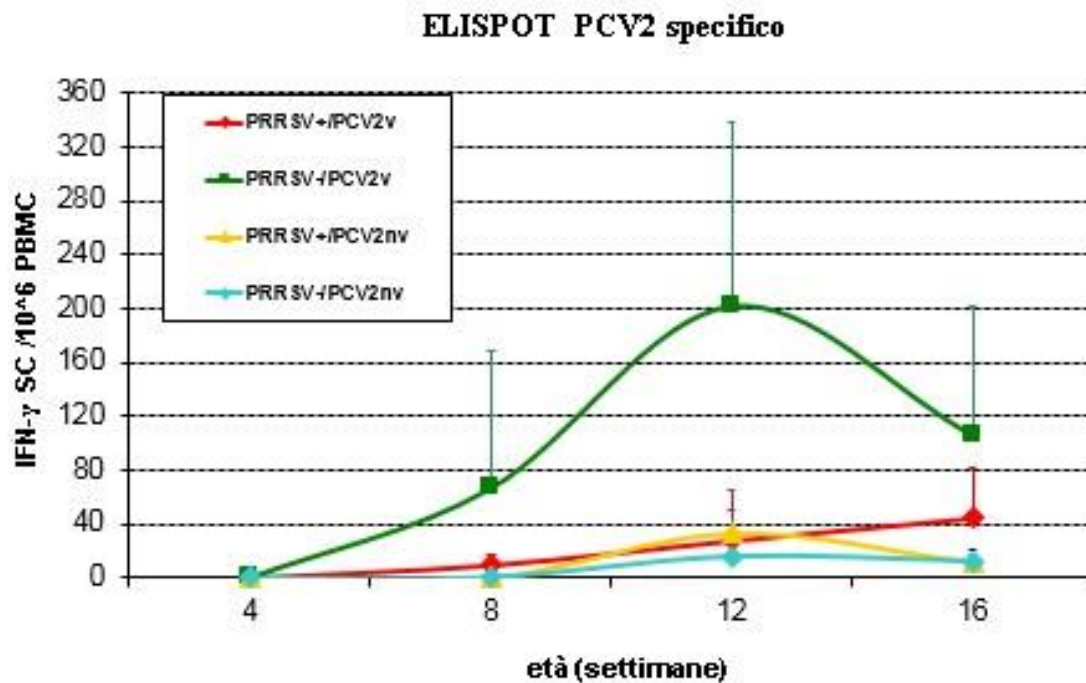


Fig 3: Numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche mediante tecnica ELISpot. Legenda dei gruppi:

- PRRSV + / PCV2v $\rightarrow$ PRRSV infetto / PCV2 vaccinato
- PRRSV - / PCV2v $\rightarrow$ PRRSV non infetto / PCV2 vaccinato
- PRRSV + / PCV2nv $\rightarrow$ PRRSV infetto / PCV2 non vaccinato
- PRRSV - / PCV2nv $\rightarrow$ PRRSV non infetto / PCV2 non vaccinato

Nella Figura 3 viene rappresentato l'andamento nel tempo del numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche che mostra un incremento nel tempo solo nel gruppo PCV2 vaccinato PRRSV non viremico () ($p < 0.05$). Il suddetto gruppo mostra un picco alla 12^a settimana in risposta alla stimolazione vaccinale avvenuta a 4 settimane di età con un ritorno ai livelli basali ed un successivo aumento alla 16[°] settimana.

Per quanto riguarda il sottogruppo vaccinato PCV2 e viremico PRRSV e nei due gruppi non vaccinati PCV2, non si osserva stimolazione della risposta cellulo-mediata in termini di incremento del numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche.

5.4. Discussione

Al momento della vaccinazione (4 settimane di età) i risultati sierologici hanno evidenziato che i suinetti PRRSV viremici avevano un più basso rapporto S / P PCV2 specifico rispetto agli animali non viremici ($p < 0.05$). Al contrario, i titoli IPMA per gli anticorpi PCV2 specifici non differiscono statisticamente confrontando i suini viremici con quelli non viremici. Tuttavia, dopo la somministrazione del vaccino, gli anticorpi valutati con ELISA, così come gli anticorpi IPMA hanno mostrato un più lento declino anticorpale di derivazione materna (MDA), mentre negli animali non vaccinati il declino degli anticorpi acquisiti passivamente è stato più marcato.

Riguardo la risposta immunitaria umorale valutata mediante tecnica ELISA, a 4 settimane di età si osserva una netta divisione in due gruppi, un gruppo composto dai due sottogruppi PRRSV viremici e un gruppo composto dai due sottogruppi PRRSV non viremici.

Questa divisione potrebbe essere spiegata dal fatto che i gruppi PRRS viremici a 4 settimane lo fossero già durante le prime 4 settimane di vita e probabilmente anche prima del parto, in tal caso si potrebbe fortemente ritenere che nei sottogruppi PRRSV infetti il virus abbia esercitato il suo effetto negativo molto precocemente forse anche prima della nascita e che abbia dunque determinato questa netta divisione a 4 settimane di età.

Il più basso valore del rapporto S/P (Sample/Positive control) nei suinetti PRRSV viremici a 4 settimane di età (momento della vaccinazione) rispetto a quelli non viremici, è molto probabilmente dovuto alla ridotta assunzione di colostro correlata con lo stato di viremia PRRSV specifica (Martelli et al., 2015; Sibila et al., 2014). Queste evidenze non sono però supportate dai risultati sierologici provenienti dall' IPMA. Negli animali vaccinati contro PCV2, indipendentemente dallo stato viremico di PRRSV, il corso degli anticorpi, anche se non è stato possibile rilevare la sieroconversione, sostiene che la stimolazione della componente dell'immunità anticorpale viene conservata senza alcuna significativa interferenza. Questo comportamento è in linea con ciò che si trova in letteratura riguardo la sieroconversione nei suinetti con MDA e vaccinati contro PCV2 a 2 e 4 settimane di età (Martelli et al., 2013, Martelli et al., 2011; Fort et al.,; Opriessnig et al., 2010).

I dati riguardanti l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata hanno evidenziato che nei suinetti PRRSV viremici non vi è aumento del numero di cellule secernenti INF- γ PCV2 specifiche dopo la vaccinazione a differenza dei suinetti non infetti da PRRSV in cui si assiste ad un forte incremento

postvaccinale, ad indicare che la condizione di infezione precoce da PRRSV può compromettere in maniera critica lo sviluppo/attivazione della risposta immunitaria cellulo-mediata.

Il fatto che non si osservino grandi differenze sulla modulazione anticorpale ma al contrario si evidenzino interessanti effetti sulla risposta immunitaria cellulo-mediata potrebbe trovare spiegazione nella più precoce sviluppo e produzione di linfociti B (20 giorni di gestazione) rispetto a quella più tardiva dei linfociti T (40/45 giorni di gestazione).

Queste evidenze possono essere correlati al negativo impatto che PRRSV esercita nelle prime settimane di vita o in vita fetale se l'infezione è avvenuta nell'ultimo trimestre di gestazione in quanto il virus è in grado di passare la barriera placentare nella fase tardiva di gestazione (intorno al 90° giorno) causando infezione di tutti i nascituri della nidata.

PRRSV ha come bersaglio principale il timo e quindi è in grado di influenzare negativamente il numero, la tipologia e lo sviluppo delle cellule T ancora immature a maggior ragione nell'ambito di un sistema immunitario e di una attivazione immunitaria ancora immatura com'è nel suinetto all'età vaccinale post-svezzamento o pre-natale.

L'infezione colpisce la cellularità timica soprattutto in termini di perdita di cellule CD4⁺ /CD8⁺ (Butler et al., 2014, Guo et al., 2013; Feng et al., 2001, 2002), influenzando così negativamente il numero e la natura delle cellule T in via di sviluppo.

Infatti è noto che, dal momento della nascita fino allo svezzamento (circa 4 settimane di età) il sistema immunitario dei suinetti non è completamente maturo anzi è in pieno sviluppo e maturazione.

Durante la gestazione, l'attività linfopoietica dei linfociti B è riscontrabile già al 20° giorno di gestazione nel sacco vitellino e a 30 giorni nella milza fetale mentre l'attività linfopoietica dei linfociti T è riscontrabile al 40° giorno di gestazione nel timo e nello stesso momento appaiono le prime IgM nel sangue fetale (Butler et al., 2006 a). Successivamente, dopo 45 giorni di gestazione è possibile riscontrare l'attività T linfopoietica del midollo osseo e la successiva presenza di linfociti T nel sangue.

I linfociti T α/β una volta usciti dal timo sono composti da linfociti T helper (CD4⁺CD8⁻) e da linfociti T citotossici (CD4⁻CD8⁺), le molte altre sottopopolazioni linfocitarie sono assenti o in minime percentuali prima della nascita. (Butler et al., 2006 a). Ancora più precocemente si può osservare la presenza dei linfociti T γ/δ a 40 giorni di gestazione, infatti questa sottopopolazione è la più precocemente distinguibile. (Butler et al., 2006 a)

Durante la vita neonatale il numero di linfociti tende ad aumentare. Si osserva che alla nascita i livelli dei linfociti T CD8⁺ e le cellule doppio positive sono bassi, si osserva poi però un forte aumento tra il

19° e il 41° giorno di vita. Alla nascita le cellule CD4 sono più numerose rispetto alle CD8+ che però incrementano significativamente nel periodo post svezzamento. Anche i linfociti T γ/δ , maggiormente coinvolti nella risposta immunitaria innata, mostrano lo stesso andamento delle cellule T CD8+, dalla nascita fino al giorno 41 di vita.

Le cellule T CD4+CD8- si rivelano la popolazione più rappresentata nei suinetti pre-colostrali e nei primi giorni dopo la nascita; i livelli si riducono poi nella prima e nella quarta settimana fino a raggiungere valori circa tre volte inferiori; dopo la quarta settimana mantengono valori comparabili a quelli riscontrati nel suino adulto (Ferrari et al., 2006).

I valori di questa sottopopolazione rimangono superiori a quelli relativi alle cellule CD4-CD8+ fino a circa la terza settimana di vita, oltre la quale si assiste ad un'inversione del rapporto. (Ferrari et al., 2006). Per quanto riguarda i livelli di cellule CD4+CD8+, indicatori di citotossicità naturale e specifica (NK, TCL) aumentano gradualmente seppure persistendo a livelli più bassi rispetto alle cellule CD4+CD8-, per le prime tre settimane di vita. L'aumento più significativo si osserva alla quarta settimana di vita (Ferrari et al., 2006), nel periodo delle vaccinazioni ai cambiamenti ambientali e alle stimolazioni antigeniche associate allo svezzamento. La sottopopolazione CD4-CD8+ raggiunge valori comparabili a quelli del suino adulto solo nel periodo post-svezzamento (Ferrari et al., 2006).

Il risultato di questo studio supporta l'idea che l'infezione precoce da PRRSV nei suinetti, in cui lo sviluppo del sistema immunitario è ancora in atto, sia in grado di influenzare negativamente la produzione, maturazione nonché attivazione delle cellule T naive con conseguente effetto sulla risposta immunitaria cellula-mediata verso altri patogeni. Un'ipotesi patogenetica è che le cellule APCs (Antigen Presenting Cells) infettate da PRRSV, nel timo di feti e di animali neonati, interagisca con i timociti determinandone sia fenomeni apoptotici sia una conseguente alterata produzione di citochine ed altri fattori di trascrizione, compromettendo il corretto sviluppo delle cellule T rispetto ad animali della stessa età non infetti (Butler et al., 2014).

Oltre ad un effetto diretto sul timo è noto che PRRSV è in grado di mettere in atto altri meccanismi di immunodepressione.

Dopo l'infezione sia dei linfociti T immaturi sia delle APCs (Antigen Presenting Cells) i due potenziali meccanismi che utilizza il virus della PRRS, che si verificano nelle prime settimane di vita o ancora in utero, potrebbero essere l'induzione della tolleranza antigenica e l'aumento delle cellule T regolatorie (Treg CD4+CD25+FoxP3+) dopo l'infezione PRRSV (Buther et al., 2014; Silva-Campa et al., 2012, Ferrarini et al., 2015).

La presentazione antigenica di PRRSV nel timo può indurre tolleranza intesa come perdita di cellule naïve che se attivate correttamente potrebbero riconoscere il virus e promuovere la clearance del patogeno. L'infezione da PRRSV è noto aumenti la frequenza di un'altra sottopopolazione linfocitaria, i linfociti T regolatori/soppressori (T_{reg} CD4+CD25+FoxP3+) che fisiologicamente sono destinate allo spegnimento dell'attività immunitaria una volta eliminato il patogeno, ma in presenza di PRRSV vengono attivate e svolgono la loro attività di spegnimento immunitario troppo precocemente producendo citochine antinfiammatorie come TGF- β e IL-10 e causando dunque una down-regulation dell'attività del sistema immunitario, dato correlato con i valori della viremia (Silva-Campa et al., 2012)

In conclusione, i dati ottenuti da questo studio evidenziano il negativo impatto che il virus della PRRS può avere sulla risposta immunitaria cellulo-mediata nelle prime settimane di vita dei suinetti

Le indagini effettuate in questo studio evidenziano che la risposta cellulo-mediata indotta dalla vaccinazione verso PCV2, in termini di cellule PCV2 specifiche secernenti IFN- γ è inibita negli animali infetti da PRRSV e che quindi PRRSV può influenzare negativamente l'attivazione della risposta immunitaria indotta da vaccinazione verso altri antigeni/patogeni come PCV2.

Si potrebbe ipotizzare che il virus della PRRS sottragga/distrugga alcune sottopopolazioni facenti parte della risposta immunitaria utilizzando i meccanismi precedentemente citati, quali: infezione di linfociti immaturi nel timo, infezione di cellule APC nel timo, azione tollerogena, induzione di linfociti T regolatori.

In sintesi questo studio ha portato a ritenere che:

- I bassi valori anticorpali ($p < 0.05$) nei confronti di PCV2 del gruppo Vaccinato PCV2-PRRSV viremico già al periodo della vaccinazione (4 settimane) è probabilmente dovuto ad una ridotta assunzione di colostro legata allo stato di viremia da PRRSV
- Indipendentemente dallo stato viremico, i dati sierologici del gruppo vaccinato PCV2 provenienti sia da ELISA sia da IPMA non mostrano differenze statisticamente significative. Di conseguenza è possibile affermare che in questo caso PRRSV non interferisce con la risposta anticorpale promossa dal vaccino PCV2.

- La risposta immunitaria cellulo-mediata, intesa come numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche nel gruppo PCV2 vaccinato PRRS viremico sembra essere compromessa, come viene infatti dimostrato dalla diminuzione del numero di cellule secernenti IFN- γ dopo la vaccinazione contro PCV2, comparata con il gruppo PCV2 vaccinato- non viremico.

6. STUDIO 3

“Modulazione fenotipica di: monociti CD14+, cellule natural killer (NK), T natural killer (NKT) e sottopopolazioni linfocitarie T CD4+ e CD8 α / β + durante stimolazione con killer peptide (KP) nella specie suina”.

6.1. Disegno sperimentale

In questo studio sono stati arruolati 10 suini (N° = 10) sani, adulti, di razza ibrida selezionati da un allevamento convenzionale. L'assenza delle maggiori infezioni virali (PRRSV e PCV2) è stata confermata mediante PCR quantitativa (qPCR) da campioni di sangue, secondo protocolli stabiliti in precedenza (Martelli P. 2013 b) e mediante sierologia è stata confermata la negatività nei confronti di PRRSV e M. hyopneumoniae.

I campioni di sangue sono stati prelevati in provette con anti-coagulante (Litio Eparina) e mantenute a temperatura ambiente fino alla processazione per l'isolamento delle PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells). Il peptide killer (KP), in forma liofilizzata, è stato solubilizzato in DMSO (Dimetil solfossido) alla concentrazione di 20 mg/ml e successivamente diluito alle concentrazioni di interesse (40, 20, 10 μ g/ml). I valori provenienti dalla stimolazione delle PBMC con KP sono stati comparati con PBMC non stimulate (controllo negativo).

6.2. Parametri valutati

TECNICA	MATRICE	UTILIZZO
Citometria	PBMC	Fenotipizzazione linfocitaria

Una volta isolate e contate, le cellule sono state messe a contatto con KP per poter valutare l'attività immuno-modulatoria di questo decapeptide (KP) mediante citofluorimetria a flusso.

Le cellule sono state incubate con diverse concentrazioni di KP (40-20-10 µg/ml) a tre diversi tempi di stimolazione: 72 h, 48 h e 24 h. Al termine della stimolazione le cellule sono state lavate in PBS (1% FBS), marcate secondo protocollo (Cap. materiali e metodi) con gli specifici Ab e successivamente analizzate mediante citofluorimetro.

Questa tecnica è stata quindi sfruttata al fine di saggiare l'attività immuniomodulatoria di KP discriminando quali sottopopolazioni linfocitarie potessero essere coinvolte durante la stimolazione in vitro con questo peptide.

TECNICA	CONDIZIONI	TEMPI (h)	OGGETTO dello STUDIO
Citometria	Cell + 40µg/ml KP Cell + 20µg/ml KP Cell + 10µg/ml KP Cellule	24, 48, 72 h 24, 48, 72 h 24, 48, 72 h	-Cellule citotossiche totali: CD8α+ -Linfociti T helper (Th): CD4+CD8α- -Linfociti T citotossici (Tct): CD4-CD8β+ -Linfociti T helper memoria CD4+CD8α+ ^{low} -NK: CD3-CD16+ -NKT: CD3+CD16+ -Monociti: CD172α+CD14+ ^{high} CD172α+CD14+ ^{low}

Tab. n° 1: Tabella riassuntiva delle tecniche, delle condizioni di KP, dei tempi di stimolazione e delle sottopopolazioni linfo/monocitarie.

6.3. Risultati

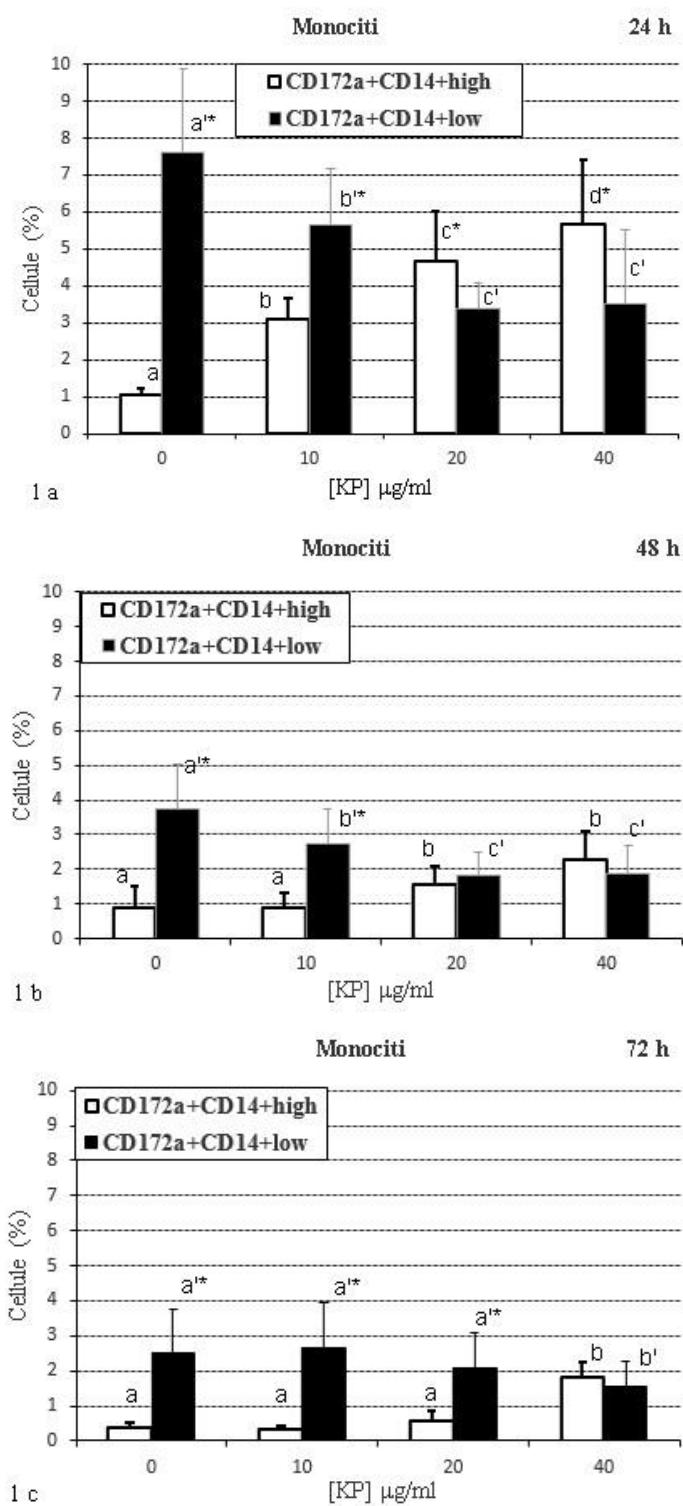


Fig. 1: Sottopopolazioni monocitarie post-stimolazione con KP rispettivamente a 24 (1 a), 48 (1 b), e 72 (1 c) ore.

Dai grafici rappresentanti la stimolazione monocitaria con KP alle tre diverse concentrazioni (10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) ed il controllo negativo non stimolato (Fig. 1 a, b, c) si osserva che il controllo non trattato con il peptide o con un scramble peptide mostra una maggior percentuale di monociti a fenotipo $\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{low}}$ rispetto al fenotipo $\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{high}}$ che appare molto poco espresso.

Dalla fig. 1 a si evidenzia che il KP induce un'intensa risposta caratterizzata da una diminuzione delle cellule monocitarie a fenotipo $\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{low}}$ contemporaneamente ad un aumento di cellule a fenotipo $\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{high}}$ ($p < 0.05$), soprattutto dopo 24 ore di stimolazione (Fig. 1 a).

Dopo 48 e 72 ore di stimolazione (Fig. 1 b, c) con KP si può osservare lo stesso andamento per quanto riguarda i due fenotipi ($\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{low}}$ $\text{CD172}\alpha+\text{CD14}^{\text{high}}$) anche se tale differenza appare meno marcata alle concentrazioni maggiori di KP (20 e 40 $\mu\text{g/ml}$).

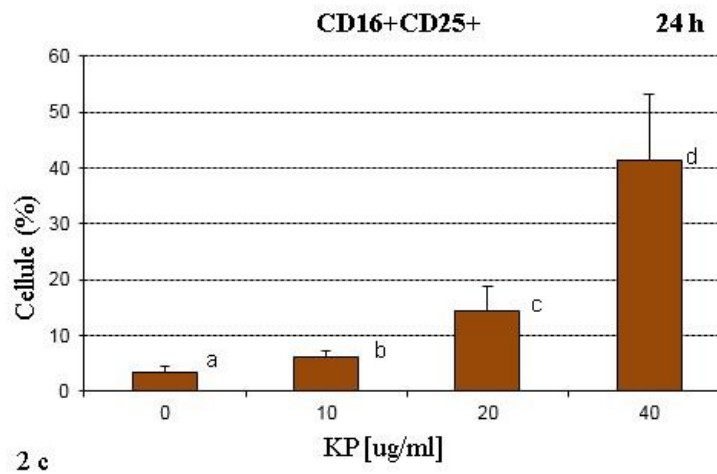
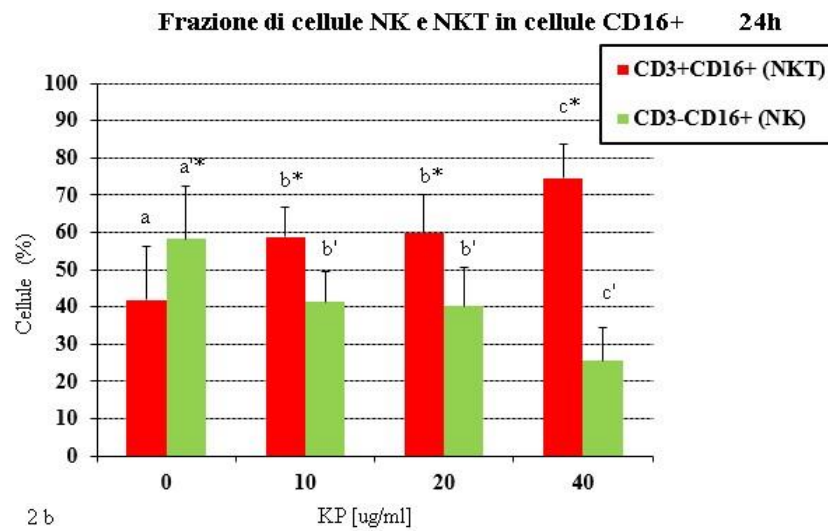
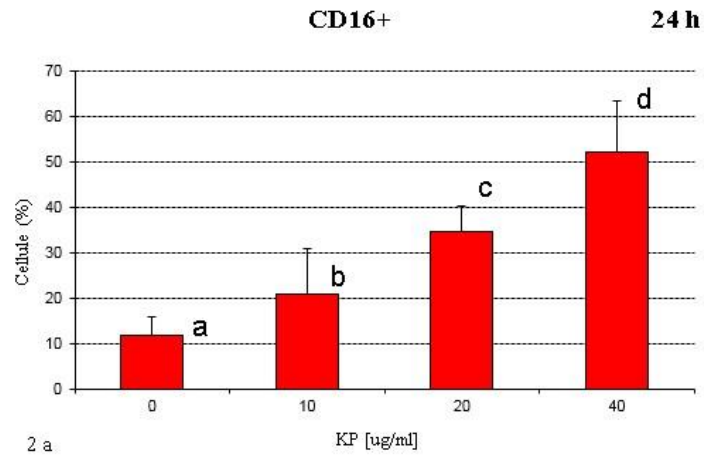


Fig. 2 a, b, c: Cellule CD16 (NK e NKT), CD3-CD16+ (NK), CD3+CD16+ (NKT), CD16+CD25+ (NK e NKT attivate) dopo 24 ore di stimolazione con KP

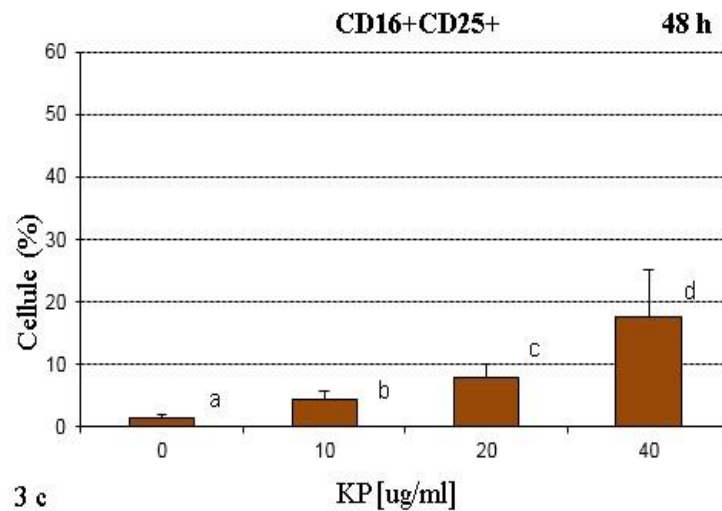
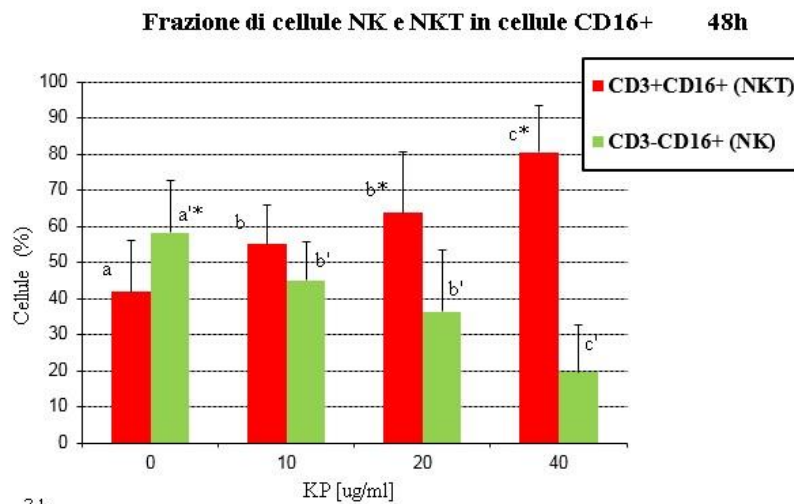
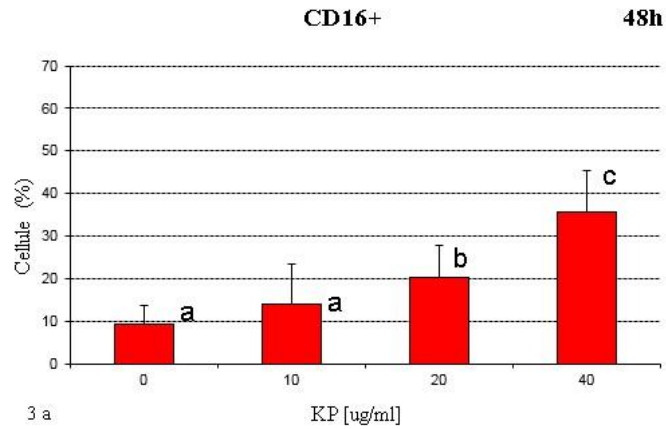


Fig. 3 a, b, c: Cellule CD16 (NK e NKT), CD3-CD16+ (NK), CD3+CD16+ (NKT), CD16+CD25+ (NK e NKT attivate) dopo 48 ore di stimolazione con KP

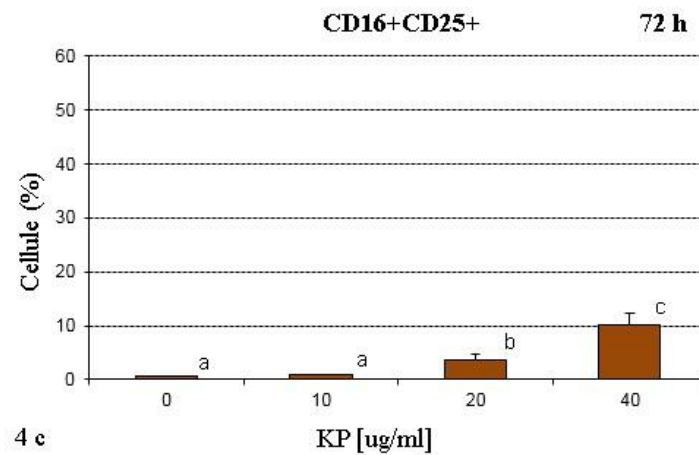
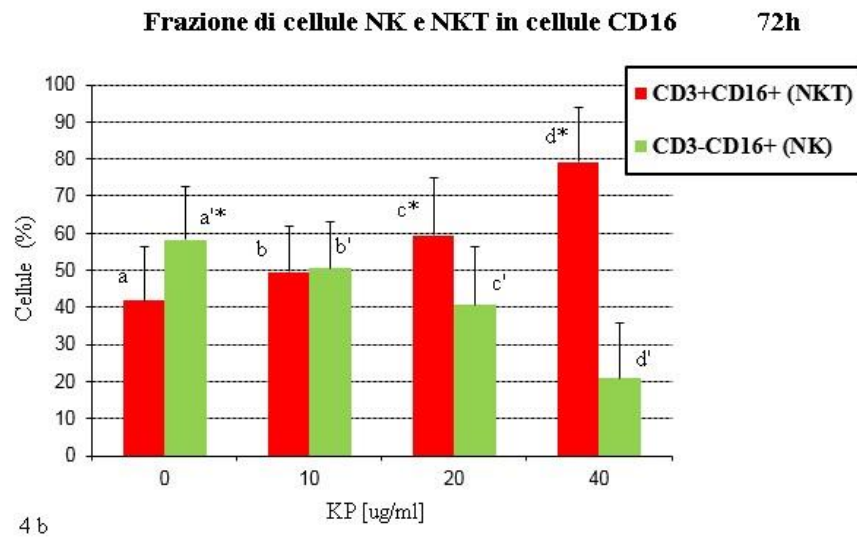
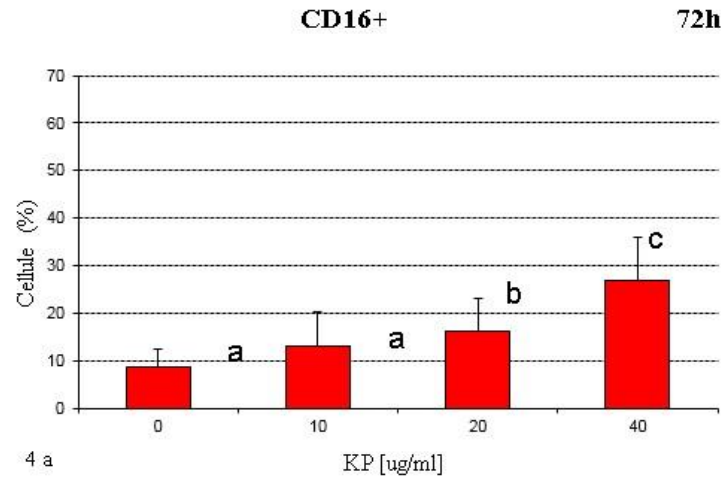


Fig. 4 a, b, c: Cellule CD16 (NK e NKT), CD3-CD16+ (NK), CD3+CD16+ (NKT), CD16+CD25+ (NK e NKT attivate) dopo 72 ore di stimolazione con KP

Dalle Figure 2, 3, 4 relativamente alle cellule a fenotipo CD16⁺, CD3⁺CD16⁺/CD3⁻CD16⁺ e CD16⁺CD25⁺, si nota che durante la stimolazione con KP la percentuale di cellule a fenotipo CD16⁺ mostra un forte aumento dose-dipendente ($p < 0.05$) durante tutti e tre i tempi testati (24, 48 e 72 ore).

Anche in questo caso la risposta più intensa si osserva dopo 24 ore di stimolazione con KP con il maggior livello di espressione alla concentrazione di 40 µg/ml di peptide. Questo andamento è risultato statisticamente significativo a ciascun tempo testato.

Questa modulazione positiva determinata dal KP sul fenotipo CD16 è causata rispettivamente da un aumento, sempre dose-dipendente, del fenotipo CD3⁺CD16⁺ che corrisponde alla frazione cellulare NKT ed ad una diminuzione del fenotipo CD3⁻CD16⁺ a cui corrisponde la frazione cellulare NK.

Per quanto riguarda lo stato di attivazione della popolazione CD16 in termini di espressione di CD25 (catena α del recettore di IL-2) si osserva anche in questo caso un andamento dose-dipendente, con un'intensa risposta a 40 µg/ml, maggiormente indotta dopo 24 ore di stimolazione con KP, rispetto al controllo cellulare non stimolato. Ai successivi tempi di stimolazione si osserva una diminuzione della risposta per entrambe le sottopopolazioni.

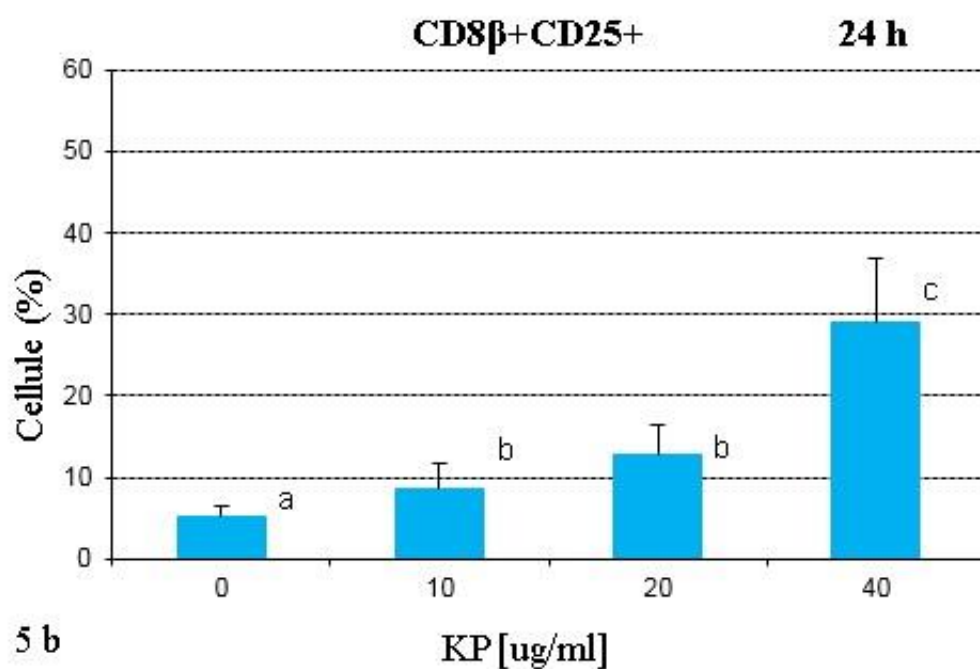
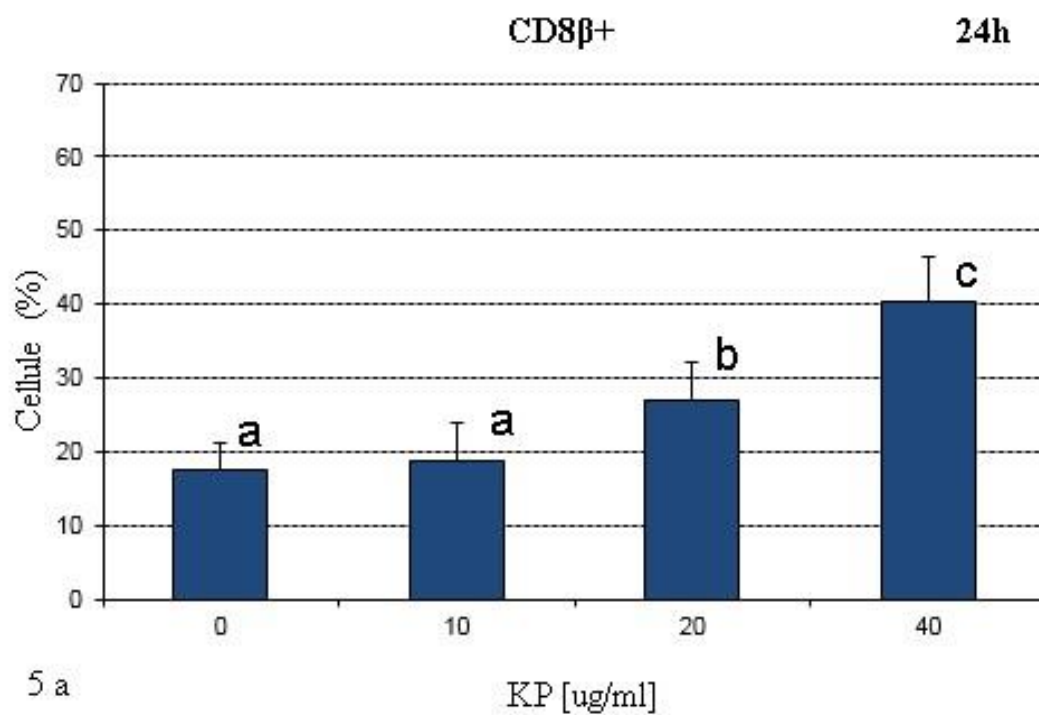


Fig. 5 a, b: Cellule CD8 β (Linfociti T citotossici) CD8 β +CD25+ (Linfociti T citotossici attivati) dopo 24 ore di stimolazione con KP

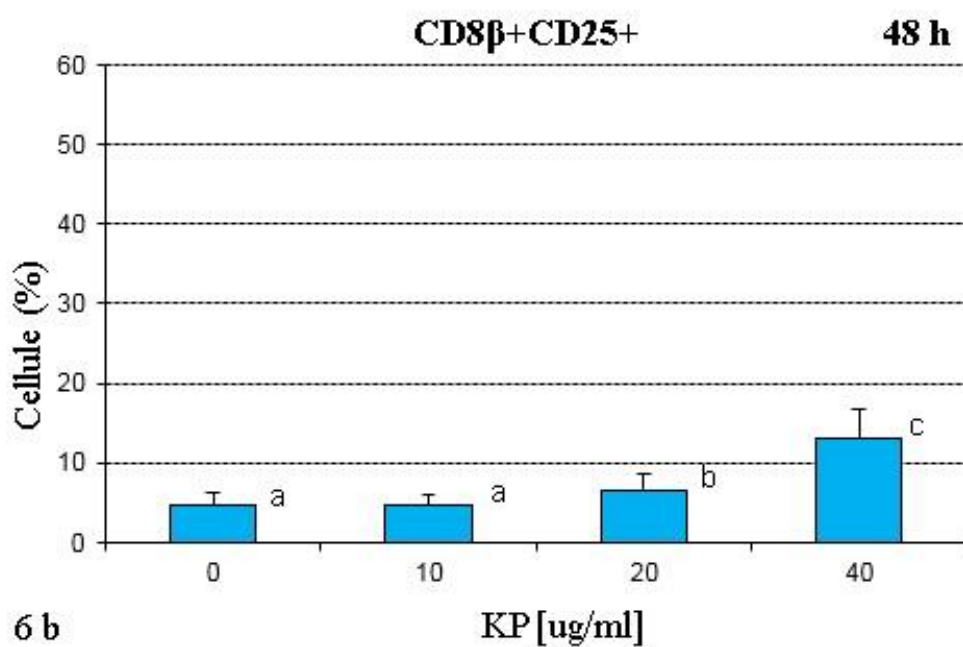
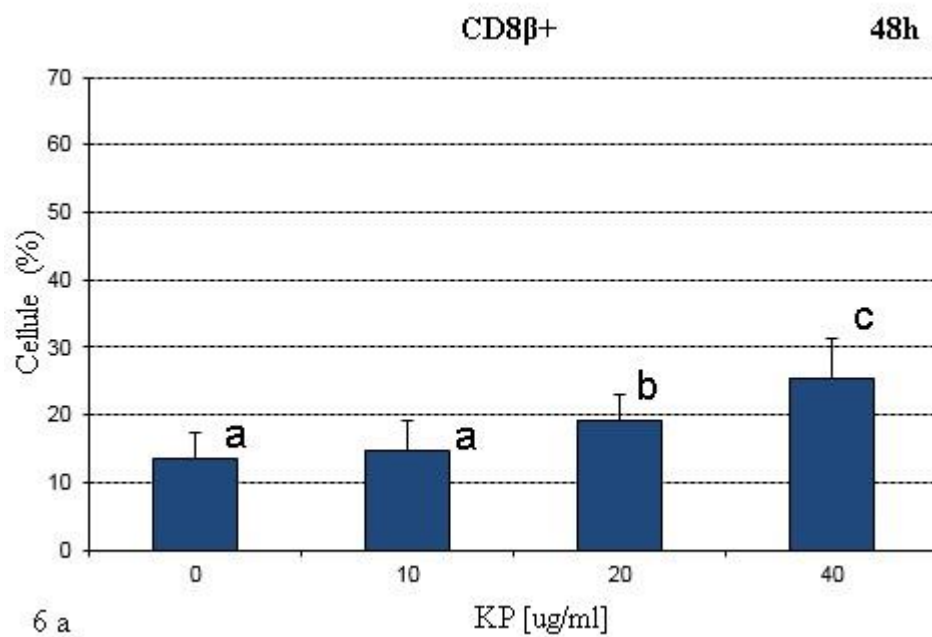


Fig. 6 a, b: Cellule CD8 β (Linfociti T citotossici) CD8 β +CD25+ (Linfociti T citotossici attivati) dopo 48 ore di stimolazione con KP

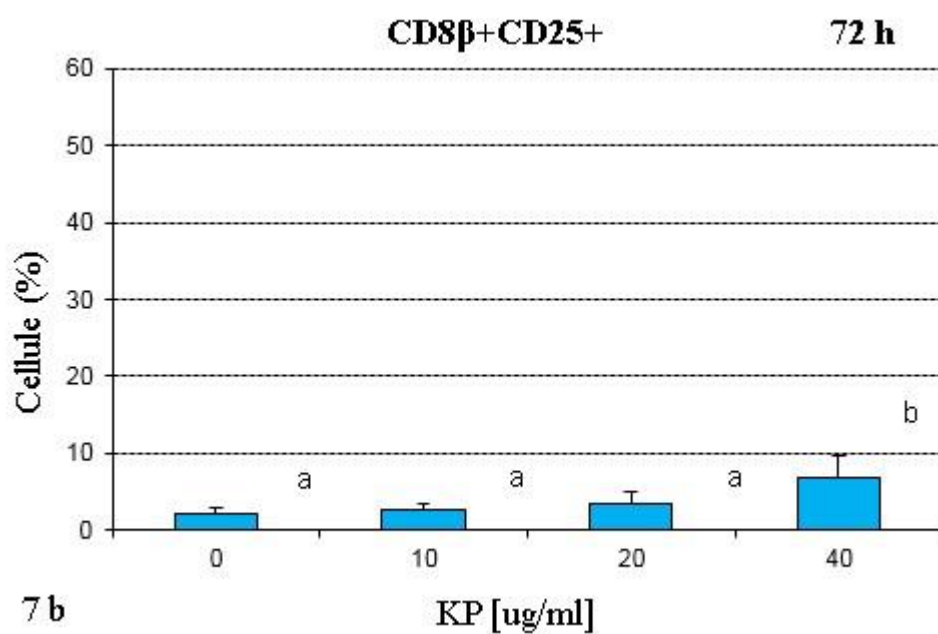
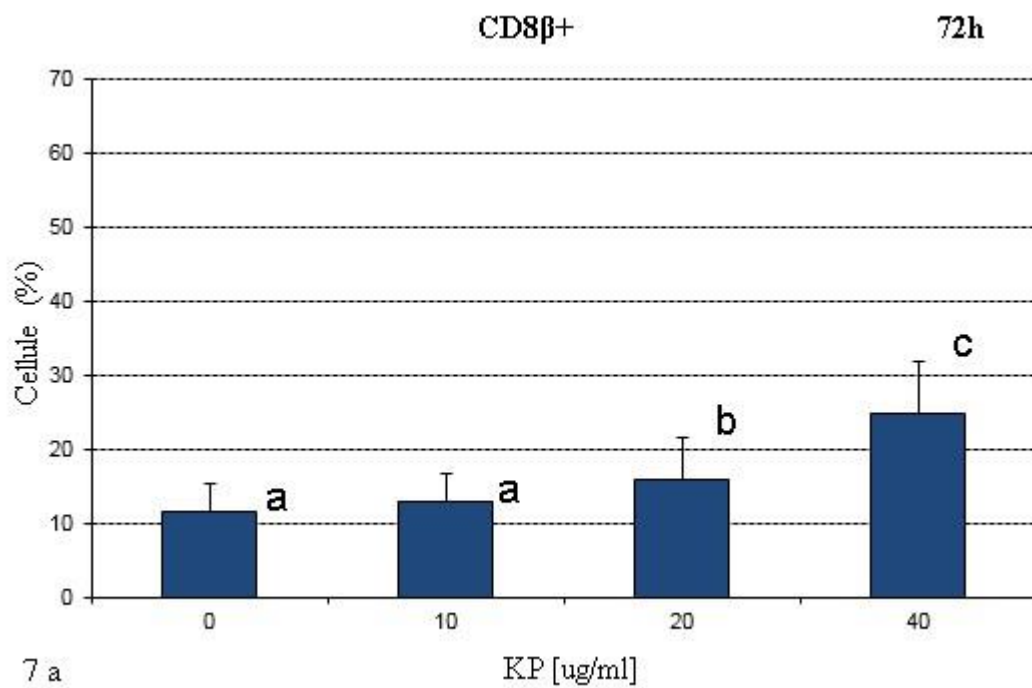


Fig. 7 a, b: Cellule CD8 β + (Linfociti T citotossici) **CD8 β +CD25+** (Linfociti T citotossici attivati) dopo 72 ore di stimolazione con KP

Nelle Figure 5, 6 e 7 è mostrato l'andamento delle marcature CD8 β + e CD8 β +CD25+ che codificano rispettivamente per la frazione di cellule citotossiche e citotossiche attivate. Si può osservare l'aumento della percentuale della sottopopolazione linfocitaria CD8 β + a tutti e tre i tempi considerati durante lo studio ($p < 0.05$) sempre in maniera dose-dipendente.

Come per il CD16, la più intensa risposta si osserva dopo 24 ore di stimolazione con KP (Fig. 5 a). Anche in questo caso l'attivazione di questa sottopopolazione in termini di espressione di CD25 appare dose-dipendente con una maggior induzione a 24 ore di stimolazione con il peptide (Fig. 5 b).

Durante gli altri tempi si osserva un drastico calo della risposta in termini di espressione del fenotipo attivato (CD8 β +CD25+) (Fig 6 b, 7 b).

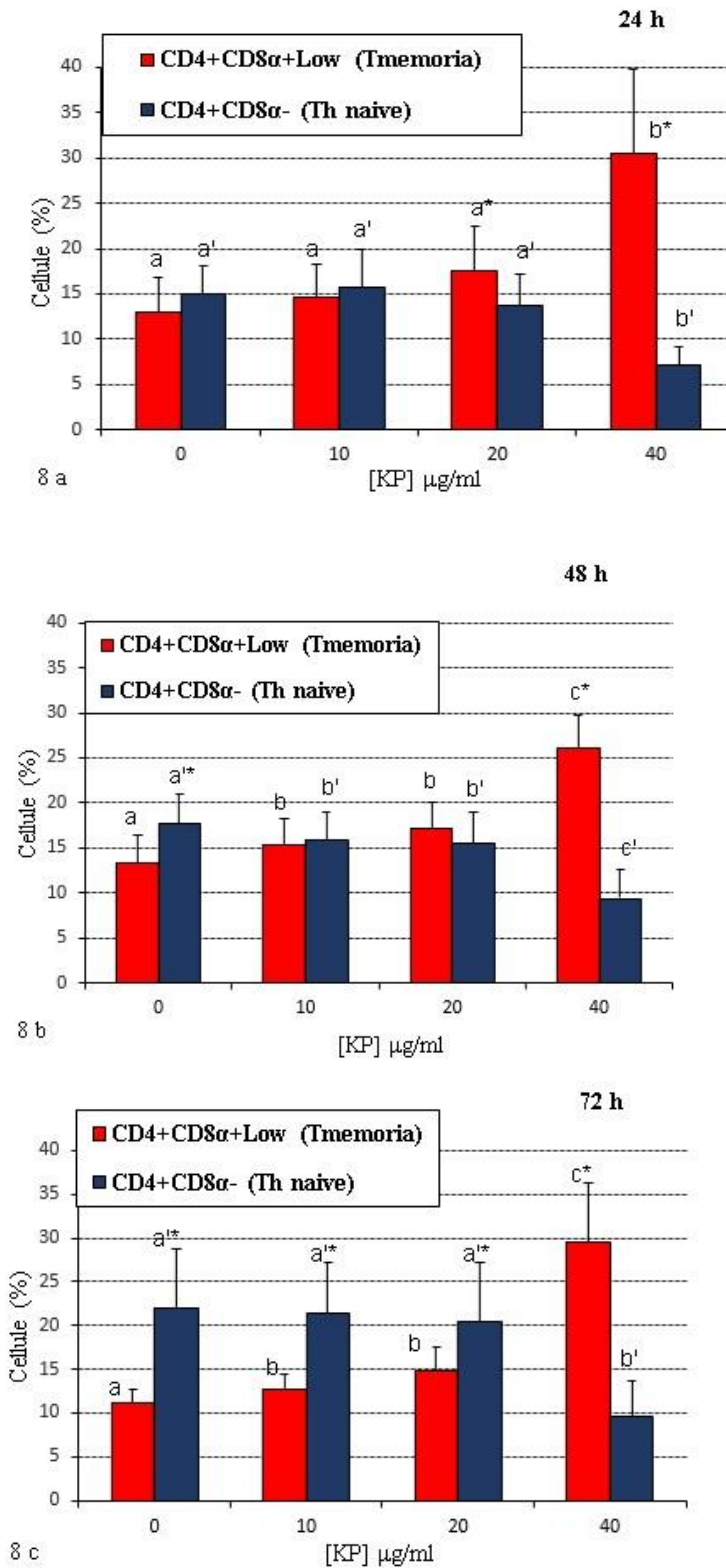


Fig. 8 a, b, c: Cellule CD4+CD8 α^{+low} (T helper memoria) e CD4+CD8 α^{-} (T helper naïve) rispettivamente dopo 24, 48 e 72 ore di stimolazione con KP

Nelle Figure 8 a, b, c sono mostrati gli andamenti di due sottopopolazioni linfocitarie, T memoria ($CD4+CD8\alpha^{low}$) e T helper naïve ($CD4+CD8\alpha^{-}$) con i tre diversi tempi di stimolazione (24, 48 e 72 ore) e le tre diverse concentrazioni di KP testate 40, 20, 10 $\mu g/ml$ ed il controllo negativo.

Si può evidenziare che in tutti e tre i tempi testati, le stimolazioni con KP determinano delle modulazioni positive nelle suddette sottopopolazioni linfocitarie, correlati all'aumento delle concentrazioni di KP, nello specifico con un forte incremento statisticamente significativo a 40 $\mu g/ml$ ($p < 0.05$).

Contemporaneamente si nota che l'aumento delle cellule $CD4+CD8\alpha^{low}$ a 40 $\mu g/ml$ è associato ad una significativa riduzione di $CD4+CD8\alpha^{-}$ cioè all'aumentare di una sottopopolazione ($CD4+CD8\alpha^{+}$), diminuisce l'altra ($CD4+CD8\alpha^{-}$) durante tutti i tempi testati.

Questo innalzamento è quindi dovuto ad un'acquisizione del fenotipo $CD8\alpha^{+}$ da parte della sottopopolazione $CD4+CD8\alpha^{-}$ (Th naïve) che si trasforma così da sottopopolazione a fenotipo helper naïve in sottopopolazione a fenotipo memoria.

6.4. Discussione

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, su PBMC suine, quali fossero gli effetti del peptide killer (KP) nel mediare un'attività antimicrobica ad ampio spettro e quali fossero le sue proprietà immunomodulatorie. Gli effetti di KP sulle PBMC sono stati valutati mediante citometria a flusso, caratterizzando sottopopolazioni cellulari sia dell'immunità innata che dell'immunità adattativa durante stimolazione in vitro per 24, 48 e 72 ore.

Diversi studi condotti su KP hanno dimostrato che questo decapeptide è in grado di svolgere effetti benefici nei confronti di infezioni causate da funghi, come *C. albicans*, *P. brasiliensis*, *C. neoformans*, *M. pachydermatis* e virus come il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e il virus dell'influenza umana.

Per quanto riguarda le infezioni fungine da *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *C. neoformans* è stato dimostrato che KP gioca un forte effetto candidicida sia in vitro che in vivo, sostenendo la protezione in modelli murini e di ratto contro candidosi sistemica sia in animali immunocompetenti che gravemente immunocompromessi (SCID) (Polonelli L. et al., 2003, Travassos et al., 2004).

Nei topi, è stato dimostrato che gli effetti immunomodulatori di KP coinvolgevano il legame con cellule dendritiche (DCs) e in secondo luogo con macrofagi mediante molecole tra cui SIGN-R1, MHC-II, CD16 / CD32; il legame con DCs induce up-regulation dei co-recettori CD8 α , CD80 e CD40, e sostiene la proliferazione dei linfociti CD4⁺ che potrebbe essere il meccanismo cardine nella risposta immunitaria Th1.

Tuttavia, KP è stato dimostrato non legarsi significativamente a neutrofili e linfociti T CD4 + (Cenci et al., 2006).

A causa delle quantitativamente scarse conoscenze in letteratura riguardo l'attività di KP, questo studio si è dato l'obiettivo di investigare su quali altre sottopopolazioni cellulari immunitarie, KP potesse avere un'attività stimolatoria/attivatoria o inibitoria.

Per quanto riguarda la sottopopolazione linfocitaria, identificata dall'espressione del pan monocitario CD172 α e del marker CD14, il KP ha mostrato indurre una forte modulazione di questa sottopopolazione.

I risultati ottenuti dimostrano che i monociti sono particolarmente responsivi dopo 24 ore di interazione/stimolazione aumentando in questo modo l'espressione di CD14, trasformandolo in CD14^{high} evento che si verifica durante un "pathway" di differenziazione.

E' stato dimostrato che, diversamente dalla sottopopolazione CD14^{low}, quella CD14^{high} ha un discreto numero di geni fortemente espressi quali: IL-8/IL-8RB/R2, S100 calcium binding protein A8 (S100A8), chemokine receptor-1/2 (CCR1/2), IL-18; ma anche geni meno espressi come CD16, CD163, lymphotoxin- β (LTB), G-CSF and macrophage scavenger receptor-1 (MSR1).

I monociti CD14^{high} sono in grado di indurre il richiamo di neutrofili ed altre cellule immunitarie nel sito di infiammazione. Al contrario i CD14^{low} esprimono fortemente i geni che codificano per CD163 and SLA-II e potrebbero dunque essere coinvolti nella presentazione antigenica come se fossero delle APCs (Antigen Presenting Cells) (Fairbairn L. et al, 2013).

Si può dunque affermare che lo shift fenotipico monocitario indotto da KP potrebbe svolgere un importante ruolo nel sostenere dapprima la risposta innata/infiammatoria e indirettamente sulla risposta immunitaria adattativa.

Infine, poichè CD14^{high} promuove l'attivazione della risposta immunitaria ed ha una bassa/assente espressione di CD163 (CD163^{low/-}), la stimolazione con KP potrebbe influenzare l'uptake antigenico ed anche alcuni i meccanismi di interazione tra cellule bersaglio e virus.

Cenci e colleghi hanno dimostrato che nel topo, il KP interagisce selettivamente con le DCs mediante legami con recettori di superficie come CD16/32, MHC-II and SIGN-R1 e promuove l'espressione di molecole co-stimolatorie come CD8 α , CD80 and CD40 (Cenci et al., 2006).

Si potrebbe dunque ritenere che, come KP si lega a specifiche molecole sulla superficie di DCs e monociti di topo allora potrebbe influenzare la modulazione dei monociti suini mediante legame e successiva internalizzazione.

Per quanto riguarda CD16 i risultati hanno dimostrato che KP induce una forte modulazione delle sottopopolazioni valutate esprimenti questo marker (cellule NK e NKT), sottopopolazioni coinvolte nella citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC).

Le cellule esprimenti CD16 mostrano una forte stimolazione dose dipendente, ciò è determinato da un aumento della frazione CD3+CD16+ (NKT). La suddetta frazione è noto partecipi sia a meccanismi molecolari di controllo innato contro patogeni come batteri, virus, funghi e parassiti sia nella risposta adattativa cellulo-mediata attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatorie (Denyer MS et al., 2006; Artiaga BL et al 2014).

L'aumento della co-espressione di CD16 e D25 risulta fortemente evidente dopo 24 ore di stimolazione rispetto ai tempi successivi.

Il CD25, quale marker di attivazione della risposta immunitaria, è stato utilizzato per identificare le sottopopolazione attivate in presenza di KP. Dai risultati è stato dimostrato che KP ha la capacità di attivare precocemente CD16 e di mantenere attivata questa sottopopolazione fino a 72 ore post stimolazione con 40 µg/ml of KP.

L'aumento dose-dipendente delle frazioni CD8 β + e CD8 β +CD25+ dimostra che KP promuove una significativa attivazione della sottopopolazione dei linfociti T citotossici (CTL).

In letteratura, nella specie suina il fenotipo CD4+CD8+ è associato ad una sottopopolazione linfocitaria nota come cellule T memoria (Saalmüller A et al., 2002; Revilla C et al., 2005) composte sia dal

fenotipo $CD8\alpha\alpha$ che dal fenotipo $CD8\alpha^{high}\beta$ [$CD4+CD8\alpha\alpha$ (sottopopolazione T helper memoria) e $CD4+CD8\alpha^{high}\beta$ (sottopopolazione T citotossiche)].

Riguardo la frazione doppio positiva $CD4+CD8\alpha+$ sono stati notati alti livelli di espressione di $CD8\alpha$, andamento associato ad un intensa diminuzione della frazione $CD4+CD8\alpha-$ alla concentrazione di 40 $\mu\text{g/ml}$. E' stato ipotizzato che l'attivazione di $CD8\alpha$ potrebbe indurre l'espressione di $CD4$ facendo così acquisire il fenotipo doppio positivo alla frazione $CD4-CD8\alpha^{+high}$, fenotipo associato all'aumento dell'espressione di $\text{IFN-}\gamma$ e Fas ligand come riportato nell'uomo e nel topo (Kitchen SG et al., 2005; Gerner W et al., 2015).

In sintesi, i risultati riguardanti la marcatura $CD4+/CD8\alpha+$ dimostrano che KP ha la capacità di modulare sia il fenotipo T helper che T citotossico nei seguenti modi:

- 1) Inducendo le cellule T helper ad acquisire $CD8\alpha$ diventando quindi doppie positive ($CD4+CD8\alpha+$);
- 2) Inducendo il fenotipo Tct ($CD4-CD8\alpha^{+high}$) ad acquisire il fenotipo doppio positivo ($CD4+CD8\alpha^{+high}$).

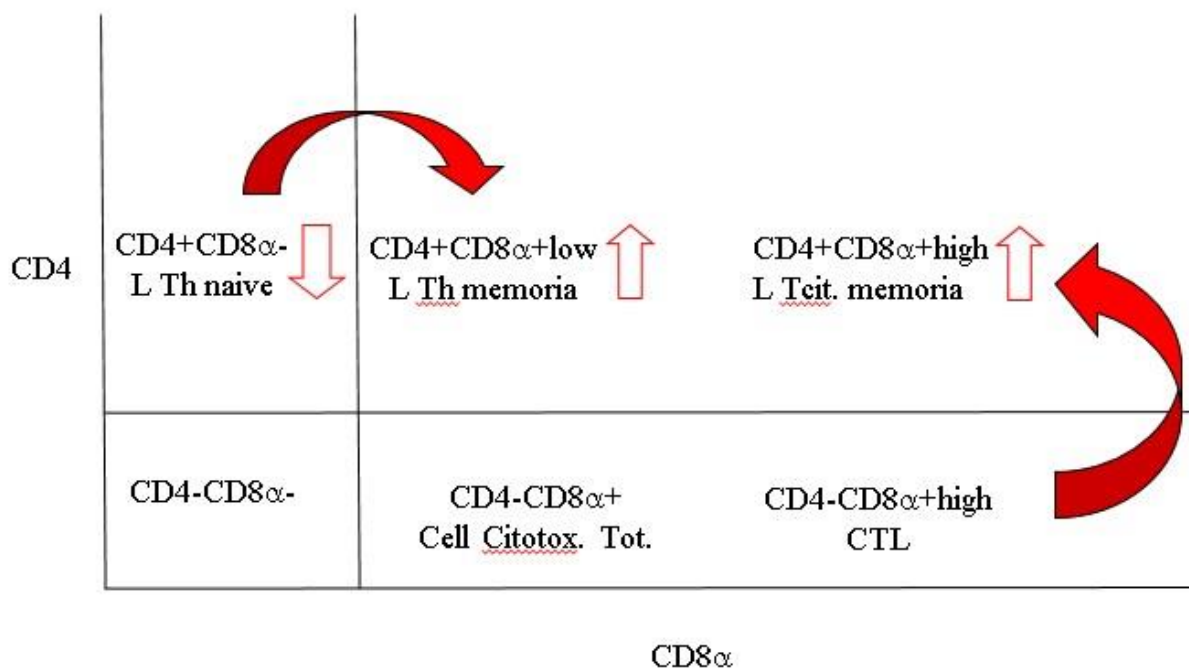


Fig. 9: Induzione/modulazione delle specifiche sottopopolazioni linfocitarie dopo stimolazione con KP

7. CONCLUSIONI

Il lavoro di ricerca presentato nella presente tesi è stato articolato in tre studi principali.

I primi due studi sono stati condotti nell'ambito del lavoro di ricerca relativo all'infezione naturale da PRRSV e, nello specifico, sono rivolti alla caratterizzazione di come il virus può modulare e influenzare lo sviluppo e l'attivazione della risposta immunitaria o (PRRSV) in suini infettati in condizioni di campo.

Il terzo studio presentato ha riguardato la valutazione *in vitro* dell'attività attivatoria/stimolatoria di un peptide (KP) sulle cellule linfocitarie e monocitarie (PBMC) di suino al fine di avere una prima valutazione funzionale *in vitro* per una successiva valutazione in presenza di infezione virale (i.e. PRRSV).

Dai dati ottenuti dal primo studio, intitolato “*Associazione di cellule memoria, cellule citotossiche e cellule secernenti IFN- γ nella risposta immunitaria in corso di infezione naturale da Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRSV)*”, confrontati con gli articoli in letteratura è stato possibile concludere che:

- 1) L'attivazione della risposta immunitaria cellulo-mediata verso PRRSV appare ritardata durante l'infezione da PRRSV.
- 2) L'andamento della risposta immunitaria cellulo-mediata in termini di IFN- γ SC e dei cambiamenti delle sottopopolazioni linfocitarie mostra comunque degli incrementi nel tempo.
- 3) Gli andamenti delle diverse sottopopolazioni immunitarie cellulari appaiono associati ai livelli di IFN- γ SC PRRSV-specifiche e ciò seppur indirettamente, potrebbe sostenere il ruolo di tali sottopopolazioni linfocitarie nella produzione/secrezione specifica di una citochina immunoattivatrice fondamentale come l'IFN- γ .

Questi dati inoltre evidenziano ed ulteriormente confermano che la maggior età degli animali alla comparsa dell'infezione e, come tipicamente ipotizzato nell'infezione da PRRSV, le differenti caratteristiche immunobiologiche dell'isolato di campo, possano influenzare l'andamento qualitativo e qualitativo della risposta cellulo-mediata durante l'infezione naturale da PRRSV.

Il secondo studio, dal titolo “*Valutazione della risposta immunitaria nei confronti di una vaccinazione contro PCV2 in suini riscontrati PRRSV viremici e non viremici alla vaccinazione*” ha portato alla luce tre importanti punti:

- I bassi valori anticorpali ($p < 0.05$) nei confronti di PCV2 del gruppo Vaccinato PCV2-PRRSV viremico già al periodo della vaccinazione (4 settimane) è probabilmente dovuto ad una ridotta assunzione di colostro legata allo stato di viremia da PRRSV
- Indipendentemente dallo stato viremico, i dati sierologici del gruppo vaccinato PCV2 provenienti sia da ELISA sia da IPMA non mostrano differenze statisticamente significative. Di conseguenza è possibile affermare che in questo caso PRRSV non interferisce con la risposta anticorpale promossa dal vaccino PCV2.
- La risposta immunitaria cellulo-mediata, intesa come numero di cellule secernenti IFN- γ PCV2 specifiche nel gruppo PCV2 vaccinato PRRSV viremico sembra essere compromessa, come viene infatti dimostrato dalla diminuzione del numero di cellule secernenti IFN- γ dopo la vaccinazione contro PCV2, comparata con il gruppo PCV2 vaccinato- non viremico.

I dati evidenziano ed ulteriormente sostengono il ruolo inibitorio del virus della PRRSV sullo sviluppo ed attivazione della risposta immunitaria e come un'infezione naturale ad età precoci possa influenzare negativamente la risposta immunitaria ad altri patogeni/antigeni.

Infine il terzo studio riguardante l'attività di KP su PBMC suine, intitolato “*Modulazione fenotipica di: monociti CD14⁺, cellule natural killer (NK), T natural killer (NKT) e sottopopolazioni linfocitarie T CD4 e CD8 α/β ⁺ durante stimolazione con killer peptide (KP) nella specie suina*”, ha messo in luce quali sottopopolazioni linfocitarie sono sensibili alla stimolazione con KP e nello specifico è stata possibile osservare che:

- 1) La sottopopolazione monocitaria è particolarmente responsiva dopo 24 ore di interazione/stimolazione con KP aumentando l'espressione del marker CD14, trasformandolo in CD14^{high}, evento che si verifica durante un pathway di differenziazione. Poiché i monociti CD 14^{high} sono in grado di indurre il richiamo di neutrofili ed altre cellule immunitarie nel

sito di infiammazione è possibile affermare che lo shift fenotipico monocitario indotto da KP potrebbe influenzare un ottimale sostegno della risposta innata/infiammatoria;

- 2) La marcatura CD3 CD16 che identifica due diverse sottopopolazioni cellulari (CD3+CD16+ NKT; CD3-CD16+ NK) dopo stimolazione con KP risulta propensa verso un aumento della sottopopolazione CD3+CD16+ NKT coincidente con una diminuzione della sottopopolazione CD3-CD16+ NK, entrambe coinvolte sia nel fenomeno di citotossicità cellulare mediata da anticorpi (ADCC) sia in meccanismi molecolari di controllo innato contro patogeni come batteri, virus, funghi e parassiti sia nella risposta adattativa cellulo-mediata attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatorie (Denyer MS et al., 2006; Artiaga BL et al 2014). La marcatura CD16 CD25 ha evidenziato l'effettiva attivazione delle due sottopopolazioni CD16+ incrementando la possibilità che KP determini l'attivazione della citotossicità di queste due sottopopolazioni. L'aumento di citotossicità è stato anche confermato da un aumento della percentuale di cellule che esprimevano il marker di citotossicità CD8 β che identifica il pool di cellule citotossiche. In conclusione si può ritenere che KP promuova l'attività citotossica di alcune popolazioni cellulari facenti parte della risposta immunitaria.
- 3) I risultati riguardanti la marcatura CD4+/CD8 α + hanno dimostrato che KP ha la capacità di modulare sia il fenotipo T helper che T citotossico nei seguenti modi:
 - Inducendo le cellule T helper ad acquisire CD8 α diventando quindi doppio positive (CD4+CD8 α +);
 - Inducendo il fenotipo Tct (CD4-CD8 α +^{high}) ad acquisire il fenotipo doppio positivo (CD4+CD8 α +^{high}).

I dati ottenuti potrebbero sostenere il razionale di futuri studi sul potenziale effetto di tale KP durante l'infezione di virus quali la PRRSV *in vitro*. Dopo la valutazione dell'espressione di specifici markers cellulari mediante citofluorimetria al fine di immunofenotipizzare le diverse sottopopolazioni linfocitarie, il secondo step potrebbe essere quello di andare a valutare l'espressione genica di citochine, sia pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6), pro-immunitarie (IFN- γ) e anti-infiammatorie (IL-10, TGF- β), per poter meglio inquadrare il verso di attivazione di KP, ma anche di valutare l'espressione di

fattori di trascrizione come può essere FoxP3 la cui elevata espressione viene indotta dal virus della PRRS e di molecole co-stimolatorie linfocitarie come CD28 e DC40L.

Dopo l'espressione genica è indispensabile andare a valutare anche l'effettiva produzione e successiva secrezione delle suddette citochine e fattori di trascrizione mediante tecnica ELISA, valutandone la presenza/assenza nel terreno in cui le cellule sono state a contatto con il peptide.

In questo studio sono stati valutati gli effetti di tre diverse concentrazioni di KP su PBMC dopo stimolazione durata per periodi abbastanza lunghi quali 24, 48 e 72 ore. Al fine di aumentare le conoscenze riguardo l'attività di KP sul sistema immunitario, l'obiettivo futuro sarà di valutarne l'attività a tempi di stimolazione più brevi quali 20 minuti, 1, 4 e 24 ore per poter individuare quale sia la miglior cinetica di attivazione cellulare da parte del peptide ma anche andando ad utilizzare nuove e multiple marcature per poter meglio e più finemente caratterizzare l'attivazione delle diverse sottopopolazioni linfocitarie post stimolazione con KP.

Infine tutte queste proposte di valutazione dell'attività di KP potrebbero essere valutate in presenza del virus della PRRS per poter descrivere gli effetti che KP potrebbe determinare a contatto con il suddetto virus.

Molti dunque potrebbero essere gli effetti che il decapeptide KP potrebbe esercitare sulle diverse sottopopolazioni del sistema immunitario, per questo motivo va evidenziata la necessità di impostare e attuare nuove ricerche che portino alla caratterizzazione di ciascuna "abilità" di KP e che conducano successivamente alla scoperta del migliore utilizzo che si possa fare del decapeptide sia dal punto di vista vaccinale, terapeutico oppure sotto forma di adiuvante vaccinale.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aasted B, Bach P, Nielsen J, Lind P. Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Nov;9(6):1229-34.
- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. Immunologia cellulare molecolare 2012 7^a edizione.
- Albina E, Piriou L, Hutet E, Cariolet R, L'Hospitalier R. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet Immunol Immunopathol. 1998 Feb 16;61(1):49-66.
- Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol. 1999 Feb;80 (Pt 2):307-15.
- Allende R., Laegreid W. W., Kutish G. F., Galeota J. A., Wills R. W., Osorio F. A., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection†, Journal Of Virology (2000), Vol. 74, No. 22, p. 10834-10837
- Artiaga BL, Whitener RL, Staples CR, Driver JP. Adjuvant effects of therapeutic glycolipids administered to a cohort of NKT cell-diverse pigs. Vet Immunol Immunopathol. 2014;162: 1-13.
- Baekbo, P. Proceedings of International Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Congress Ghent (Belgium) 3-5-2015.
- Balasuriya UB, MacLachlan NJ. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. Vet Immunol Immunopathol. 2004 Dec 8;102(3):107-29. Review.
- Balka G., Hornyák Á., Dán Á., Ladinig A., Biksi I., Rusvai M., PriProET based melting point analyses on PRRSV positive field samples, Molecular and Cellular Probes (2010), 1-4.
- Baum, A., Garcia-Sastre, A., 2010. Induction of type I interferon by RNA viruses:cellular receptors and their substrates. Amino Acids 38, 1283–1299.

- Baumann, A., Mateu, E., Murtaugh, M.P., Summerfield, A., 2013. Impact of genotype1 and 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon-alpha responses by plasmacytoid dendritic cells. *Vet. Res.* 44, 33.
- Bautista EM, Goyal SM, Yoon IJ, Joo HS, Collins JE. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest.* 1993 Apr;5(2):163-5
- Bautista EM, Molitor TW. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch Virol.* 1999;144(6):1191-200.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest.* 1992 Apr; 4(2):127-33.
- Benfield DA., Christopher-Hennings J., Nelson EA., Rowland RR., Nelson JK., Chase C CL., Rossow KD., Collins JE. 1997. Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proceedings of the 28th Annual Meeting American Association Swine Practitioners.* p. 455- 458.
- Benfield D.A., Nelson J., Rossow K., Rowland R.R., Lawson S.R., Steffen M., Collins M., Pathogenesis and persistence of PRRS, *Proceedings Leman Conference* (1998), 169-186.
- Beura LK, Sarkar SN, Kwon B, Subramaniam S, Jones C, Pattnaik AK, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by
- Bonneville M., O'Brien R.L., Born W.K., 2010. Gamma/Delta T cell effector: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews immunology* vol. 10.
- Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Franceschi V., Bottarelli E., Martelli P. Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34 (2011) 143–155

- Bøtner A., Strandbygaard B., Sørensen K. J., Have P., Madsen K.G., Smedegaard Madsen E., Alexandersen S. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec.* 141: 497–499.
- Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Grubman, M.J., Brough, D.E., Ettyreddy, D., Sacco, R.E., Gauger, P.C., Loving, C.L., Vorwald, A.C., Kehrli Jr., M.E., Lehmkuhl, H.D., 2009. Adenovirus-mediated expression of interferon-alpha delays viral replication and reduces disease signs in swine challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 22, 173–180.
- Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Nelson, E.A., Miller, L.C., Nicholson, T.L., Register, K.B., Grubman, M.J., Brough, D.E., Kehrli Jr., M.E., 2012. The presence of alpha interferon at the time of infection alters the innate and adaptive immuneresponses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.:* CVI 19, 508–514.
- Buddaert, W., Van Reeth, K., Pensaert, M., 1998. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 461–467.
- Butler J.E., Kehrle M.E., Immunocytes and immunoglobulins in milk, in: Ogra P.L., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., McGhee J.R., Bienenstock J. (Eds.), *Mucosal Immunology*, 3rd ed., Academic Press, New York, 2004, pp.1763–1793.
- John E. BUTLER, Marek SINKORA, Nancy WERTZ, Wolfgang HOLTMEIER, Caitlin D. LEMKE Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology *Vet. Res.* 37 (2006) 417–441 (a)
- Butler J.E., Preface, in: Butler J.E. (Ed.), *Antibody and B-cell development in vertebrates*, *Dev. Comp. Immunol.* 30 (2006) 1–17. (b)
- J. E. Butler, K. M. Lager, William Golde, Kay S. Faaberg Marek Sinkora Crystal Loving Y. I. Zhang “Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic” *Immunol Res* (2014) 59:81–108
- Cafarchia Claudia, Immediato Davide, Di Paola Giancarlo, Magliani Walter, Ciociola Tecla, Conti Stefania, Otranto Domenico, Polonelli Luciano “*In vitro* and *in vivo* activity of a killer

peptide against *Malassezia pachydermatis* causing otitis in dogs” *Medical Mycology*, 2014, 52, 350–355

- Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, Welch SK. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*. 2007 Jul;81(14):7371-9. Epub 2007 May 9.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R., Zuckermann, F.A., 2010.Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populationsof porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptoragonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 20–33.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W.M., Husmann, R.J., Zuckermann, F.A., 2011. NorthAmerican porcine reproductive and respiratory syndrome viruses inhibit type Iinterferon production by plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 85,2703–2713.
- Cancel-Tirado S., Evans R.B. Yoon K., Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection, *Vet Immunol Immunopathol.* (2004), 102(3): 249-62.
- Canelli E., Ferrari L., Ferrarini Giulia, De Angelis E., Catella A., Borghetti P., Martelli P. Evaluation of the immune response to PCV2 vaccination in PRRSV viremic and non viremic pigs. *Proceedings of the 7th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Nantes, Francia, 2015, P249, 254.*
- Canelli Elena, Borghetti Paolo, Ferrari Luca, De Angelis Elena, Ferrarini Giulia, Catella Alessia, Martelli Paolo. Immune response to PCV2 vaccination in PRRSV viremic piglets. *Veterinary Record* 2015 (Manuscript ID vetrec-2015-103637.R1)
- Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. 2007. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 25: 4382-4391.
- Cano J. P., Dee S. A., Murtaugh M. P., Rovira A., Morrison R. B., Infection dynamics and clinical manifestations following experimental inoculation of gilts at 90 days of gestation with a low dose of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *The Canadian Journal of Veterinary Research* (2009), 73:303-307.

- Cenci Elio, Bistoni Francesco, Mencacci Antonella, Perito Stefano, Magliani Walter, Conti Stefania, Polonelli Luciano, Vecchiarelli Anna. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cellular Microbiology* (2004) (10), 953–961
- Cenci E, Pericolini E, Mencacci A, Conti S, Magliani W, Bistoni F, Polonelli L, Vecchiarelli A.: Modulation of phenotype and function of dendritic cells by a therapeutic synthetic killer peptide. *J Leukoc Biol* 2006, 79:40–45.
- Chang HC, Peng YT, Chang HL, Chaung HC, Chung WB. Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Micro-biol.* 2008; 129(3–4):281–93. Epub 2008/01/29. PMID:18221843.
- Cho J.G. e Dee S.A., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Theriogenology* 66 (2006), 655-662.
- Chiou MT, Jeng CR, Chueh LL, Cheng CH, Pang VF. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Vet Microbiol.* 2000 Jan;71(1-2):9-25
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, et al., Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars, *J Vet Diagn Invest* (1995), 7:456-464.
- Christopher-Hennings J, Holler LD, Benfield DA, Nelson EA. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest.* 2001 Mar;13(2):133-42.
- Collins M. Potential roles of apoptosis in viral pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152(4 Pt2):S20–4. Epub 1995/10/01. PMID:7551407.
- Conti Giorgio, Magliani Walter, Conti Stefania, Nencioni Lucia, Sgarbanti Rossella, Palamara Anna Teresa, Polonelli Luciano “Therapeutic Activity of an Anti-Idiotypic Antibody-Derived Killer Peptide against Influenza A Virus Experimental Infection”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Dec. 2008, p. 4331–4337 Vol. 52, No. 12
- Costers S, Lefebvre DJ, Goddeeris B, Delputte PL, Nauwynck HJ. Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3+CD8high cells. *Vet Res.* 2009 Sep-Oct;40(5):46. doi: 10.1051/vetres/2009029. Epub 2009 May 16.

- Cuartero L, Dee S., Deen J., Ruiz A., Pijoan C. 2002. Association between clinical signs and high serum titers of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in nursery pigs under field conditions. *J Swine Health Prod.* 10: 119-122.
- Darwich L, Díaz I, Mateu E. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* 2010 Dec;154(1-2):123-32.
- Das PB, Vu HL, Dinh PX, Cooney JL, Kwon B, Osorio FA, Pattnaik AK. Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response. *Virology.* 2011 Feb 20;410(2):385-94
- Dea S, Bilodeau R, Athanassious R, Sauvageau R, Martineau GP. Swine reproductive and respiratory syndrome in Québec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can Vet J.* 1992 Dec;33(12):801-8.
- Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. .Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 2000;145(4):659-88.
- Denyer MS, Wileman TE, Stirling CM, Zuber B, Takamatsu HH. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;110:279-92.
- Den Boon JA, Faaberg KS, Meulenbergh JJ, Wassenaar AL, Plagemann PG, Gorbalenya AE, Snijder EJ. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J Virol.* 1995 Jul;69(7):4500-5
- Dee S.A. 2003. Principles of Prevention, Control, and Eradication. In: *PRRS Compendium* 2nd edition. Ed: Zimmerman JJ, Yoon KJ. Iowa.
- Dee S, Deen J, Burns D, Douthit G, Pijoan C. An assessment of sanitation protocols for commercial transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 2004 Jul;68(3):208-14.

- Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol*. 2002 May;76(9):4312-20.
- Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol*. 2005 May;86(Pt 5):1441-5.
- Delputte PL, Van Breedam W, Barbé F, Van Reeth K, Nauwynck HJ. IFN- α treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 Sep;27(9):757-66.
- Delputte PL, Nauwynck HJ. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):8094-101.
- Dengke Bao, Rui Wang, Songlin Qiao , Bo wan, Yinbiao Wang, Mingyang Liu, Xibao Shi, Juiqing Guo, Gaiping Zhang Antibody-dependent enhancement of PRRSV infection down-modulates TNF- α and IFN- β transcription in macrophages Volume 156, Issues 1–2, 15 November 2013, Pages 128–134
- Dewey C, Charbonneau G, Carman S, Hamel A., Nayar G., Friendship R., Eernisse K., Swenson S. 2000 Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Can Vet J* 41: 493-494.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*. 2005 Jul;86(Pt 7):1943-51.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology*. 2006 Aug 1;351(2):249-59. Epub 2006 May 19.
- Dobbe JC, van der Meer Y, Spaan WJ, Snijder EJ.. Construction of chimeric arteriviruses reveals that the ectodomain of the major glycoprotein is not the main determinant of equine arteritis virus tropism in cell culture. *Virology*. 2001 Sep 30;288(2):283-94

- Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Res.* 2010 Dec;154(1-2):86-97. Review.
- Dotti S, Villa R, Sossi E, Guadagnini G, Salvini F, Ferrari M, Amadori M. Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naïve pigs. *Res Vet Sci.* 2011 Apr;90(2):218-25. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.06.011. Epub 2010 Jul 2.
- Drew T.W., A review of evidence for immunosuppression due to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, *Vet. Res.* 31 (2000), 27-39.
- Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 1997 May;56(1-2):9-19
- Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol.* 1997;142(12):2483-97
- Eric J. Snijder, Marjolein Kikkert and Ying Fang. Arterivirus molecular biology and pathogenesis Review *Journal of General Virology* (2013), 94, 2141–2163.
- Fairbairn L, Kapetanovic R, Beraldi D, Sester DP, Tuggle CK, Archibald AL, Hume DA. Comparative analysis of monocyte subsets in the pig. *J Immunol.* 2013;190:6389-96.
- Fang Y, Schneider P, Zhang WP, Faaberg KS, Nelson EA, Rowland RR. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch Virol.* 2007;152 (5):1009-17. Epub 2007 Feb 26.
- Feng WH, Laster M, et al. In vitro infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol.* 2001;75:4889–91.
- Feng, W.H., Tompkins, M.B., Xu, J-S., Bown, T,T., Laster, S.M., Xhang, H-X., Mccaw, M.B. (2002) Thymocyte and peripheral blood T lymphocyte subpopulation changes in piglets following in utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* 302:63–372.

- Ferrari L., Martelli P., Saleri R., De Angelis E., Cavalli V., Bresaola M., Benetti M., Borghetti P. Lymphocyte activation as cytokine gene expression and secretion is related to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate after in vitro homologous and heterologous recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pigs vaccinated and exposed to natural infection *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151 (2013) 193–206
- Ferrarini, G., Borghetti, P., De Angelis, E., Ferrari, L., Canelli, E., Catella, A., Di Lecce, R., Martelli P. (2015). Immunoregulatory signal FoxP3, cytokine gene expression and IFN- γ cell responsiveness upon porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) natural infection. *Research in Veterinary Science*, 103, 96–102.
- Ferrin NH, Fang Y, Johnson CR, Murtaugh MP, Polson DD, Torremorell M, Gramer ML, Nelson EA. Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 May;11(3):503-14.
- Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Aprile 2009
- Forsberg R. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol Biol Evol*. 2005 Nov;22(11):2131-4. Epub 2005 Jul 6
- Gerner W, Käser T, Saalmüller A. Porcine T lymphocytes and NK cells - an update. *Dev Comp Immunol*. 2009;33:310-20.
- Gerner W, Talker SC, Koinig HC, Sedlak C, Mair KH, Saalmüller A. Phenotypic and functional differentiation of porcine $\alpha\beta$ T cells: current knowledge and available tools. *Mol Immunol*. 2015;66:3-13.
- Gu Weihong, Longjun Guo, Haidong Yu, Junwei Niu, Mingming Huang, Xiaolei Luo, Ren Li, Zhijun Tian, Li Feng, Yue Wang Involvement of CD16 in antibody-dependent enhancement of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Gen. Virol.*, July 2015 96: 1712-1722
- Guo, B., Lager, K.M., Henningson, J.N., Miller, L.C., Schlink, S.N., Kappes, M.A., Kehrli, M.E. JR, Brockmeier, S.L., Nicholson, T.L., Yang, H-C., Faaberg, K.S. (2013) Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*. 435:372–84

- He Y, Wang G, Liu Y, Shi W, Han Z, Wu J, et al. Characterization of thymus atrophy in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2012; 160(3–4):455–62. Epub 2012/07/06.
- Hennings J.C., The pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the boar, *Vet. Res.* 31 (2000), 57-58.
- Horter D., Pogranichniy R.C., Chang C., Yoon K., Zimmerman J., 2000 “How long does PRRS virus pers.ist in pigs after infection?” American association of swine practioners 2000, 401.
- James E. Collins, David A. Benfield, William T. Christianson, Louis Harris, Jane C. Hennings, Daniel P. Shaw, Sagar M. Goyal, Sam McCullough, Robert B. Morrison, Han Soo Joo, David Gorcyca, Dan Chladek. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs *J Vet Diagn Invest* 4: 117-126 (1992)
- Jung, K., Renukaradhya, G.J., Alekseev, K.P., Fang, Y., Tang, Y., Saif, L.J., 2009. Porcinereproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity andalters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratorycoronavirus: implications for respiratory viral co-infections. *J. Gen. Virol.* 90,2713–2723.
- Jusa ER, Inaba Y, Kouno M, Hirose O. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus *Am J Vet Res.* 1997 May;58(5):488-91.
- Kang I., Ha Y., Kim D., Oh Y., Cho K.-D., Lee B.-H., Lim J., Kim S.-H., Kwon B., Chae C., Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary glands of experimentally infected sows, *Veterinary Science* 88 (2010), 304–306.
- Keay S, Moreau IA, Provis P. 2002. A retrospective study of PRRS diagnostic results from routine serologic testing of seven PRRS naïve herds. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians*, pp. 147-148.
- Keffaber KK., Reproductive failure of unknown etiology,. *Am Assoc Swine Pract News* (1989), 1:1-10.

- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol.* 1993;133(3-4):477-83.
- Kim W.I. Lee D.S. Johnson W. Roof M. Cha S.H. Yoon K.J. 2007. Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Microbiol.* 123 (1-3): 1-14.
- Kim WI, Yoon KJ. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes.* 2008 Dec;37(3):380-91. doi: 10.1007/s11262-008-0278-1. Epub 2008 Sep 3.
- Kim O, Sun Y, Lai FW, Song C, Yoo D. Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology.* 2010;402:315–26.
- Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JM, Stockhofe-Zurwieden N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine.* 2009 Jun 8;27(28):3704-18. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.022. Epub 2009 May 3. Review
- Kitchen SG, Whitmire JK, Jones NR, Galic Z, Kitchen CM, Ahmed R, Zack JA. The CD4 molecule on CD8⁺ T lymphocytes directly enhances the immune response to viral and cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:3794-9.
- Klobasa F., Butler J.E., Werhahn E., Habe F., Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multi-parity on denovo synthesis by piglets, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 11 (1966) 149–159.
- Klobasa F., Werhahn E., Butler J.E., Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin, *ResVet. Sci.* 31 (1981) 195–206.
- Labarque G.G., Nauwynck H.J., Van Reeth K., Penseart M.B., Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs, *J Gen Virol.* (2000), 81:1327-1334.
- Labarque G, Van Gucht S, Nauwynck H, Van Reeth K, Pensaert M. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet Res.* 2003;34(3):249–60.

- Labarque G., Van Reeth K., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M. 2004. Impact of diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22: 4183-4190
- Lamontagne L., Page C., Larochelle R., Magar R., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells, *Viral Immunology* (2003), 16(3): 395-406.
- Lasagna C., Gestione della PRRS in una filiera suina integrate. 5° Congresso Internazionale SIVAR Cremona 8-10 Maggio 2013. *Larg Animal Review*.
- Lawson SR, Rossow KD, Collins JE, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res.* 1997 Oct;51(2):105-13.
- Lager K., 2003 “Porcine reproductive and respiratory syndrome. “Control and vaccinology” Proceedings of the 4 th international symposium on emerging and re-emerging pig disease- Rome June 29th-july 2nd ,2003,29.
- Liu CH, Chaung HC, Chang HL, Peng YT, Chung WB. Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2009 May 12;136(3-4):266-76. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.016. Epub 2008 Nov 28.
- Loemba H.D., Mounir S., Mardassi H., Archambault D., Dea S., Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Arch Virol* (1996) 141: 751-761.
- Lohse L, Nielsen J, Eriksen L. Temporary CD8+ T-cell depletion in pigs does not exacerbate infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Viral Immunol.* 2004;17(4):594-603.

- López Fuertes L, Doménech N, Alvarez B, Ezquerro A, Domínguez J, Castro JM, Alonso F. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 1999 Oct;64(1):33-42.
- López-Fuertes L, Campos E, Doménech N, Ezquerro A, Castro JM, Domínguez J, Alonso F. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res.* 2000 Aug;69(1):41-6.
- Lopez O.J., Osorio F.A., Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2004), 102: 155–163.
- Lopez OJ, Oliveira MF, Alvarez-Garcia E, Kwon BJ, Doster A, Osoria FA. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:269–75.
- Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology.* 2007 Feb;120(2):217-29. Epub 2006 Nov 20.
- Loving, C.L., et al., Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015
- Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res.* 2010 Dec;154(1-2):1-6.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997a) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* **10**: 369–400.
- Martelli P, Cordioli P, Alborali LG, Gozio S, De Angelis E, Ferrari L, Lombardi G and Borghetti P. 2007. Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain. *Vaccine.* 25 (17): 3400-3408.
- Martelli Paolo, Gozio Stefano, Ferrari Luca, Rosina Stefano, De Angelis Elena, Quintavalla Cecilia, Bottarelli Ezio, Borghetti Paolo “Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous

European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity” Vaccine 27 (2009) 3788–3799

- Martelli P, Ardigò P, Ferrari L, Morganti M, De Angelis E, Bonilauri P, Luppi A, Guazzetti S, Caleffi A, Borghetti P. Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. Vet Microbiol. 2013 b;162:558-71.
- Martelli P., Baricco G., Bonilauri P., Borghetti P., Caleffi S., Candotti P., Canelli E., Cavirani S., De Mila G. M., Feliziani F., Fono E., Guazzetti S., Haesebrouck F., Kramer L. H., Luppi A., Maes D., Magistrali C. M., Merialdi G., Nauwynck H., Rosignoli C., Rota Nodari S., Ruga G., Sala V., Segalés J. Le PATOLOGIE del MAIALE, I edizione, Point Veterinaire Italiane. 2013
- Martelli P., Saleri R., Cavalli V., De Angelis E., Ferrari L., Benetti M., Ferrarini Giulia, Merialdi G., Borghetti. Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. Veterinary Microbiology 2014, 168, 357-364.
- Martelli P., Ferrari L., Ferrarini Giulia, De Angelis E., Catella A., Benetti M., Nathues H., Canelli E., Borghetti P. Influence of repeated porcine circovirus type 2 vaccination on sows’ immune response. Veterinary Record 2015, 177, 305.
- Martin, R., Steverink P, 2002 Oral transmission of PRRS virus via the feeding of infected muscle to pigs, Proceedings of the 17th IPVS congress, Ames, Iowa, 2002, volume 1, paper 45.
- Mateu E., Diaz I., The challenge of PRRS immunology, The Veterinary Journal (2007), 10.1016-05.022.
- Meier W., Wheeler J., Husmann R.J., Osorio F., Zuckermann F.A., Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus, Vet. Res. 31 (2000), 41.
- Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann F.A., Gradual development of the interferon-(response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination, Virology (2003), 309:18–31.
- Meier WA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Osorio FA, Lunney JK, Zuckermann FA. Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to

porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 Dec 8;102(3):299-314.

- Meng XJ. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol.* 74(4):309-29.
- Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM, Brockmeier SL. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am J Vet Res.* 1996 Jun;57(6):834-9
- Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim Reprod Sci.* 2000 Jul 2;60 61:199-210.
- Mengeling W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F. 2003a. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93, 25–38.
- Mengeling W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Koehler, K.J. 2003b. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 93, 13–24.
- Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJ. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology.* 1993 Jan;192(1):62-72.
- Meulenbergh JJ, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Bos-de Ruijter JN, Langeveld JP, Meloen RH. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology.* 1998 Dec 5;252(1):106-14.
- Meulenbergh J.J.M., PRRSV, the virus, *Vet. Res.* 31 (2000), 11-21.

- Misinzo GM, Delputte PL, Nauwynck HJ. Involvement of proteases in porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating upon internalization in primary macrophages. *Vet Res.* 2008 Nov-Dec;39(6):55. doi: 10.1051/vetres:2008031. Epub 2008 Jul 25.
- Molitor T.W., Bautista E.M., Choi C.S., Immunity to PRRSV: Double-edged sword, *Vet. Microbiol.* 55 (1997), 265-276.
- Mortensen S., Stryhn H., Sogaard R., Boklund A., Stark K.D., Christensen J., Willeberg P. 2002. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev. Vet. Med.* 53: 83-101.
- Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F.A., Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection, *Viral Immunol.* (2002), 15, 533-547.
- Murtaugh MP., 2005. ORF sequencing and implication for heterologous immunity. In: *Proceedings of PRRS fact vs speculation.* Parma 27-28th October 2005.
- Murtaugh MP, Genzow M. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine.* 2011 Oct 26;29(46):8192-204. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.013. Epub 2011 Sep 17. Review.
- Nauwynck H., Duan X., Pensaert M., PRRSV-macrophage interaction and putative receptors, *Vet. Res.* 31 (2000), 22.
- Nelsen C.J., Murtaugh M.P., Faaberg K.S., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution of two continents, *J. Virol.* 73 (1999), 270-280.
- Nelson E.A., Christopher-Hennings J., Benfield D.A., Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, *J. Vet. Diagn. Invest.* (1994), 6: 410-415.
- Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, Wensvoort G, Collins JE, Benfield DA. Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1993 Dec;31(12):3184-9

- Nielsen J, Bøtner A, Bille-Hansen V, Oleksiewicz MB, Storgaard T. Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Vet Microbiol.* 2002 Jan 3;84(1-2):1-13.
- Nilubol D., Platt KB., Halbur PG., Torremorell M., Harris DL. 2004. The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol.* 102 (1-2):11-8.
- Nodelijk G., Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: a review, *Vet. Q.* (2002), 24: 95-100.
- Alex Olvera, Marina Sibila, Maria Calsamiglia, Joaquim Segalés, Mariano Domingo Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs *Journal of Virological Methods* Volume 117, Issue 1, April 2004, Pages 75–80
- Osorio F.A., Galeota J.A., Nelson E., Brodersen B., Doster A., Wills R., Zuckermann F., Laegreid W.W., Passive transfer of virus specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity, *Virology* (2002), 302: 9–20.
- Opriessnig T., Halbur P.G., Yoon K.J., Pogranichniy R., Vaughn E., Harmon K., Evans R., Key K.F., Pallares F., Thomas P., Meng X.J. 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live PRRSV vaccine (RespPRRS/Repro™), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *Journal of Virology.* 76: 11837-11844.
- Patel D, Nan Y, Shen M, Ritthipichai K, Zhu X, Zhang YJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol.* 2010;84:11045–55.
- Pirarat N., Sada W., Thanawongnuwech R. 2002 Reproductive study using immunohistochemistry on PRRSV-induced pneumonia in Thailand, *Proceedings of the 17 IPVS congress*, Ames, Iowa, 2002, volume 2, paper 468.

- Pitkin A., Deen J., Dee S., Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *The Canadian Journal of Veterinary Research* (2009), 73: 298-302.
- Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW., Murtaugh MP., Morrison RB., Benfield DA., Collins JE., Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs, *J Vet Diagn Invest* (1994), 6:3-12.
- Peng YT, Chaung HC, Chang HL, Chang HC, Chung WB. Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2009 May 12;136(3-4):359-65. Epub 2008 Nov 28.
- Pirarat N., Sada W., Thanawongnuwech R. 2002 Reproductive study using immunohistochemistry on PRRSV-induced pneumonia in Thailand, *Proceedings of the 17 IPVS congress*, Ames, Iowa, 2002, volume 2, paper 468.
- Pirzadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 1998 May;79 (Pt 5):989-99.
- Pitkin A, Deen J, Otake S, Moon R, Dee S. Further assessment of houseflies (*Musca domestica*) as vectors for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under field conditions. *Can J Vet Res.* 2009 Apr;73(2):91-6.
- Plagemann PG. Neutralizing antibody formation in swine infected with seven strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as measured by indirect ELISA with peptides containing the GP5 neutralization epitope. *Viral Immunol.* 2006 Summer;19(2):285-93.
- Pol J.M.A., van Leengoed L.A.M.G., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G., *Dual infection of PRRSV/influenza or PRRSV/Actinobacillus pleuropneumoniae in the respiratory tract*, *Vet. Microbiol.* 55 (1997), 259-264.
- Polonelli Luciano, Magliani Walter, Conti Stefania, Bracci Luisa, Lozzi Luisa, Neri Paolo, Adriani Daniela, De Bernardis Flavia, Cassone Antonio Therapeutic Activity of an Engineered

Synthetic Killer Antiidiotypic Antibody Fragment against Experimental Mucosal and Systemic Candidiasis *INFECTION AND IMMUNITY*, Nov. 2003, p. 6205–6212 Vol. 71, No. 11

- Prieto C., Castro J.M., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review, *Theriogenology* 63 (2005), 1-16.
- Prieto C., Castro J.M., Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows, *Vet. Res.* 31 (2000), 56-57.
- Reynaud G., Zimmerman J, CharreyreC, Brun A. 1998. Field Evaluation of an inactivated vaccine against PRRS. In: *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, p 301
- Irene M Rodríguez-Gómez, Jaime Gómez-Laguna, Librado Carrascov “Impact of PRRSV on activation and viability of antigen” *World J Virol* 2013 November 12; 2(4): 146-151
- Revilla C, Chamorro S, Alvarez B, Pérez C, Ezquerro A, Alonso F, Domínguez J. Analysis of functional heterogeneity of porcine memory CD4+ T cells. *Dev Comp Immunol.* 2005;29:479-88.
- Rodríguez-Gómez IM, Käser T, Gómez-Laguna J, Lamp B, Sinn L, Rümenapf T, Carrasco L, Saalmüller A, Gerner W. PRRSV-infected monocyte-derived dendritic cells express high levels of SLA-DR and CD80/86 but do not stimulate PRRSV-naïve regulatory T cells to proliferate. *Vet Res.* 2015 May 20;46:54.
- Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K., Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2004), 102, 199-216.
- Rossow KD. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Path.* 1998;35:1–20.
- Rossow KD, Shivers JL, Yeske PE, Polson DD, Rowland RR, Lawson SR, Murtaugh MP, Nelson EA, Collins JE. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet Rec.* 1999 Apr 17;144(16):444-8.
- Rowland Raymond R.R , Steven Lawson, Kurt Rossow, David A Benfield “Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent

infection of pigs originally exposed to virus in utero” Volume 96, Issue 3, 30 October 2003, Pages 219–235

- Saalmüller A, Werner T, Fachinger V. T-helper cells from naive to committed. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87:137-45.
- Scortti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro JM. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec.* 2007 Dec 15;161(24):809-13.
- Séguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E., and Cailliez, J.C. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22: 145–149. (1998)
- Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996 Mar;50(1-2):19-27.
- Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology.* 2009 May 10;387(2):373-9. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.033. Epub 2009 Mar 21.
- Silva-Campa E, Cordoba L, Fraile L, Flores-Mendoza L, Montoya M, Hernández J. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology.* 2010 Jan 20;396(2):264-71. doi: 10.1016/j.virol.2009.10.024. Epub 2009 Nov 13.
- Silva-Campa E, Mata-Haro V, Mateu E, Hernández J Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs). *Virology.* 2012 Aug 15;430(1):73-80. doi: 10.1016/j.virol.2012.04.009. Epub 2012 May 18.
- Sinkora M, Butler JE. The ontogeny of the porcine immune system. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:273-83.
- Snijder EJ, Meulenbergh JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol.* 1998 May;79 (Pt 5):961-79.

- Solano G.I., Segalés J., Collins J.E., Molitor T.W., Pijoan C., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*, *Vet. Microbiol.* 55 (1997), 247-257.
- Suárez P, Zardoya R, Martín MJ, Prieto C, Dopazo J, Solana A, Castro JM. Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.* 1996 Jun;42(1-2):159-65.
- Suarez P., Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus, *Vet. Res.* 31 (2000), 47-55.
- Sun Z, Chen Z, Lawson SR, Fang Y. The cysteine domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J Virol.* 2010;84:7832–46.
- Sun MX, Huang L, Wang R, Yu YL, Li C, Li PP, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication. *Autophagy.* 2012; 8(10):1434–47. Epub 2012/06/ 29. PMID: 22739997. doi: 10.4161/auto.21159
- Sur JH, Cooper VL, Galeota JA, Hesse RA, Doster AR, Osorio FA. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection *J Clin Microbiol.* 1996 Sep;34(9):2280-6
- Sur J.H., Doster A.R., Galeota J.A., Wills R.W., Osorio F.A., PRRSV: Study of in vivo cell tropism and virus-induced apoptosis by in situ detection techniques, *Vet. Res.* 31 (2000), 58-59.
- Swanson CL, Pelanda R, Torres RM “Division of labor during primary humoral immunity”.
- *Immunol Res.* 2013 Sep 4.
- Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Evans LE, Wills RW, Yoon K-J, Schwartz KJ, Althouse GC, McGinley MJ, and Brevik AK. 1995. Preliminary assessment of an inactivated PRRS virus vaccine on the excretion of virus in semen. *Swine Health Prod*, 3:244-247.
- Swiecki, M., Colonna, M., 2010. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev.* 234,142–162.

- Terpstra C, Wensvoort G, Pol JM. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q.* 1991 Jul;13(3):131-6.
- Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ, Thacker EL. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 May 10;79(1-2):115-27.
- Thanawongnuwech R., Suradhat S., “Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design” *Virus Research* 154 (2010) 133-140.
- Thacker E.L., Halbur P.G., Thacker B.J., Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV, *Vet. Res.* 31 (2000), 60.
- Therrien D, St-Pierre Y, Dea S. Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells. *Arch Virol.* 2000;145(6):1099-116.
- Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark.
- Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L, Sun M, Jin P, Wang S, Kitamura Y, Yan J, Gao GF *PLoS One.* 2007 Jun 13; 2(6):e526.
- Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, Tian ZJ, An TQ, Qiu HJ Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg Infect Dis.* 2007 Sep; 13(9):1434-6.
- Tingstedt JE, Nielsen J. Cellular immune responses in the lungs of pigs infected in utero with PRRSV: an immunohistochemical study. *Viral Immunol.* 2004;17(4):558-64.
- Travassos LR, Silva LS, Rodrigues EG, Conti S, Salati A, Magliani W, Polonelli L. Therapeutic activity of a killer peptide against experimental paracoccidiosis. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Nov;54(5):956-8. Epub 2004 Sep 24.
- Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA, Nauwynck HJ. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol.* 2003 Aug;77(15):8207-15.

- Vanhee M, Costers S, Van Breedam W, Geldhof MF, Van Doorselaere J, Nauwynck HJ. A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains. *Viral Immunol.* 2010 Aug;23(4):403-13. doi: 10.1089/vim.2010.0025.
- Vanhee M, Van Breedam W, Costers S, Geldhof M, Noppe Y, Nauwynck H. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine.* 2011 Jun 24;29(29-30):4794-804. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.071. Epub 2011 May 7.
- Van Alstine W., Kanitz C, Stevenson G., Time and temperature survivability of PRRS Virus in serum and tissues. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 621-622.
- Van Aken D, Zevenhoven-Dobbe J, Gorbalenya AE, Snijder EJ. Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7. *J Gen Virol.* 2006 Dec;87(Pt 12):3473-82.
- Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol.* 2010 a Jul;91(Pt 7):1659-67. Epub 2010 Apr 21. Review.
- Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2010 b Jan 15;6(1)
- Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 2008 Dec;
- Van Gucht S, van Reeth K, Pensaert M. Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):960-6.
- Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol.* 1996 Feb;48(3-4):325-35.

- Van Reeth K. Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol.* 1997 Apr;55(1-4):223-30. Review.
- Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M., Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity, *Res. Vet. Sci.* (1999), 67:47-52.
- Vezina SA, Loemba H, Foutnier M, Dea S, Archibault D. Antibody production and blastogenesis response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 1996;60:94–9.
- Vu HL, Kwon B, Yoon KJ, Laegreid WW, Pattnaik AK, Osorio FA. Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J Virol.* 2011 Jun;85(11):5555-64. doi: 10.1128/JVI.00189-11. Epub 2011 Mar 16.
- Wang X, Eaton M, Mayer M, Li H, He D, Nelson E, Christopher-Hennings J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol.* 2007 Feb;152(2):289-303. Epub 2006 Oct 12.
- Wang R, Nan Y, Yu Y, Zhang YJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp1beta inhibits interferon-activated JAK/STAT signal transduction by inducing karyopherinalpha1 degradation. *J Virol.* 2013;87:5219–28.
- Wang R, Nan Y, Yu Y, Yang Z, Zhang YJ. Variable interference with interferon signal transduction by different strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2013;166:493–503.
- Wang G, He Y, Tu Y, Liu Y, Zhou EM, Han Z, et al. Comparative analysis of apoptotic changes in peripheral immune organs and lungs following experimental infection of piglets with highly pathogenic and classical porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol J.* 2014; 11(1):2. Epub 2014/01/08.
- Wang G, Yu Y, Tu Y, Tong J, Liu Y, Zhang C, et al. (2015) Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection Induced Apoptosis and Autophagy in Thymi of Infected Piglets. *PLoS ONE* 10(6): e0128292.

- Weesendorp, E., Stockhofe-Zurwieden, N., Popma-De Graaf, D.J., Fijten, H., Rebel, J.M., 2013. Phenotypic modulation and cytokine profiles of antigen presenting cells by European subtype 1 and 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in vitro and in vivo. *Vet. Microbiol.* 167, 638–650.
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., Ter Laak E.A., Bloemraad M., De Kluyver E.P., Kragten C., Van Buiten L., Den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J.M., Moonen P.L.J.M., Zetstra T., De Boer E.A, Tibben H.J., De Jong M.F., Van 't Veld P., Greenland G.J.R., Van Gennep J.A., Voets M.Th., Verheijden J.H.M. & Braamskamp J. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991 Jul;13 (3):121-30.
- Wills R.W., Doster A.R., Galeota J.A., Sur J.H., Osorio F.A., Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003), 58-62.
- Wissink EH, van Wijk HA, Pol JM, Godeke GJ, van Rijn PA, Rottier PJ, Meulenberg JJ. Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch Virol.* 2003 Jan;148(1):177-87.
- Wissink EH, Kroese MV, Maneschijn-Bonsing JG, Meulenberg JJ, van Rijn PA, Rijsewijk FA, Rottier PJ. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *J Gen Virol.* 2004 Dec;85(Pt 12):3715-23.
- Wissink EH, Kroese MV, van Wijk HA, Rijsewijk FA, Meulenberg JJ, Rottier PJ. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 2005 Oct;79(19):12495-506.
- Xiao Z, Batista L, Dee S, Halbur P, Murtaugh MP. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5923-33.
- Yu M., Liu X., Sun L., Chen C., Ma G., Kitamura Y., Gao G.F., Liu W., Subcellular localization and topology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus E protein, *Virus Research* 152 (2010), 104-114.

- Yoon I.J., Joo H.S., Goyal S.M., Molitor T.W., A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera, J. Vet. Diagn. Invest (1994), 6: 289-292.
- Yoon K.J., Christopher-Hennings J., Nelson E.A. 2003. Diagnosis of PRRS Virus. In: PRRS Compendium 2nd edition. Ed: Zimmerman JJ, Yoon KJ. Iowa
- Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. J Gen Virol. 2000 Apr;81(Pt 4):853-79. Review. No abstract available.
- Zimmerman J.J., Benfield D.A., Dee S.A., Murtaugh M.P., Stadejek T., Stevenson G.W., Torremorell M., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus), Diseases of swine 10th edition, Wiley-Blackwell Publishing (2012), 461-486.
- Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. Immunology. 1996 Mar;87(3):500-12.
- Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. Vet Immunol Immunopathol. 1999 Dec 15;72(1-2):55-66. Review.
- Zuckermann FA, Garcia EA, Luque ID, Christopher-Hennings J, Doster A, Brito M, Osorio F. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. Vet Microbiol. 2007 Jul 20;123(1-3):69-85. Epub 2007 Feb 16.

PUBBLICAZIONI DEL TRIENNIO

ARTICOLI SU RIVISTA

1. Martelli P., Saleri R., Cavalli V., De Angelis E., Ferrari L., Benetti M., **Ferrarini Giulia**, Merialdi G., Borghetti. Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. Veterinary Microbiology 2014, 168, 357-364.
2. Martelli P., Ferrari L., **Ferrarini Giulia**, De Angelis E., Catella A., Benetti M., Nathues H., Canelli E., Borghetti P. Influence of repeated porcine circovirus type 2 vaccination on sows' immune response. Veterinary Record 2015, 177, 305.
3. **Ferrarini Giulia**, Borghetti P., De Angelis E., Ferrari L., Canelli E., Catella A., Di Lecce R., Martelli P. Immunoregulatory signal FoxP3, cytokine gene expression and IFN- γ cell responsiveness upon porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) natural infection. Research in Veterinary Science 2015, 103, 96-102.
4. Elena Canelli, Paolo Borghetti, Luca Ferrari, Elena De Angelis, **Giulia Ferrarini**, Alessia Catella, Paolo Martelli. Immune response to PCV2 vaccination in PRRSV viremic piglets. Veterinary Record (Manuscript ID vetrec-2015-103637.R1)

PROCEEDINGS

1. **Ferrarini Giulia**, Ferrari L., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P. Studio molecolare sulla risposta infiammatoria ed immunitaria in corso di infezione naturale da porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS) 39° Meeting annuale – Piacenza, 2013, 246-258.
2. Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., De Angelis E., **Ferrarini Giulia**, Martelli P. Changes of IFN- γ , IL-10 and FoxP3 in PRRSV naturally infected pigs. Proceeding of the 5th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Edinburgh (UK), 2013, 159.

3. Martelli P., Saleri R., Cavalli V., Ferrari L., De Angelis E., Benetti M., Bonilauri P., Arioli E., Caleffi A., **Ferrarini Giulia**, Borghetti P. Clinical protection, viremia and immune response in pigs vaccinated against PCV2 at different ages with different levels of maternal immunity as derived from vaccinated gilts and sows under field conditions. Proceedings of the 6th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Sorrento, 2014, 120.
4. **Ferrarini Giulia**, Ferrari L., De Angelis E., Borghetti P., Martelli P. Coordinated immune response of memory and cytotoxic T cells together with IFN- γ secreting cells after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) natural infection in conventional pigs. Atti del 68° Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (SISVet) – Pisa, 2014, 245.
5. Martelli P., Saleri R., Cavalli V., Ferrari L., De Angelis E., Cacchioli A., Benetti M., **Ferrarini Giulia**, Borghetti P. Gilts and sows PCV2 re-vaccination at mating increases the homogeneity and the titres of antibodies at farrowing and the passive transfer to the piglets, but does not affect the frequency of IFN- γ secreting cells. Proceedings of the 6th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Sorrento, 2014, 244.
6. Canelli E., De Angelis E., Ferrari L., **Ferrarini Giulia**, Sandri G., Catella A., Borghetti P., Martelli P. Preliminary in vitro characterization of some immunobiological properties of HP-PRRSV isolates in Italy. Proceedings of the 2015 International PRRS Congress (IPRRS Congress) – Ghent, Belgio, 2015, 70.
7. Canelli E., Ferrari L., **Ferrarini Giulia**, De Angelis E., Catella A., Bonilauri P., Borghetti P., Martelli P. Immune response to PCV2 vaccination in PRRSV-viremic pigs. Proceedings of the 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases (ISERPD) – Kyoto, Giappone, 2015, P033.
8. Ferrari L., Borghetti P., **Ferrarini Giulia**, De Angelis E., Canelli E., Catella A., Martelli P. An anti-idiotypic antibody-derived killer peptide (KP) stimulates both innate and adaptive immune cells in pig PBMC. Proceedings of the 7th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Nantes, Francia, 2015, P240, 249.
9. Canelli E., Ferrari L., **Ferrarini Giulia**, De Angelis E., Catella A., Borghetti P., Martelli P. Evaluation of the immune response to PCV2 vaccination in PRRSV viremic and non viremic pigs. Proceedings of the 7th European Symposium on Porcine Health Management (ESPHM) – Nantes, Francia, 2015, P249, 254.