

## **PROGETTI DI RICERCA CORRENTE 2016**

**Titolo del progetto: Parametri di immunità protettiva in suini vaccinati con vaccini PCV2 interi e sub-unitari**

**Codice IZSLER: PRC2016013**

### **RELAZIONE FINALE**

**Responsabile Scientifico: Dr. Massimo Amadori**

**Tel. 030-2290632**

**e-mail: [massimo.amadori@izsler.it](mailto:massimo.amadori@izsler.it)**

**Unità Operativa Coordinatrice: Laboratorio di Immunologia Cellulare, IZSLER, Brescia**

**Inizio del progetto: 1/11/2017**

**Fine del progetto: 30/04/2020 (prorogato)**

**Ricerca finanziata dal Ministero della Salute,  
Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della  
Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la  
Tutela della Salute**

# Indice generale

1. Elenco dei collaboratori	p. 3
2. Razionale del progetto	p. 4
3. Cronogramma del progetto	p. 5
4. Relazione	p. 6
5. Bibliografia	p. 22

## Elenco dei collaboratori

### Unità Operative impegnate nella ricerca:

<b>N. identificativo</b>	<b>Ente appartenenza</b>	<b>Responsabile scientifico</b>
1 IMS	IZS LER	Massimo Amadori
1 EMS	DIMEVET, Bologna	Giuseppe Sarli

### Collaboratori di U.O. 1 IMS

<b>Nome e Cognome</b>	<b>Laboratorio/Sezione</b>	<b>Qualifica</b>
Massimo Amadori	Lab. di Immunologia Cellulare	Veterinario Dirigente
Davide Lelli	Reparto Virologia	Veterinario Dirigente
Cinzia Mantovani	Lab. di Immunologia Cellulare	Ausiliario Categoria B
Flavia Guarneri	Lab. di Immunologia Cellulare	Biotecnologo borsista
Leonardo James Vinco	Reparto Animali da Laboratorio	Veterinario Dirigente
Enrico Tresoldi	Reparto Animali da Laboratorio	Veterinario a contratto
Beatrice Boniotti	Reparto Genomica	Biologo Dirigente
Ilaria Barbieri	Reparto Genomica	Biologo Dirigente

### Collaboratori di U.O. 2 EMS

<b>Nome e Cognome</b>	<b>Laboratorio/Sezione</b>	<b>Qualifica</b>
Giuseppe Sarli	DIMEVET Bologna	Prof. Ordinario
Giancarlo Avallone	DIMEVET Bologna	Prof. Associato

## **Razionale del progetto.**

Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus senza involucro, contenente 1768 paia di basi di DNA circolare a singolo filamento, appartenente alla famiglia *Circoviridae*. PCV2 è un patogeno ubiquitario nella popolazione suina ed è considerato l'agente eziologico principale del complesso di malattie Circovirus suino-associate (PCVAD), che comprende la sindrome da deperimento multisistemica post svezzamento (PMWS), malattie respiratorie, il complesso dermatite / nefropatia e problemi riproduttivi. PCVAD corrisponde a sindromi multifattoriali, a causa delle frequenti co-infezioni con altri patogeni comuni (ad esempio, arterivirus PRRS, Parvovirus suino, *Mycoplasma hyopneumoniae*) e l'importante ruolo dei fattori di stress ambientali (ad esempio la densità, la dieta, le variazioni di temperatura e umidità relativa). Dal momento che la malattia colpisce gravemente l'industria suina in tutto il mondo, diversi vaccini sono stati sviluppati per ridurre le infezioni da PCV2 e la sua progressione a PCVAD. Tutti gli attuali vaccini commerciali hanno dimostrato efficacia nel ridurre l'escrezione di PCV2, la carica virale nel sangue e la persistenza nei tessuti linfoidi, anche se essi sono estremamente eterogenei in termini di componenti immunogene e formulazione (virioni interi, virus chimerico che esprime la proteina ORF2 di PCV2, proteina ORF2 espressa in Baculovirus). Sulla base delle informazioni disponibili, i vaccini sono difficilmente paragonabili rispetto alla massa di antigene PCV2. Inoltre, non esiste alcuna procedura riconosciuta a livello ufficiale per valutare la massa di antigene PCV2 nei vaccini e la sua potenza immunizzante. Come risultato, la risposta immunitaria ai vaccini PCV2 non è correlata con un contenuto preciso di massa Ag. Questo è chiaramente un problema importante per una corretta valutazione dei risultati ottenuti in studi sperimentali in stalle di isolamento e in prove di campo. Il progetto di ricerca si prefigge pertanto di analizzare il rapporto tra massa antigenica PCV2 e risposta immunitaria protettiva dei suini, ai fini di una migliore standardizzazione dei prodotti vaccinali. La valenza strategica del progetto si desume dal ruolo centrale di PCV2 nella genesi di numerose problematiche di sanità animale nelle aziende suinicole e di conseguente utilizzo di farmaco veterinario. Inoltre, la definizione in vitro di parametri chiari ed affidabili di protezione può contribuire ad una futura riduzione dell'uso di suini per valutare l'efficacia dei diversi lotti di vaccino PCV2.

## **Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti**

Gli obiettivi sono rappresentati dal completamento delle attività di ciascuna fase del progetto, come descritto nel relativo cronogramma. Gli indicatori per la verifica dei risultati finali raggiunti sono i seguenti:

1. Ottenimento dell'autorizzazione ministeriale alla sperimentazione animale prevista.
2. Completamento della pratica di acquisto degli animali previsti dal progetto (40 animali in tutto per 2 distinte sperimentazioni).
3. Trasporto degli animali alle stalle autorizzate IZSLER e relativo acclimatemento.
4. Avvenuta inoculazione degli animali con vaccini sperimentale a virus intero e ricombinante.
5. Esecuzione di tutte le prove immunologiche e virologiche previste dal progetto.

# Cronogramma progetto

	MESI							
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-14	15-16	17-22	23-24
<b>Fase 1 (preparazione)</b>								
1.1 Revisione protocolli analitici	■							
1.2 Verifica protocolli analitici	■	■						
1.3 Analisi dei data base esistenti		■						
1.4 Controllo e amplificazione di ceppi PCV2		■						
<b>Fase 2 (condizioni di base)</b>								
2.1 Ulteriori isolamenti di PCV2 in campo e caratterizzazioni genomiche			■	■	■			
2.2 Inattivazione PCV2 e formulazione vaccinale			■	■	■			
2.3 Titolazioni in copie genomiche			■	■				
2.4 Titolazioni in unità infettanti			■	■				
<b>Fase 3 (esecuzione e prima verifica)</b>								
3.1 Indagine su varianti PCV2 e efficacia vaccini					■	■	■	
3.2 Prova di vaccinazione con vaccino a virus intero					■	■	■	
3.3 Prova di vaccinazione con vaccino subunitario						■	■	
3.4 Valutazione delle risposte immunitarie					■	■	■	
<b>Fase 4 (verifica finale)</b>								
4.1 Valutazione finale dei dati di campo							■	
4.2 Verifica dei correlati di protezione							■	
4.3 Definizione di dose antigenica protettiva minima							■	
<b>Fase 5 (elaborazione risultati)</b>								
5.1 Raccolta ed elaborazione dei dati <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>								■
5.2 Definizione delle pubblicazioni scientifiche da preparare e stesura della relazione finale								■

Tutte le fasi del progetto (celle evidenziate in giallo) sono state completate.

# Relazione

## Fasi iniziali

Nella parte iniziale del progetto (vedi relazione intermedia) sono stati realizzati i seguenti punti del progetto:

- Verifiche delle procedure analitiche.
- Produzione dell'antigene PCV2b ed effettuazione dei relativi controlli di processo.
- Formulazione del vaccino PCV2b a virus intero a diverse dosi.

## Prova di vaccinazione 1: vaccino a virus intero inattivato

### *Schema di vaccinazione*

Abbiamo selezionato 20 suini (ibrido Goland) di 40 giorni di vita, allocati a 4 gruppi da cinque suini l'uno con residui uniformi di anticorpi materni anti-PCV2. I gruppi sono stati vaccinati, rispettivamente, con 800 / 266 / 88 / 0 nanogrammi di un ceppo PCV2b inattivato con beta-propiono-lattone, formulato nel medesimo adiuvante del vaccino commerciale Circovac (Tabella 1). Il vaccino e le sue diluizioni sono stati allestiti secondo le modalità indicate nella relazione intermedia. A 21 giorni dalla vaccinazione è stato eseguito un controllo della risposta anticorpale e cellulo-mediata al vaccino. A 27 giorni dalla vaccinazione, tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2b omologo. Sono stati successivamente eseguiti altri prelievi di sangue sino a 35 giorni post infezione per valutare la viremia PCV2, la risposta anticorpale e cellulo-mediata all'infezione (vedi figure 1-2).

### *Potenza del vaccino a virus intero*

I risultati principali possono essere riassunti come segue: 1) Nessun sintomo clinico è stato osservato nei suini oggetto di studio. E' stata tuttavia osservata una notevole variabilità di accrescimento ponderale, non correlata al dosaggio di Ag nel vaccino. 2) E' stata osservata viremia in tutti i suini di controllo (gruppo PBS + adiuvante), come pure in tre suini dei gruppi 266 (1 suino) e 88 nanogrammi (due suini) (vedi Tabella 2). Nessun suino del gruppo 800 ng ha sviluppato viremia.

La risposta all'infezione sperimentale è stata valutata sulla base della viremia (assente o presente) e i suini sono stati di conseguenza considerati, rispettivamente, protetti o non protetti. Quindi, la prevalenza di suini protetti in ciascun gruppo è stata rapportata al logaritmo della rispettiva dose vaccinale ed esaminata mediante analisi quantale del Probit secondo una procedura

già descritta (<http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>). Tale procedura ci ha consentito di calcolare il numero di Dosi Protettive 50% (DP<sub>50</sub>) del vaccino a dose piena. Dai risultati ottenuti (Tabella 2) si evince un titolo di 11 DP<sub>50</sub> del vaccino. Pertanto, 1 DP<sub>50</sub> corrisponde a circa 74 ng di Ag PCV2b a virus intero.

**Tabella 1**  
**Dosi di antigene PCV2**

	<b>Gruppo A</b>	<b>Gruppo B</b>	<b>Gruppo C</b>	<b>Gruppo D</b>
<b>Ag PCV2 a virione intero</b>	800 ng	266 ng	88 ng	0 ng

Ciascuna dose è stata inoculata intramuscolo in un volume di 0,5 ml in adiuvante commerciale del vaccino anti-PCV2 Circovac.

### *Saggi anticorpali*

Si è realizzata ovviamente una sovrapposizione tra residuo di anticorpi materni e anticorpi prodotti dai suini vaccinati e poi infetti.

Non c'è stata alcuna correlazione sui singoli animali tra titolo di Ab ELISA e protezione a livello dei singoli suini, in cui il picco della risposta anticorpale poteva anche coincidere con il picco della viremia. Tuttavia, il gruppo 800 nanogrammi ha sviluppato in media un titolo anticorpale più significativamente più elevato (vedi Figura 1).

Anche gli Ab neutralizzanti (vedi Figura 2), non hanno manifestato una correlazione soddisfacente con la protezione poiché titoli moderati (1:4 - 1:8) post vaccinazione sono stati evidenziati sia in suini protetti che non protetti. Anche in questo caso, la dose di Ag ha influenzato significativamente i titoli medi di anticorpi neutralizzanti a 21 giorni post vaccinazione, 7 e 14 giorni post infezione (Figura 2). Una significativa riduzione dei titoli è stata osservata tra 14 e 21 giorni post infezione nei suini dei gruppi 266 e 88 ng. La vaccinazione ha anche indotto la comparsa di tali anticorpi nei liquidi orali di gruppo, come dimostrato dai titoli più alti nei gruppi 800 e 266 ng a 21 giorni post vaccinazione. Una riduzione dei titoli è stata osservata anche nei liquidi orali di gruppo tra 10 e 28 giorni post infezione nei suini dei gruppi 800 e 266 ng.

### *Accrescimento ponderale*

Dopo l'infezione, è stata notata un'ampia variabilità degli accrescimenti ponderali dei suini, che non mostra alcuna correlazione significativa con il dosaggio antigene del vaccino e, quindi, con i livelli di protezione virologica ottenuti (vedi Figura 3).

Figura 1

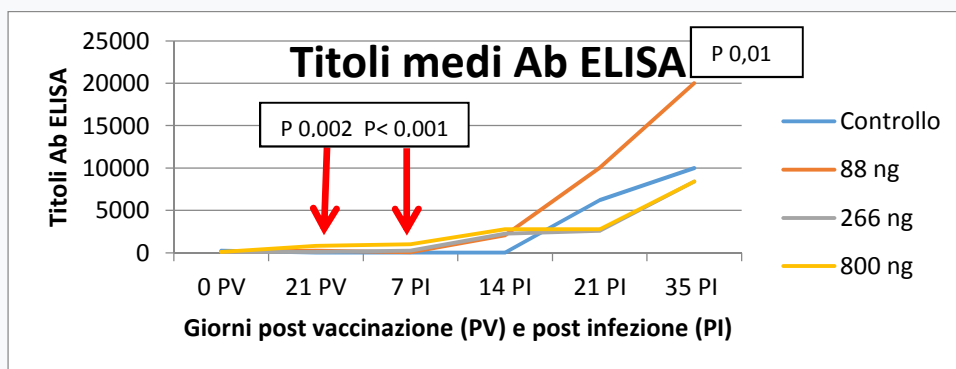
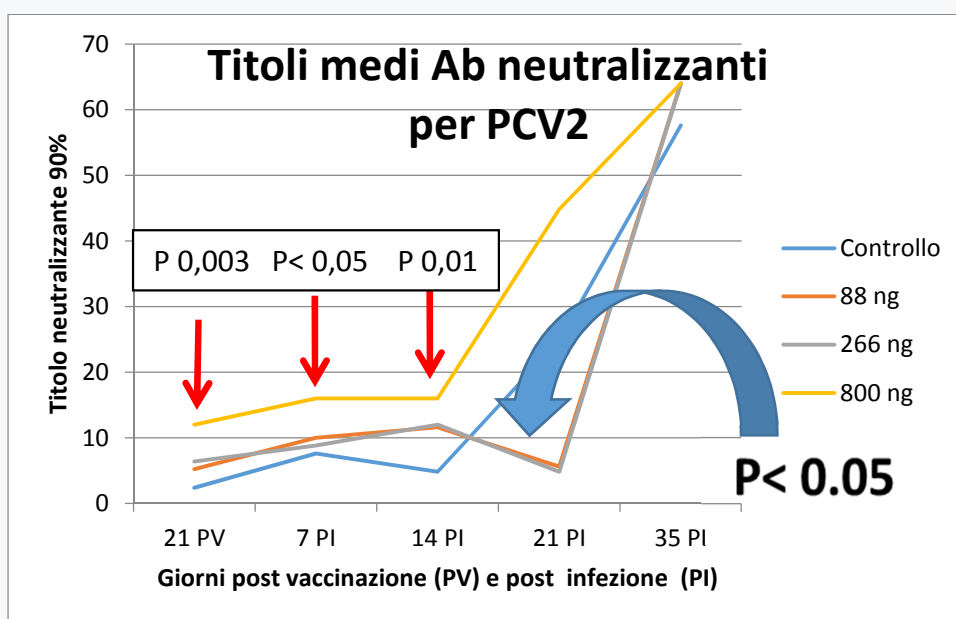


Figura 2



### Risposta cellulo-mediata

In accordo con il nostro precedente studio (Zanotti et al., 2015), tutti i suini con risposta IFN-gamma PCV2-specifica nel saggio su sangue intero, a 3 settimane dalla vaccinazione, erano totalmente protetti nei confronti dell'infezione sperimentale. Inoltre, tale risposta è stata indotta solo dalla vaccinazione, ma non dall'infezione sperimentale. Pertanto, tutti i suini di controllo sono sempre rimasti negativi al test malgrado l'esposizione al virus infettante.

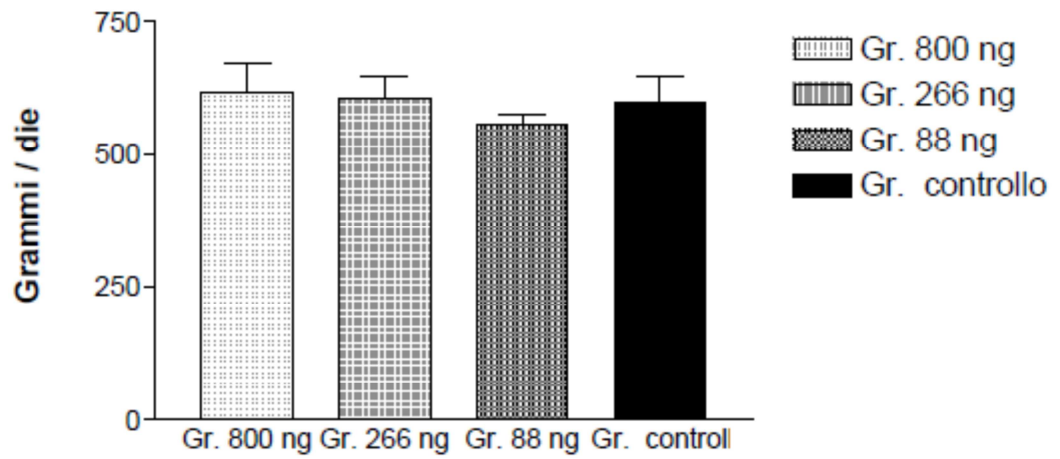


La risposta IFN-gamma a PCV2 è stata ulteriormente analizzata in un saggio citometrico su leucociti mononucleati di sangue periferico per rivelare la frequenza dei linfociti positivi per IFN-gamma dopo stimolazione con PCV2 (vedi Figura 3) su 11 suini a differenti intervalli di tempo dopo vaccinazione e infezione. Solo i suini del gruppo 800 ng hanno manifestato una risposta concomitante di linfociti T CD4+, CD8+,  $\gamma\delta$ TcR (86D) a 21 giorni post vaccinazione, come pure una residua risposta IFN-gamma dopo il 7° giorno post infezione. Inoltre, linfociti T con  $\gamma\delta$  TcR sono risultati positivi solo in questo gruppo. Tali aspetti non sono stati riscontrati con i dosaggi inferiori di Ag PCV2.

Nei linfonodi tracheo-bronchiali dei suini 3, 5, 7, 9, 14 non è stata osservata alcuna risposta IFN-gamma ai livelli soglia definiti. Tracce di risposta in cellule T CD8+ sono state osservate nei suini 3 (controllo non vaccinato) e 14 (gruppo 800 ng). Tale suino ha mostrato tracce di risposta in linfociti T CD4 e  $\gamma\delta$ , in accordo coi risultati sulle cellule mononucleate di sangue.

E' stato anche eseguito un saggio ELISPOT PCV2-specifico per cellule secernenti IFN-gamma. IL-2 e TNF- $\alpha$  su leucociti mononucleati di sangue periferico dei suini 17, 18, 19 (Figura 4). Quale Ag stimolante è stata impiegata la proteina capsidica ORF2 ricombinante, espressa in sistema Baculovirus. Nel nostro saggio su leucociti congelati, sono state rivelate frequenze molto basse di cellule positive (1-2 cellule /  $10^5$ ) nelle nostre condizioni sperimentali. E' interessante notare che cellule secernenti TNF-alfa sono state osservate solo in campioni con risposta IFN-gamma di linfociti T CD8 $\beta$ + nel saggio citometrico.

**Figura 3**  
**Accrescimenti ponderali**



La figura riporta gli accrescimenti ponderali medi giornalieri nei diversi gruppi registrati tra il giorno della vaccinazione e il giorno della macellazione. Non si evidenzia alcuna differenza significativa tra i diversi gruppi.

**Tabella 2**

**Viremia post infezione di suini vaccinati con vaccino PCV2b**

Controllo, PBS+ adiuvante					
SUINO		T 7	T 14	T 21	T 35
6	Challenge	0	0	198	17
2	Challenge	0	0	25	0
3	Challenge	0	285	105	103
4	Challenge	0	210	36	0
1	Challenge	0	6	175	0

88 ng PCV2 / dose					
SUINO		T 7	T 14	T 21	T 35
11	Challenge	0	32	26520	1290
7	Challenge	0	0	0	0
8	Challenge	0	0	0	0
9	Challenge	0	0	0	0
16	Challenge	0	0	0	162

266 ng PCV2/ dose					
SUINO		T 7	T 14	T 21	T 35
10	Challenge	0	0	0	0
12	Challenge	0	0	0	0
13	Challenge	0	0	T	T
19	Challenge	0	269	0	0
20	Challenge	0	0	0	0

800 ng PCV2 /dose					
SUINO		T 7	T 14	T 21	T 35
5	Challenge	0	0	0	0
17	Challenge	0	0	0	0
18	Challenge	0	0	0	0
14	Challenge	0	0	0	0
15	Challenge	0	0	0	0

La viremia da PCV2 viene espressa come copie genomiche PCV2 / mL a 7/14/21/35 giorni post infezione.

*Riscontri istologici ed immuno-istochimici*

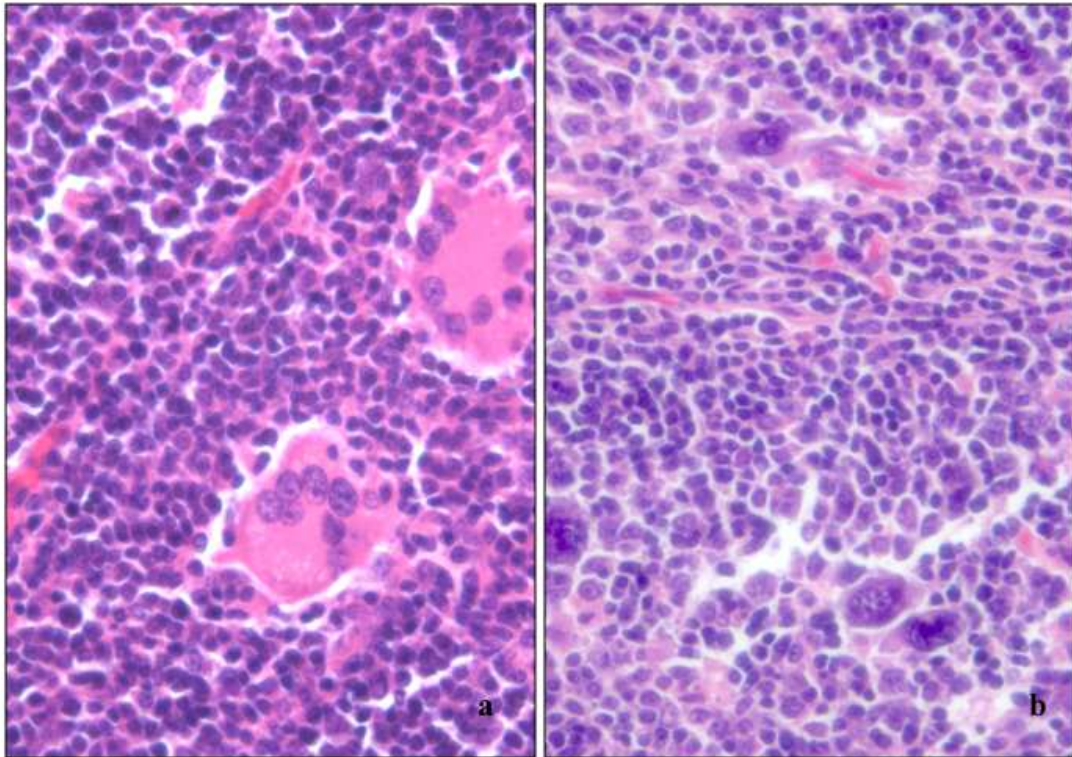
I tessuti prelevati dai suini macellati tra 37 e 49 giorni post infezione sono stati sottoposti ad esame istologico e ad analisi immunoistochimica per stimare la presenza di PCV2. In particolare, durante l'esame necroscopico sono stati fissati in formalina tamponata campioni di tessuti prevalentemente linfoidi, notoriamente bersaglio di PCV2: linfonodo mesenterico, milza, linfonodo mediastinico, linfonodo inguinale superficiale, tonsille, ileo, polmone, trachea, bronchi a livello di biforcazione tracheale, cuore, fegato, rene e pancreas.

I tessuti fissati sono stati successivamente inclusi in paraffina e sono state ricavate sezioni di 4 µm di spessore, colorate in seguito con ematossilina-eosina ai fini delle indagini istologiche.

L'indagine immunoistochimica per PCV2, è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (Mab F217) gentilmente fornito dal Dr. Gordon Allan secondo una procedura già pubblicata (Sarli et al., 2009).

Il solo reperto istologico compatibile con infezione da PCV2 è stato la presenza in tessuti linfoidi di cellule istiocitarie reattive e/o di singole cellule giganti multinucleate in posizione centro-follicolare. La prevalenza di tali cellule era più elevata nei soggetti vaccinati (31%) rispetto a quelli di controllo (13%) (Figura 4). Un carico virale residuo, valutato mediante immuno-istochimica, è stato dimostrato solo in 3 suini su 20 e di grado assai basso (livello 1) (Figura 5).

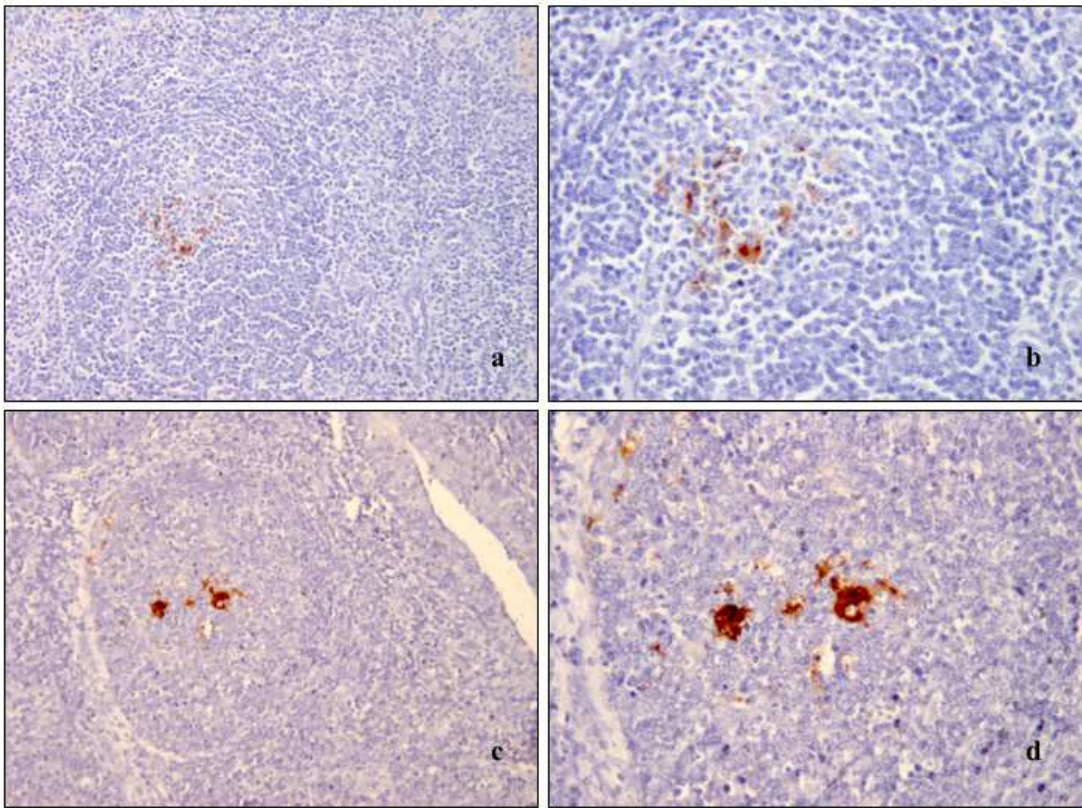
**Figura 4**



Cellule istiocitarie reattive (b) e giganti multinucleate (a) centrofollicolari

**Figura 5.**

**Positività citoplasmatica di cellule dendritiche centrofollicolari alla reazione immunostochimica specifica per PCV2 (quadri a, b, c, d)**



## **Prova di vaccinazione 2: vaccino ricombinante a base di proteina ORF2 di**

### **PCV2b**

#### *Premessa*

Per motivi logistici ed organizzativi non è stato possibile eseguire tale sperimentazione in una stagione termoneutrale (fine estate / autunno) come per il vaccino inattivato a virus intero. La sperimentazione è stata pertanto effettuata nella stagione invernale, in ricoveri muniti di riscaldamento a base di lampade a raggi infrarossi. Pertanto, la sperimentazione è esattamente paragonabile a quella precedente per fascia d'età e substrato genetico dei suini, nonché per il virus infettante impiegato. Non è invece paragonabile per il contesto stagionale, sicuramente più sfavorevole agli animali nella prova 2. Tale considerazione sarà ripresa più avanti a commento dei risultati ottenuti.

#### *Formulazione e inoculazione del vaccino sperimentale*

La produzione della proteina capsidica ORF2 di PCV2 è stata commissionata all'azienda Creative Biogene (45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA). Tale produzione è stata realizzata in cellule d'insetto in sistema Baculovirus. In pratica, è stato creato un plasmide idoneo alla trasfezione basato sulle sequenze note di un ceppo di referenza PCV2b (reference PCV2b strain AF055394 from GenBank): mRNA Refseq AF055394.1; Protein Refseq AAC35331.1

Tale plasmide è stato impiegato per trasfettare cellule d'insetto SF9, coltivate a 27°C sino ai primi segni d'infezione virale (4-7 giorni). Il sovrastante della coltura veniva poi recuperato e conservato come P1 Baculovirus a 4°C. L'espressione della proteina era controllata mediante Western Blotting. L'amplificazione finale del prodotto è stata realizzata su 200 ml di cellule SF9 per 4 giorni a 27 °C. La coltura veniva poi raccolta, centrifugata e trasferita per la procedura di purificazione su colonna di Nickel. La produzione della proteina veniva poi controllata mediante elettroforesi e SDS-PAGE. Dopo quantificazione mediante bicinchoninic acid assay (BCA assay), la proteina veniva poi stoccata in aliquote a -80°C.

### *Schema di vaccinazione*

Abbiamo adottato lo stesso schema impiegato per il vaccino a virus intero (vedi sopra). Ovvero, abbiamo selezionato dallo stesso allevamento 20 suini (ibrido Goland) di 30 giorni di vita, di 3 distinte nidiate (bianca, rossa, verde) allocati a 4 gruppi da cinque suini l'uno con residui uniformi di anticorpi materni anti-PCV2. I gruppi sono stati vaccinati, rispettivamente, con 10,8 (gruppo A) / 3,6 (gruppo B) / 1,2 (gruppo C) / 0 (gruppo D) microgrammi di proteina ORF2 di PCV2b, per via intramuscolare nel medesimo adiuvante del vaccino commerciale Circovac, adottato nella prima sperimentazione, in un volume finale di 0,5 mL. A 21 giorni dalla vaccinazione è stato eseguito un controllo della risposta anticorpale e cellulo-mediata al vaccino. A 28 giorni dalla vaccinazione, tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2b impiegato nella prova precedente (uguale ceppo, uguale dose infettante). Sono stati successivamente eseguiti altri prelievi di sangue sino a 28 giorni post infezione per valutare la viremia PCV2, la risposta anticorpale e cellulo-mediata all'infezione.

In seguito alla somministrazione delle dosi vaccinali di cui sopra, non è stato notato alcun sintomo ai dosaggi 3,6 e 1,2 microgrammi. Al contrario, un modesto abbattimento del sensorio e minore consumo alimentare è stato notato nel gruppo con 10,8 microgrammi di ORF2. Tale condizione si è esaurita completamente nel giro di 4 giorni dopo l'inoculazione. Tale condizione non è in realtà diversa da quanto registrato talora in allevamento dopo le consuete vaccinazioni. Uno dei suini del gruppo controllo (0 microgrammi) è deceduto per polmonite apostematosa diffusa. Un altro soggetto di questo gruppo ha sofferto di zoppia transitoria da probabile sub-lussazione dell'articolazione coxo-femorale. Il soggetto, pur completamente guarito, ha manifestato crescita inferiore rispetto agli altri soggetti del gruppo.

### *Controlli virologici ed immunologici*

Nonostante la vaccinazione effettuata, tutti i suini hanno sviluppato viremia, come dimostrato nei prelievi effettuati dal 14° al 28° giorno post infezione. La dimostrazione della viremia a partire dal 14° giorno è del tutto in linea con la sperimentazione precedente, mentre è assolutamente diversa l'entità della viremia stessa, ben superiore in tale seconda sperimentazione. Il gruppo B (3,6 microgrammi / dose ) ha manifestato il migliore contenimento della viremia media in tre prelievi successivi (14 – 21 – 28 giorni post infezione) (vedi Tabella 3).

Lo sviluppo della risposta immunitaria è risultato assai diverso rispetto a quanto osservato con il vaccino a virus intero inattivato. Per quanto concerne gli anticorpi misurati con saggio ELISA, il gruppo D (controllo) ha manifestato a 21 giorni post vaccinazione (PV) un ulteriore decadimento del titolo di Ab materni (come atteso). Nessun suino vaccinato ha mostrato un incremento del titolo anticorpale. Due suini del gruppo A, tre suini del gruppo B e due suini del

gruppo C hanno invece mantenuto il titolo Ab osservato al momento della vaccinazione. Un decadimento analogo a quello dei controlli è stato osservato invece negli altri 8 suini vaccinati. Un altro elemento importante da considerare è l'assenza di siero-conversione in tutti i soggetti (vaccinati e di controllo) per almeno 2 settimane dopo l'infezione sperimentale. Anzi, per 4 soggetti vaccinati si è registrato addirittura un decadimento del titolo anticorpale (da 1/1000 a 1/100) nei 14 giorni successivi all'infezione sperimentale (Tabella 4).



Tabella 3

Viremia PCV2 in suini vaccinati con proteina ricombinante ORF2

Gruppo A: 10,8 microgrammi							
Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 PI	21 PI	28 PI
91	Rosso	NEG	NEG	NEG	489000	800000	35300
95	Rosso	NEG	NEG	NEG	0	50600	99200
97	Bianco	NEG	NEG	NEG	20800	20400	4290
98	Rosso	NEG	NEG	NEG	249000	276000	21700
99	Verde	NEG	NEG	NEG	3450000	443000	46900

Gruppo B: 3,6 microgrammi							
Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 PI	21 PI	28 PI
56	Rosso	NEG	NEG	NEG	0	15200	37400
92	Bianco	NEG	NEG	NEG	223000	NEG	12800
93	Verde	NEG	NEG	NEG	331000	13400	2500
94	Rosso	NEG	NEG	NEG	151000	86900	3170
96	Bianco	NEG	NEG	NEG	0	202000	81800

Gruppo C: 1,2 microgrammi							
Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 Pi	21 PI	28 PI
77	Verde	NEG	NEG	NEG	35700000	1400000	379000
78	Verde	NEG	NEG	NEG	25300000	1330000	86900
79	Rosso	NEG	NEG	NEG	18400000	613000	39100
80	Bianco	NEG	NEG	NEG	8860	30500	1740
100	Bianco	NEG	NEG	NEG	15600000	268000	<b>90700</b>

Gruppo D: controllo							
Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 Pi	21 PI	28 PI
57*	Bianco	NEG					
58	Rosso	NEG	NEG	NEG	4250000	331000	44800
59	Verde	NEG	NEG	NEG	0	17200000	133000
60	Verde	NEG	NEG	NEG	2080000	145000	10000
76	Bianco	NEG	NEG	NEG	0	4890	<b>NEG</b>

I risultati sono espressi come copie genomiche di PCV2/mL di siero

\*soggetto deceduto.

**Tabella 4****Ab anti-PCV2 in saggio ELISA****Gruppo A: 10,8 microgrammi ORF2**

Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 Pi	21 PI	28 PI
91	Rosso	1/100	1/100	1/100	1/100	>1/10000	>1/10000
95	Rosso	1/1000	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/100
97	Bianco	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/100	1/1000
98	Rosso	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/1000	>1/10000
99	Verde	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/10000	1/10000

**Gruppo B: 3,6 microgrammi ORF2**

Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 Pi	21 PI	28 PI
56	Rosso	1/100	1/100	1/100	1/100	< 1/10	1/10000
92	Bianco	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/1000	1/10000
93	Verde	1/1000	1/1000	1/100	1/100	>1/10000	>1/10000
94	Rosso	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/10000	1/1000
96	Bianco	1/1000	1/1000	1/100	1/100	1/100	>1/10000

**Gruppo C: 1,2 microgrammi ORF2**

Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 Pi	21 PI	28 PI
77	Verde	1/1000	1/100	1/100	1/100	>1/10000	>1/10000
78	Verde	1/1000	1/100	1/100	1/100	>1/10000	>1/10000
79	Rosso	1/1000	1/1000	1/100	1/100	1/10000	>1/10000
80	Bianco	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/100	1/1000
100	Bianco	1/100	1/100	1/100	1/100	>1/10000	>1/10000

**Gruppo D: controllo**

Marca	Nidiata	Arrivo	21 DPV	7 PI	14 PI	21 PI	28 PI
57*	Bianco	1/1000					
58	Rosso	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/10000	>1/10000
59	Verde	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/100	>1/10000
60	Verde	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/1000	1/1000
76	Bianco	1/1000	1/100	1/100	1/100	1/100	1/1000

\*soggetto deceduto

Anche per quanto concerne il profilo di immunità cellulo-mediata, sono stati osservati risultati assai differenti rispetto al vaccino a virus intero. Innanzitutto, nel saggio IFN-gamma su sangue intero, non sono state evidenziate differenze tra suini vaccinati e di controllo a 21 giorni post vaccinazione. Sono stati trovati 2 suini debolmente positivi per PCV2 tra i controlli (da trasmissione materna) e 1 suino nel gruppo da 1,2 microgrammi. Sono state evidenziate invece positività più spiccate per proteina ORF2 in 3 suini del gruppo a dosaggio Ag più elevato (10,8 microgrammi). Anche in

questo esperimento non sono state evidenziate positività per PCV2 in seguito a sola infezione. Risposte deboli/intermedie verso ORF2 sono state rilevate in alcuni suini vaccinati dopo infezione e anche in 1 suino di controllo.

La permanenza di reazioni cellulo-mediate di origine materna nel gruppo controllo è stata confermata anche nel saggio citometrico per IFN-gamma intracellulare a 21 giorni post vaccinazione. Tali reazioni erano invece totalmente soppresse nei 3 gruppi vaccinali come probabile esito di una soppressione attiva della risposta *in vivo*. La risposta si manifesta nei 4 gruppi sperimentali a 7 giorni post infezione e si impenna a valori molto elevati a 14 e 21 giorni post infezione in presenza di livelli elevati di viremia nei gruppi. Nessuna reattività viene invece rilevata in tutti i gruppi a 28 giorni post infezione (nuova fase di soppressione della risposta).

Il saggio di blastizzazione linfocitaria basato su incorporazione di Bromo-desossi-uridina ha consentito di discriminare chiaramente i soggetti vaccinati dai controlli a 21 giorni post vaccinazione. Esso non si è però rilevato predittivo di protezione virologica verso la viremia. Ad esempio, nel gruppo da 3,6 microgrammi, i suini 56 e 96 (negativi a 21 giorni post vaccinazione) hanno avuto livelli di viremia inferiore rispetto ai suini 93 e 94 (positivi a 21 giorni post vaccinazione). E' interessante notare che l'infezione sperimentale ha indotto nei suini di controllo risposte positive di blastizzazione verso PCV2 a differenza di quanto osservato nel saggio IFN-gamma su sangue intero.

Nel saggio ELISPOT per cellule secernenti citochine, i risultati a 21 giorni post vaccinazione su 3 suini per gruppo non hanno evidenziato differenze sostanziali, con 2 suini positivi a bassa intensità nei gruppi A / C / D e 1 suino positivo nel gruppo B. Per il gruppo D si tratta evidentemente di residui di immunità materna come anche evidenziato nel saggio IFN-gamma su sangue intero (vedi sopra). A 14 giorni post infezione, sugli stessi animali, si registra un abbassamento generale della risposta, che si mantiene in 3 soggetti del gruppo A, 1 suino del gruppo B e 1 del gruppo D già positivi a 21 giorni post vaccinazione, con un'indicazione di un possibile ruolo del dosaggio vaccinale. A 21 giorni post infezione tutti i soggetti sono invece risultati negativi, con un'indicazione invece di fase immunosoppressiva generalizzata.

Tale risultato è stato confermato in pieno a 28 giorni post infezione con un saggio simile denominato Fluorospot, in cui si evidenzia comunque la secrezione di IFN-gamma, ma la rivelazione della reazione viene affidata ad un substrato fluorescente anziché cromogeno. Rimane una positività molto bassa in 1 suino ciascuno dei gruppi A / B / D (nessuna differenza significativa).

## Conclusioni

### A) Vaccino a virus intero inattivato

- Il paragone tra potenza immunizzante di vaccino a base di PCV2a (Zanotti et al., 2015a) e PCV2b (questo studio) non depone a favore dell'ipotesi di vaccini genotipo-specifici per PCV2.
- La protezione piena dei suini a parità di condizioni sperimentali viene infatti ottenuta con 200 ng circa di Ag PCV2a (Zanotti et al., 2015a) e 800 ng di Ag PCV2b.
- La maggiore immunogenicità di PCV2a è probabilmente alla base della sua graduale sostituzione in campo da parte di PCV2b ed altri genotipi nel corso del tempo.
- Sulla base dei dati nella prima prova di vaccinazione con Ag a virus intero, il saggio IFN-gamma PCV2-specifico può costituire un valido strumento per la verifica della vaccinazione PCV2 e della sua efficacia.
- In accordo con i nostri risultati precedenti (Zanotti et al., 2015a), la risposta IFN-gamma a PCV2 su sangue intero è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione di tale risposta.
- I suini hanno risposto al vaccino e alla successiva infezione sperimentale con la produzione di anticorpi ELISA proporzionale al dosaggio antigenico, a differenza di quanto osservato nel nostro progetto PRC2011001, in cui era stato impiegato invece un ceppo PCV2a a differente dosaggio.
- La definizione *in vitro* di parametri chiari ed affidabili di protezione può contribuire ad una futura riduzione delle infezioni sperimentali dei suini per valutare l'efficacia dei diversi lotti di vaccino PCV2.
- I dati sulla potenza del vaccino a virus intero PCV2b sono in accordo con altri modelli sperimentali ed , in particolare con la potenza dei vaccini antiaftosi. In tali prodotti, una dose di 1-2 microgrammi di virione inattivato 146S poteva comportare

la presenza di 10-20 DP50, in accordo pertanto con i dati da noi ottenuti nel modello PCV2.

- La discrepanza tra dati sulla protezione virologica (blocco della viremia) e protezione clinica (accrescimento ponderale) mette in evidenza i differenti requisiti atti a conseguire tali condizioni e la necessità di chiarire bene gli obiettivi e le aspettative derivanti dalle vaccinazioni degli animali da reddito.

## **B) Vaccino ricombinante**

- La viremia PCV2 osservata in tutti i gruppi sperimentali ha impedito di calcolare un valore protettivo del vaccino con metodo quantale del Probit.
- Si può solo concludere che il dosaggio relativamente più efficace del vaccino è risultato essere 3,6 microgrammi/dose. I dosaggi rispettivamente superiore e inferiore sono risultati corrispondenti a maggiori livelli medi di viremia post infezione.
- Tale andamento “a campana” della curva dose/risposta ricorda in una certa misura quanto osservato nella nostra prova su PCV2a (Zanotti et al., 2015), in cui dosaggi > 200 ng/dose avevano fornito risposte immunitarie peggiori.
- Va tuttavia tenuto presente che la sperimentazione su vaccino ricombinante ha avuto luogo in periodo invernale (ancorché mite), a differenza della stagione termoneutrale (autunno) in cui si era svolta la sperimentazione precedente. Il diverso impatto del fattore climatico può avere giocato un ruolo non marginale.
- Il fattore climatico va senz'altro sottolineato alla luce dell'identico profilo genetico dei suini (ibridi Goland) e della stessa fascia d'età in cui le 2 sperimentazioni hanno avuto luogo.
- Sarà importante eseguire in futuro una valutazione in silico delle sequenze aminoacidiche di PCV2a e PCV2b per determinare le differenze cruciali in termini di espressione di epitopi B e T, alla base delle importanti differenze osservate in termini di attività immunogena.

## Bibliografia

- Kixmoller M, Ritzmann M, Eddicks M, et al. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 2008;26:3443-3451.
- Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, et al. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res* 2006;2:6.
- Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009) "Application of a protocol for the diagnosis of PMWS in Italy". *Veterinary Record*, 164, 519-523, 2009.
- Tribble, B. R., M. Kerrigan, N. Crossland, M. Potter, K. Faaberg, R. Hesse and R. R. R. Rowland, 2011: Antibody recognition of Porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18, 749-757.
- Zanotti C, Martinelli N, Lelli D, Amadori M. 2015a. Correlates of Protection Following Vaccination with Inactivated Porcine Circovirus 2 Vaccines. *Viral Immunol.* 2015 Dec;28(10):600-8.
- Zanotti C, Amadori M., 2015b. A simple method for measuring porcine circovirus 2 whole virion particles and standardizing vaccine formulation. *Biologicals.* 2015 Mar;43(2):79-83.