



International Veterinary Immunology Symposium 2019

Riassunti di presentazioni orali e poster

14 agosto 2019

Sessione plenaria. Technologies transforming immunology

Loving C. Single-cell sequencing

La sequenziatura NGS in bulk fornisce dati condizionati dal livello medio di espressione di ciascun gene e può mascherare cambiamenti intervenuti nel sistema analizzato. Tale rischio è superato agendo a livello di singola cellula. Il sistema si basa su tecnologie di microfluidica tipo Genomics Chromium, in cui singole cellule sono immerse in micro gocce di olio e marcate con cromo, per cui a 1 goccia corrisponde una marcatura.

È stato provato su due popolazioni di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di suini adulti. I risultati delle sequenze geniche sono riportati a clusters, che sono poi riferiti a singole sotto-popolazioni con incrocio di informazioni, compreso lo stato di replicazione per espressione di chinasi 1 ciclina-dipendente. È stata verificata una notevole somiglianza tra geni di cellule T CD4 umane e CD4 suine. In media, si analizzano 3000 cellule per circa 600 geni totali. Ovvero si stabilisce un compromesso tra numero di geni e numero di cellule, con 30000 - 50000 reads per cellula. È pure possibile costruire una scala cromatica di espressione dei geni rispetto alla media di popolazione.

Napper S. Kinase analysis

Il Chinoma rappresenta il complesso di attività delle proteine in senso di attivazione (chinomica). Essa era basata fino al 2009 sull'analisi dei peptidi fosforilati. Si registra una carenza di dati per specie veterinarie. Si sa ora che i dati del bovino sono simili a quelli dell'uomo, ovvero che i siti di fosforilazione sono simili. Viene usato il software di analisi DAPPLE. Sono analizzati circa 1500 peptidi con 9 repliche per ciascuno. L'analisi viene di solito eseguita dopo stimolazione con ligandi noti. DAPPLE riconosce i siti di fosforilazione. Il software PIKA analizza invece gli eventi. Ad esempio, è stato analizzato il Chinoma di api resistenti e non a Varroa, prima e dopo infezione, rilevando importanti differenze nelle vie di segnalazione del sistema immunitario innato nelle api sensibili con 19 peptidi differentemente fosforilati.

Chinoma impiegato anche per predire efficacia dei vaccini in bovini e suini. Per *M. hyopneumoniae* 53 peptidi cambiano tra soggetti responder e non responder. La scadente risposta ai vaccini nei suini

si correla con il basso peso alla nascita, con più elevata risposta IFN gamma alla vaccinazione in un ambiente flogistico.

In macrofagi bovini, MAP abroga la capacità di produrre una risposta IFN gamma, come confermato da Chinoma relativo a proteine Jak - Stat accompagnato da maggiore produzione di proteine SOCS. MAP abroga anche la risposta ad agonisti di TLR9 (CpG) per attivazione di Pyk2 tramite Myd88, il che favorisce la persistenza di MAP. L'analisi richiede 6 milioni di cellule, con un costo di circa 100 \$ ad analisi.

Sessione Enhancing vaccines

Mwangi W. Ultralong antibodies.

Ab extra lunghi bovini (BUL) sono potenzialmente più attivi in neutralizzazione di virus per la presenza di circa 60 aminoacidi in più in complementarity determining region (CDR)3. Già impiegati come anticorpi umanizzati per neutralizzare HIV. I bovini hanno limitato potenziale ricombinatorio, per cui BUL derivano da un limitato numero di regioni V e D dei geni delle immunoglobuline. La regione protuberante "Knob" è in grado di legarsi all'antigene. Ciò si può spiegare forse con la conformazione di taluni epitopi virali critici rivestiti da glicani (glican shield). Questo fenomeno può comportare neutralizzazione crociata di più ceppi. In genere, nessun Ag induce con efficacia BUL, essi derivano in genere da pazienti cronici. Un trimero ordinato di gp 140 di HIV induce in bovini risposte SN crociate.

Wilson H.L. Azione degli adiuvanti nei suini.

L'azione degli adiuvanti si riferisce a: effetto deposito di antigene / rilascio di citochine / reclutamento di leucociti al sito di incolo. L'adiuvante PCEP (a base di fosfazene) provoca reazione infiammatoria locale e induce inflammosoma anche per via intradermica. Funziona con vaccini virali e batterici. Sperimentato come adiuvante di vaccino influenza suina per via i.d. con 40.000 HAU (emoagglutinina). Induce granuloma locale, infiltrazione di granulociti e linfociti. Riducendo il dosaggio di PCEP a 100 o anche 20 microgrammi la produzione di Ab non cala, anche in assenza di forte risposta infiammatoria locale.

Amadori M. Parametri di immunità protettiva di vaccini PCV2 a diverso dosaggio di Ag.

E' stata valutata l'azione immunizzante di vaccino Porcine Circovirus 2 b (PCV2b) in dosi scalari da 800 a 88 ng / dose. Il vaccino ha protetto i suini verso la viremia con regolare curva dose / risposta. 1 dose protettiva 50% corrisponde a 74 ng di Ag PCV2a. La protezione ottimale veniva ottenuta con 800 ng / dose a differenza del livello di 200 ng / dose evidenziato in passato per un vaccino PCV2a. A livello individuale i titoli Ab non erano predittivi di protezione, ma il livello medio di Ab nei gruppi era influenzato significativamente dalla dose di Ag. Al contrario degli Ab, la risposta IFN-gamma PCV2-specifica a 21 giorni dalla vaccinazione era un robusto parametro predittivo di protezione. Questa era correlata a risposta concomitante IFN-gamma di linfociti T CD4, CD8beta, gamma delta in suini vaccinati con la massima dose di Ag.

Wattegedera S.R. Vaccino per *Clamidia abortus* in pecore

Malattia (aborto) indotta talora anche da vaccino vivo attenuato. Dal paragone di diversi adiuvanti oleosi e di diverse dosi di Ag, Montanide ISA VG 70 produce risultati analoghi a 20 e 2,5 microgrammi di antigene *Clamidia*.

Koziol M-E. Adiuvanti per *M. hyopneumoniae*.

Uso attuale di adiuvanti olio-in-acqua O/W che danno risposta forte, ma breve, con pericoli di anafilassi. Con adiuvanti acqua-in-olio W/O si fanno meno inoculazioni e la durata della risposta è

maggiore. Il vaccino è però più viscoso. Adjuvante W/O Seppic provato in suinetti di 14 giorni di vita con antigene Mycoplasma. La reazione locale risulta simile a quella del vaccino O/W, ma il titolo Ab con 1 sola inoculazione è più alto che con due inoculazioni in vaccino O/W. Si registra anche migliore score polmonare dopo challenge.

SESSIONE CONCOMITANTE Cellule gamma delta, NK, NKT

Schäfer A. iNKT cells.

iNKT cells sono cellule T CD3+, con recettore alfa/beta, rare, CD8alfa + o -, mai CD4. Sono cellule attivate CD5+, CD25+, iCOS+, MHC II+. Rispetto a espressione di CD45 hanno probabilmente memoria. Sono talora CCR7+ con possibilità di rapido stravasamento. Ci sono meno iNKT in suini adulti. Per l'espressione dei fattori di trascrizione Tbet e PLZF si distinguono iNKT di tipo Th1, Th2 e non ILC (innate lymphoid cell). Hanno rapida proliferazione dopo contatto con Alfa-galattosilceramide (alfa-GC). Dopo attivazione alcune iNKT diventano doppie positive CD4+ / CD8+ e anche IFN gamma +, perforina +.

Baldwin C.L. Porcine gamma/delta T cells

Esiste un complesso funzionale WC1 co-recettore di cellule gamma delta anche in suini, oltre che nei ruminanti. Ci sono 10 geni WC1 in suini divisi in tre gruppi. Sono riconosciuti da mAb del gruppo SW5. Si hanno differenti popolazioni con diverse prevalenze negli organi. La diversità del T cell Receptor (TcR) è maggiore in catena Delta. Si possono sortare 3 popolazioni per CD2 e SW5. Cellule gamma delta CD2+ sono SW5- come i bovini WC1-. Sono attivi 4 geni C gamma divisi per cassette di espressione. La cassetta TCRG1 è omologa a TCRG5 del bovino.

Yirsaw a.w. Cellule T gamma / delta di capra.

In capra esiste un ruolo riconosciuto di cellule gamma delta in schistosomiasi, infezioni da MAP e CAEV. Le capre con più di 6 mesi di vita hanno prevalenze simili di linfociti T gamma delta, CD4, CD8 a differenza di pecore e bovini. Lo stesso vale per linfociti T gamma delta WC1+, di solito in maggioranza nel sangue. I PBMC di capra rispondono molto a BCG, MAP, leptospira *in vitro* (risposta proliferativa a misurata con eFluor 670 per valutare le divisioni cellulari). Ci sono 27 geni WC1, il doppio del bovino. Ci sono 5 cassette di TCR gamma in capra, anche in più rispetto al bovino.

Wiarda J.E. Linfociti T gamma delta suini in intestino.

C'è una discrepanza tra sviluppo delle cellule T in intestino fino a 6-8 settimane di vita e lo svezzamento a tre settimane di vita. Linfociti gamma delta sono intraepiteliali (IEL) in ileo e colon. Le variabili che influiscono sono svezzamento / antibiotici / comparto intestinale. Sperimentazione con tre gruppi: controllo, trattato con antibiotici, trattato con ZnO. Da 7 a 35 giorni post svezzamento ci sono più gamma delta in colon rispetto al tenue. Diminuiscono pure nel tempo nel digiuno. Due popolazioni: CD2+/CD8+ (più differenziate) e CD2+CD8- (più presenti in tenue che in colon). Le cellule CD27+ sono frequenti in ileo, diminuiscono nel tempo. Scarso effetto di antibiotici su linfociti T gamma delta in ileo. Questi IEL possono essere: Natural IEL indipendenti da Ag, oppure Induced IEL, Ag- dipendenti. Le cellule non gamma delta sono ovviamente alfa beta in TCR, distinte in CD8alfabeta+ e CD8alfaalfa+ (omodimero).

Mejierink N. NK cells e microbiota nel pollo.

Reazioni immunitarie innate sono apprezzabili in uovo di pollo dal giorno 6 di incubazione. Immunità adattativa visibile da tre settimane di vita. Nel pollo, IEL includono NK. Queste hanno diversa espressione di perforina (CD107) che determina attività killer. È stato valutato l'effetto in pulcini di microbiota di galline adulte tramite prodotto CE (Competitive Exclusion, estratto fecale di

galline adulte). CI induce differenze transitorie di microbiota, con più ampia rappresentanza di specie batteriche. La più alta % di NK IL2R+ si osserva a tre giorni di vita in IEL di pulcini trattati con CI. In fasi successive, i pulcini trattati hanno anche le più alte prevalenze di CTL (linfociti CD8 citotossici) tra IEL.

Telfer J.C. Cellule gamma delta suine.

Nella scala zoologica i ricci di mare (sea urchins) non riarrangiano il TcR, ma compensano tale deficit usando ben 218 SRCR (Scavenger Receptor Cystein Rich) . Tale classe di recettori si è evoluto in WC1-like e CD163-like. Sono molecole con relazione stretta a CD5 e CD6. In bovino, cellule T gamma delta sono critiche per risposta a *Leptospira*. Esse sono più flessibili di cellule con TcR alfa beta, ovvero non rispondono solo a peptidi di proteine, ovvero c'è meno possibilità di eludere la risposta immunitaria dell'ospite. In bovino si distinguono due popolazioni, WC1.1 e WC1.2 . Le cellule 1.1+ hanno ruolo primario in risposta a *Leptospira*. Le cellule 1.2+ hanno ruolo critico nella risposta ad *Anaplasma*. Entrambe esprimono un proprio corredo di geni TcR. WC1 va considerato un co-recettore come CD4 e CD8. Ci sono almeno 10 geni WC1 nel suino, con struttura generale come nel bovino. MAb CC101, B37c10, PG2037 riconoscono gruppi distinti di WC1 in bovini e suini. È previsto di differenziare popolazioni WC1+ mediante “nanobodies libraries”.

Sessione plenaria 2. Modelli animali per comprendere l'immunità

Uzonna J. La memoria immunologica ha bisogno di costanti richiami ?

Le cellule della memoria conservano in parte caratteri di staminalità. Due modelli fondamentali: memoria Ag dipendente e Ag indipendente. Quest'ultimo modello è stato provato in topi KO per MHC I con trasferimento di cellule T CD8 (=impossibilità di “vedere” l'Ag). Modello analogo con cellule CD4. Però, se si recuperano le cellule T da topi con casi cronici di infezione, il modello non funziona. Infatti, nel modello *Leishmania*, la memoria richiede cellule CD4 Th1, IFN Gamma + che danno immunità a vita . Però, se il parassita è eliminato, la memoria scompare. Infatti, se si usa una mutante di *Leishmania* per diidrofolato reduttasi (DHFR), all'inizio i risultati sono simili a quelli ottenuti con soggetti di controllo “wild type” (WT). Poi no, poiché i mutanti DHFR muoiono e non lasciano protezione. Ovvero, memoria non persiste in assenza di antigene.

Tuggle Ch. Suini con immunodeficienza grave combinata (SCID)

Soggetti SCID: KO per enzimi critici della risposta immunitaria come RAG1, RAG2. Anche deficitari di IL2RG. ISU è un modello naturale di SCID nel suino. Deriva da studi su linee di suini a diverso Residual feed intake (RFI). Due suini a basso RFI infettati con PRRSV morirono e si scoprì che erano SCID. Tali animali non hanno reazioni di rigetto non avendo cellule B e T, ma solo NK. Analisi GWAS (Genome-wide Association Study) identifica regione in cromosoma 10 dove si realizza la mutazione responsabile del blocco delle ricombinazioni (gene Artemis). Se si infettano suini SCID con PRRSV, questi hanno meno replicazione virale nei primi 10 giorni PI. Ovvero, si ha meno permissività dei macrofagi all'infezione? Con il virus influenzale è vero invece il contrario. Sono necessarie "bolle" sterili per mantenere i suini SCID con pressione positiva di aria filtrata HEPA e fornitura di acqua sterile. Trapianti di cute umana in suini SCID sopravvivono. Suini SCID KO per IL-2R gamma sono anche NK-. Ruolo di Ag SIRPA che riconosce CD47 per inibire la fagocitosi. Cellule CD34+ umane possono sopravvivere in suini SCID e linfociti umani compaiono in linfonodi.

Tchilion E. Terapia con Ab in suini.

Ab diretti verso “testa” di emoagglutinina di virus influenzale sono in genere ceppo-specifici. Invece, Ab diretti verso il “tronco” di emoagglutinina possono essere cross-reattivi e possiedono funzioni legate al frammento Fc. Possono in particolare essere protettivi in vivo per topi e furetti. Ab F16 anti-virus influenzale è neutralizzante, cross-reattivo. In forma di aerosol protegge il suino

da infezione intranasale. Ab IgG1 suini non legano il recettore Fc umano. E' pensabile l'allestimento di piattaforme di produzione di Ab nell'organismo tramite plasmidi somministrati per elettroporazione. Gli Ab inoculati possono essere in versione umanizzata o suina. I migliori risultati si ottengono con 15 mg / kg. Vi sono tuttavia problemi per la risposta anti-Ig umane nel suino.

Davies Ch. J. Pecore KO per gene IFNAR (recettore di IFN tipo I)

Realizzata pecora con gene knock-out (KO) in recettore per IFN tipo I (IFNAR) mediante tecnologia CRISPR/CAS9. Fibroblasti di pecora KO danno titoli più elevati di virus Zika. Risultati analoghi *in vivo*, con più prolungata persistenza del virus. Saranno indagate le possibili conseguenze per IFN tau, prodotto dal trofoblasto di 12 – 15 giorni: blocca il rilascio di PGF2alfa da utero e salva così il corpo luteo e l'embrione.

Käser T. Modello suino per vaccino *C. trachomatis*

E' stato sviluppato un modello *C. suis* in scrofe già esposte, con l'ipotesi di indurre distinte ondate di cellule T central memory (Tcm) e cellule T effector memory (Tem). In effetti, un vaccino sperimentale *C. suis* inattivato in scrofe riduce il carico batterico dopo challenge. I dati degli Ab neutralizzanti sono inconclusivi. Le cellule T CD4 proliferanti sono per lo più Tcm (central memory), senza grosse differenze tra vaccinati e non vaccinati. Le differenze si apprezzano invece per risposta IFN-gamma e per % di cellule Tem CD4.

15 agosto 2019

Plenary session. Regulating innate immunity.

Moorlag S. Trained immunity (innate immune memory).

Il 95% delle specie viventi non possiede sistema immunitario adattativo. Il concetto di "memoria" immunologica è ora esteso a specie di invertebrati come insetti e perfino alle piante. Il modello consolidato nel topo è data da *C. albicans* low dose, che non funziona in presenza di macrofagi disattivati. In tali topi, la somministrazione di LPS provoca più sintesi di TNF-alfa e IL-6. *In vitro* si registra lo stesso fenomeno, sia con LPS che con Candida. La componente responsabile di Candida è il beta-glucano di parete, che provoca effetti epigenetici. Questi sono riferibili a due modelli generali: training e tolleranza. Nel training, si attuano modifiche di geni del sistema immunitario innato e del metabolismo, che si sposta verso la glicolisi. Si ha anche un modello BCG (vaccino anti-tubercolare) nell'uomo. Macrofagi da uomini vaccinati con BCG producono maggiori quantità di citochine in risposta a diversi stimoli (IL-1beta, IL-6, IFN-gamma) ed hanno maggiore attività NK. Mediante saggio di Chip Sequencing (sequenziamento del genoma immunoprecipitato) si notano differenze in H3K27ac (acetilazione della lisina 27 in istone H3). Anche la risposta a vaccino Yellow Fever: la viremia è ridotta, con correlazione al profilo del gene IL-1beta e ad acetilazione del gene NOD2. Anche la sopravvivenza dei macrofagi si allunga, il che è correlato a diversità del trascrittoma nel midollo osseo. I granulociti neutrofili circolanti si sdifferenziano verso maggiore attività effettoriale: + CD11b, -PDL1, + killing, con alterazione H3K4me3 (trimetilazione della lisina 4 in istone 3). Esiste infine una trasmissione intergenerazionale di tali modifiche, che comporta un maggiore reclutamento di leucociti ai punti d'infezione. Ci possono essere anche 2000 punti di metilazione divergente tra controlli e progenie di trattati. *In vitro*, i macrofagi bovini acquisiscono più attività litica dopo trattamento con micobatteri inattivati.

Mc Gill J.L. Uso di ceppo vaccinale BCG di *M. bovis* in vitelli.

Un bovino da carne su 5 ha malattia respiratoria negli USA. La prevalenza è stabile nonostante i vaccini impiegati. E' stato pertanto indagato l'uso di BCG *in vitro*. Ovvero, macrofagi bovini sono

stati trattati con BCG o terreno, lasciati poi riposare 3 giorni ed infine stimolati con ligandi del sistema immunitario innato come LPS, POLI:IC, ecc. I macrofagi trattati mostrano più secrezione di IL-6 e TNF-alfa. In vivo, BCG è stato somministrato a 10^7 UFC per aerosol in vitelli di 8 settimane di vita. Gli effetti di cui sopra sono stati pienamente confermati e non erano correlati a diversa frequenza di monociti o ad alterata espressione di TLR (Toll-like Receptors). Il metabolismo è pure modificato con più glicolisi e più produzione di lattato. Gli effetti permangono per almeno 16 settimane dopo il trattamento. Se il BCG è inoculato per via s.c. in vitelli, le cellule T gamma/delta hanno maggiori risposte TNF-alfa e IL-6 a LPS e lipopeptidi come Pam3CSK4. Lo stesso si verifica per comuni patogeni come BRSV, BVDV, Mannheimia. Tali fenomeni sono in corso di studio anche per due immunomodulatori in commercio come Zelnate (Bayer) e Amplimune (Victri).

Sessione concomitante. Immunità anti-virale del suino.

Revilla Y. Possibili ceppi vaccinali per peste Suina Africana (ASFV genes)

I ceppi vivi attenuati di ASFV sono più promettenti come possibili vaccini: possono anche proteggere ma sono poco sicuri. Il ceppo ASFV NHV/P68 può proteggere verso ceppo omologo ed eterologo producendo però avverse reazioni collaterali. Sono stati allestiti nuovi ceppi attenuati con tecnologia CRISPR/Cas9 diretta a geni CD2V e MGFS. In particolare, CD2V è implicato nel fenomeno di emoadsorbimento. MGFS è implicato invece nella risposta IFN β a ASFV mediata da segnalazione in cGAS-STING. Tale via di segnalazione è mantenuta con infezione da ceppo NHV/P68; è abrogata invece con ceppo patogeno Wild Type. Essa è attivata da contatto di DNA di ASFV con cGAS. In cellule infettate da ceppo NHV/P68, STING aderisce a microsomi perinucleari.

Zhu, J.J. Meccanismi di patogenesi di ASFV.

E' stata eseguita analisi trascrittomico di infezione ASFV in macrofagi suini. Sono stati rilevati centinaia di DEG (Differentially Expressed Genes) dopo infezione. E' caratteristica la ridotta espressione di IL-10 e la maggiore espressione di geni delle citochine infiammatorie con minore espressione dei relativi recettori. Sono anche modulati geni coinvolti in autofagia, apoptosi, processazione di peptidi MHC. Si nota anche più espressione dei geni IDO1 e CSF3. Il fenomeno di linfopenia indotto da ASFV

implica modulazione di TRAIL (associato a tossicità). Nel complesso, ASFV provoca:

- 1) Inibizione di attivazione in senso Th1 dei macrofagi
- 2) Minore processazione di peptidi.
- 3) Soppressione di risposte T.
- 4) Minore reclutamento di granulociti neutrofili.

Gerdts V. Antigen Presenting Cells (APC) e PRRSV

Esiste un'ipotesi sperimentale per la quale PRRSV infetta cellule antigen-presenting (APC) e ne compromette l'attività. In realtà, l'infezione da PRRSV è fortemente ristretta da espressione di CD163 in cellule mieloidi. Sono stati paragonati suini nelle seguenti condizioni:

- Vaccinati con vaccino influenza.
- Vaccino influenza + PRRSV
- Solo PRRSV.

Monociti ematici sono stati differenziati in vitro a macrofagi o a cellule dendritiche (DCs) per fare co-culture con linfociti T. E' stata analizzata la risposta Ab e la risposta IFN-gamma in saggio ELISPOT, nonché la risposta proliferativa. Non è stata evidenziata una significativa riduzione dell'attività delle cellule APC dopo infezione con PRRSV.

Chaikhumwang P. Vaccino PRRS a base di nanoparticelle

Sono stati studiati veicoli efficaci per vaccinazione intranasale. Sono state utilizzate Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) con PRRSV inattivato incapsulato, con / senza adiuvante. Gli studi di trasporto in macrofagi confermano il trasferimento di tali particelle. Tale vaccino riduce il carico virale nei polmoni dopo il challenge e induce più alti titoli di IgA mucosali rispetto ad altri vaccini.

Rogel-Gaillard C. Markers di immunocompetenza

Esiste un'ampia variabilità della risposta ai vaccini. Tale aspetto suggerisce di ricercare markers affidabili della risposta immunitaria. Nel modello vaccino Influenza suina, è stato allestito un data base da analisi RNA-seq ed è stata eseguita Ingenuity® Pathway Analysis. Sono stati rilevati 91 DEG (Differentially Expressed Genes) precoci (afferenti a migrazione leucocitaria, maturazione leucocitaria, vitalità) e 269 DEG tardivi (ciclo cellulare) a tempi diversi. Mediante partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) sono stati evidenziati i 93 geni maggiormente predittivi della risposta. Tale gruppo non comprende la risposta IgG ai vaccini.

Sessione concomitante. Immunità mucosale

Saif L. Ruolo della vitamina A

Nella patogenesi delle infezioni neonatali da Rotavirus sono fondamentali l'atrofia dei villi intestinali e l'iperplasia delle cripte intestinali. Il problema principale sono lo stato non immune dei neonati e le carenze nutritive. I risultati ottenuti con i probiotici sono stati molto vari. E' stato pertanto studiato il trattamento con vitamina A in suinetti gnotobiotici (sensibili a ceppi di Rotavirus umani). Del resto, il metabolismo del retinolo è molto simile tra suino e uomo. In tali condizioni, acido retinoico è generato da cellule dendritiche (DCs) CD103+, che inducono homing di linfociti B e T, nonché maggiore prevalenza di cellule Treg secernenti IL-10, correlate all'integrità dell'epitelio intestinale. Al contrario, in soggetti con deficienza neonatale di vitamina A (VAD), la vitamina A è fortemente ridotta nel fegato. VAD sopprime le risposte Treg e DC CD103+, anche con minore risposta in Cellule Secernenti IgA (IgA SC). VAD riduce l'efficacia dei vaccini Rotavirus e aggrava la malattia. Tuttavia, la supplementazione di vitamina A in suinetti VAD non risana la situazione. Il rischio di VAD aumenta col tempo di gestazione e per livello di parto (massimo nelle scrofette).

E' possibile ipotizzare effetti analoghi di vitamina A sulla Porcine Epidemic Diarrhea (PED) da Coronavirus, specie sul profilo dell'immunità colostrale. In effetti, vit. A stimola espressione di molecole di homing mucosale e IgA secretorie. La somministrazione di vit. A a scrofette nel 3° trimestre di gravidanza determina aumento di IgA SC nel latte, con rafforzamento dell'asse enteromammario.

Sessione concomitante. Novel systems.

Wilson H.L. Vaccino ricombinante Lawsonia intracellularis

Lawsonia sostiene enteropatia proliferativa. E' un patogeno intracellulare obbligato, con massima affinità per gli enterociti immaturi nell'ileo. Ci sono forme croniche e acute in magroni (diarrea emorragica e alta mortalità). E' possibile marcare i batteri con fluorocromo CSFE e studiare interazione con cellule IPEC-1. Sieri iperimmuni di coniglio bloccano l'ingresso di Lawsonia in tali cellule. Le proteine separate di Lawsonia sono state separate e marcate con fluorocromo Cy5. Le proteine marcate sono state analizzate con elettroforesi bi-dimensionale (2-D). Sono poi state analizzate in spettrometria di massa le proteine batteriche che si legano alle cellule. I sieri generati verso 4 proteine di Lawsonia inibiscono la penetrazione in cellule IPEC-1.

Riva F. Ruolo di IL-1R8 e Toll-like receptors nella patogenesi di DLBCL del cane.

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è uno dei linfomi più diffusi e aggressivi del cane. Questo linfoma è costituito da un insieme di forme cliniche molto eterogenee, difficili da caratterizzare morfologicamente e per immunofenotipo. Recenti studi hanno evidenziato il ruolo chiave nella patogenesi di DLBCL di una deregolata attivazione di NFκB. IL-1R8 è un regolatore negativo dell'attivazione NFκB-dipendente da recettori TLR e ILR, che ha già dimostrato in precedenti studi un ruolo importante nella progressione di un'altra neoplasia delle cellule B quale la CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia). Per meglio comprendere il ruolo di IL-1R8 nella patogenesi di DLBCL del cane abbiamo paragonato 50 campioni di cani affetti dal linfoma con 12 campioni di donatori sani mediante RNAseq, qPCR, immunoistochimica e analisi della metilazione. IL-1R8 è risultato significativamente meno espresso nei soggetti affetti da DLBCL rispetto ai controlli, mentre TLR7, TLR9 e Myc sono risultati significativamente più espressi. Inoltre IL-1R8 è significativamente meno espresso nei casi di DLBCL più aggressivi. Il modello qui proposto ipotizza un aumento dell'espressione dei TLR7 e 9 (forse dovuto a infezioni virali) e una concomitante ridotta espressione di IL-1R8. Questo porterebbe a una sregolazione dell'attivazione di NFκB nei linfociti B, che risultano quindi più attivati e resistenti all'apoptosi. Inoltre la sregolazione di NFκB è nota promuovere instabilità genica con attivazione di oncogeni, come ad esempio Myc e conseguente trasformazione in senso neoplastico.

16 agosto 2019

Sessione concomitante. Ruminant immunity.

Balligall K. Vaccino *Mannheimia haemolytica* in pecore

Mannheimia haemolytica sostiene mastite in pecore, setticemia o malattia respiratoria in agnelli. Il vaccino dato per via parenterale non protegge verso la mastite. Si può pensare di darlo in mammella come boost dell'immunità? Dopo una prima vaccinazione s.c., il vaccino è stato inoculato ancora a pecore per via s.c. o intramammaria. Dopo 7 giorni è stato eseguito il challenge intramammario. I quarti mammari sono risultati completamente protetti. dopo inoculo del vaccino intramammario. Tuttavia, se il tempo tra vaccinazione e challenge si allunga a due settimane, non si osserva più alcuna protezione in termini di concentrazione batterica nel latte. Effetto a 1 settimana dovuto a "training" delle cellule mieloidi con regolazione epigenetica?

Deگو O.K. Vaccini *S. aureus* in bovine da latte

Nel bovino, gli attuali vaccini *S. aureus* (Lysigin e Startvac) hanno limitata efficacia profilattica per mastite. Nuovi possibili antigeni sono le proteine di superficie di *S. aureus* e *S. chromogenes* (SASP e SCSP). E' stata eseguita vaccinazione in asciutta di bovine da latte a -28, -14, 0 giorni dal parto con vaccino emulsionato su gruppi di 6 bovine l'uno. Il challenge è stato eseguito mediante immersione di 15 secondi (dipping) del capezzolo in sospensione di *S. aureus* in fase log di crescita. I vaccini hanno prodotto buona risposta Ab IgG1 e IgG2. Si è registrato paradossalmente un certo effetto protettivo eterologo di SCSP, ma non di SASP. In un secondo studio con 3 inoculazioni di SCSP dalla messa in asciutta e challenge a 7-14 giorni dopo il parto, si sono registrati risultati analoghi.

Elnagger M.M. Sotto-popolazioni T in ruminanti.

Sono state definite le sotto-popolazioni T esprimenti IFN-gamma / IL-17A / TNF-alfa dopo stimolazione dei leucociti mononucleati di sangue periferico (PBMC) con forbolo-miristato-acetato (PMA) / ionomicina. Trattasi di stimolo che massimizza induzione e secrezione delle citochine di cui sopra. Nei bovini, sono positivi i linfociti CD4 / CD8 / gamma delta (in prevalenza CD2+ CD8+). Nella pecora, grossa maggioranza di cellule CD8 e di gamma delta CD8-. Nella capra, al contrario, ruolo primario di linfociti T gamma delta CD8+.

Per IL-17A, nel bovino si ha risposta preferenziale di cellule CD4+ e gamma delta (WC1+, CD8-).

Per TNF alfa, in bovini si hanno risposte di cellule CD4, CD8, gamma delta (CD2+, CD8+). In capra si conferma il ruolo principale di cellule gamma delta CD8+.

Jungersen G. IFN-gamma e ParaTB

IFN-gamma è centrale per attivazione dei macrofagi ed eliminazione dei micobatteri. Questi possono esprimere antigeni precoci e tardivi nella replicazione. Importante la vaccinazione per ParaTB del vitello con antigeni MAP opportuni quando il vitello è immunocompetente. Si registrano nel tempo aumenti paralleli di risposta IFN-gamma a MAP di vitelli vaccinati e di controllo. Tali risposte IFN-gamma non hanno una correlazione significativa con titolo PCR per MAP in intestino. Si potrebbe anche pensare che in seguito ad uno stimolo vaccinale forte si determini una risposta prevalente di linfociti Tem (T effector memory) non rappresentata nel sangue, bensì negli organi bersaglio. I risultati non cambiano in sostanza con l'uso di adiuvanti più o meno forti dei vaccini.

Capozzo A.V. BVDV e interferone di Tipo III

In PBMC bovini, IFN-alfa ricombinante ha effetti pro-apoptotici, mentre IFN III (lambda) no. *In vivo*, è stato impiegato IFN lambda a 6 U / kg p.v. s.c. in vitelli infetti da BVDV. Tale trattamento ha bloccato l'insorgenza dei sintomi di malattia. Inoltre, la viremia risultava soppressa in 3 vitelli su 4, con blocco totale dell'escrezione virale. Il trattamento con IFN lambda comporta minore risposta TNF alfa e maggiore risposta IL-10 a due giorni post infezione.

Sessione concomitante. Predicting immunity.

Käser T.

Gruppi di suini non immuni sono stati inoculati con ceppo PRRSV patogeno ed attenuato, vaccinale. La viremia è stata simile per i due ceppi tra 7 e 28 giorni p.i. Anche la risposta in Ab IgG è stata simile, con inizio a 7-10 giorni p.i. Il patogeno ha indotto Ab neutralizzanti per entrambi i ceppi a partire da 7-10 giorni p.i. a differenza del ceppo attenuato. La risposta Th (T helper) è cominciata a 14 giorni p.i. con picco a 28. La risposta CTL CD8+ è stata molto più bassa. La risposta T gamma delta è stata osservata tra 14 e 56 giorni p.i. Sono state osservate discrepanze in risposta IFN-gamma *in vitro* usando ceppi diversi nel saggio. Sarebbe inoltre apprezzabile una correlazione tra risposta proliferativa di cellule Th e caduta della viremia. Le cellule Th naive non immuni sono CCR7+. Le cellule gamma delta naive sono invece CCR7-, ma diventano positive dopo esposizione a PRRSV (vedi manoscritto degli autori in pubblicazione su Viruses).

POSTERS

P001. Ballingall K.T. Resistenza ai parassiti e ricchezza allelica MHC

La selezione di capre per resistenza ai parassiti gastro-intestinali (n. uova nelle feci) è correlata a riduzione del n. di alleli MHC II di tipo DR, che sono però più distanti tra loro in senso filogenetico. Ovvero, con meno alleli si ha comunque più possibilità di presentare con efficacia peptidi diversi.

P003. Karagianni A.E. Effetti immunosoppressivi del training nel cavallo.

L'allenamento intenso ha effetti immunosoppressivi nel cavallo sportivo, come evidenziato da minore espressione di geni della risposta immunitaria nei macrofagi alveolari (IFN alfa e beta, NKkB, STAT 4, CXCL9). Tale dato può essere correlato a frequenti patologie respiratorie quali l'asma e l'emorragia polmonare da esercizio. In citometria i macrofagi equini possono essere evidenziati con mAb anti-CD163 umano.

P004. Mc Gill J. Carezza di vitamina A in vitelli e risposta a BRSV

Valori plasmatici di vitamina A < 0,2 ppm indicano carezza di vitamina A. Tale carezza aumenta la gravità delle forme da virus respiratorio sinciziale (BRSV) in vitelli giovani ed inibisce a risposta al vaccino BRSV i.n. Tale carezza altera l'ambiente infiammatorio e l'omeostasi della risposta immunitaria. Il virus di per sé abbassa la concentrazione di vitamina A.

P012. Okino C.H. Eliminazione dei falsi positivi in citometria da legame con FcR

1,25 microgrammi / ml di IgG murine purificate bloccano efficacemente le interazioni aspecifiche con recettore Fc. Trattasi comunque di effetto che si somma a quello di alcuni fluorocromi critici come PE-CY5.

P019. Altvater-Hughes T. IgG in colostro di bovini da latte e da carne.

Bovine da carne producono colostro di migliore qualità, con più alte concentrazioni di IgG. Tuttavia, il difettivo trasferimento di IgG (FPT) si realizza anche in vitelli da carne. Nei bovini da latte si registra un minore polimorfismo del recettore di IgG in intestino (FcRn).

P026. Cartwright S. Risposta a shock termico di PBMC bovini

I PBMC di soggetti bovini selezionati per alta reattività immunitaria hanno più proliferazione da ConA e più produzione di HSP70 dopo 1 e 2 trattamenti termici in vitro a 42°C per 4 ore.

P053. Amadori M. La risposta IFN-gamma a M. avium è correlata a rischio di chetosi bovina

La chetosi è una malattia metabolica associata a ridotta immunocompetenza. Tredici bovine Frisone pluripare vennero monitorate da -21 a + 28 giorni dal parto. Le bovine vennero assegnate sulla base dei valori di beta-idrossibutirrato ai gruppi Controllo (CTR, BHBA < 1.4 mmol/L; 7 bovine) e Chetosi (KET, BHBA > 1.4 mmol/L; 6 bovine). La risposta in IFN-gamma in vitro a M. avium (microrganismo ubiquitario negli allevamenti) mostrava differenze significative prima (-21 giorni) e dopo il parto (+ 28 giorni), con valori più elevati in gruppo KET rispetto a Controllo (P < 0.05). Quindi, una maggiore risposta IFN-gamma a M. avium è associato a più elevato rischio di chetosi dopo il parto. Tale effetto è da ascrivere alla potente modulazione del metabolismo lipidico esercitata da IFN-gamma (inibizione del fattore di trascrizione PPAR-gamma) in un periodo (il periparto) in cui la regolazione omeostatica delle bovine da latte non è ottimale.

P064. Amadori M. Ruolo di IgA nei liquidi orali nel controllo di infezione da PRRSV

Il picco della risposta IgA nei liquidi orali di suini infetti da PRRSV coincide in campo con la cessazione dell'escrezione virale nell'ambiente. Abbiamo in effetti confermato *in vitro* che liquidi orali con presenza bilanciata di IgA e IgG hanno forte attività antivirale, a differenza di liquidi orali con prevalenza di IgG. Questi possono anche potenziare l'infezione da alcuni ceppi di PRRSV. Abbiamo quindi separato IgA dimeriche, Ig monomeriche e IgG da liquidi di suini infetti mediante gel filtrazione e cromatografia di affinità su Proteina A. Anche le frazioni separate hanno confermato i dati di cui sopra, con differenze importanti tra macrofagi alveolari e macrofagi differenziati da monociti ematici. Un'attività antivirale venne infine osservata dopo interazione di IgA con macrofagi suini in assenza di virus. Tale fenomeno è da ascrivere probabilmente a una modulazione della recettività dei macrofagi all'infezione da PRRSV.

P069. Grandoni F., Martucciello A. Infezione sperimentale con BVDV di bufali.

Due bufale sane, gravide, siero-negative per BVDV vennero infettate per via intranasale con BVDV al giorno 81 di gestazione. La conta leucocitaria si abbassò a 2,3,4 giorni p.i. in forma non significativa. Dal giorno 0 al giorno 3 p.i. si registrò una riduzione significativa ($P < 0,01$) dei linfociti T circolanti, dovuto a diminuzione dei linfociti T CD4+ (37,2% contro 10,1%, $P < 0,01$). Al contrario, i linfociti T gamma delta WC1+ aumentarono in forma significativa (8.3% contro 33.6%, $P < 0,01$). A 14 giorni p.i., i parametri analizzati non mostravano differenze significative rispetto ai valori osservati prima dell'infezione. Pertanto, anche nel bufalo, BVDV mostra un tropismo per linfociti T CD4+ e i linfociti T gamma delta WC1+ potrebbero avere un ruolo importante per il controllo dell'infezione.

P071. Riva F. Valutazione di killing batterico in campioni di latte bovino

La mastite nei ruminanti da latte è un grave problema che causa ingenti perdite economiche. Recenti studi hanno dimostrato come le razze autoctone siano più resistenti alla mastite. Per meglio comprendere i meccanismi alla base di tale resistenza abbiamo studiato la diversa prevalenza di infezioni intramammarie e la attività di parametri immunitari nel latte di bovine da latte di diverse razze. In particolare il latte prelevato da singolo quarto da bovine Holstein Friesian (HF) e Modenesi (MO) allevate nella stessa stalla con le medesime condizioni è stato analizzato a diversi time point di lattazione mediante batteriologia classica, test NAGase (N-acetyl- β -d-glucosaminidase) e capacità di killing. Le bovine Modenesi hanno presentato un numero di quarti infetti inferiore alle HF. Inoltre il latte delle MO ha presentato più elevata attività antibatterica (killing di *S. aureus*), soprattutto al tempo 2 (ovvero nel colostro). Ciò potrebbe spiegare la capacità delle MO di risolvere spontaneamente infezioni da *S. aureus* senza necessità di trattamenti farmacologici.