

Studio del ruolo della immunità innata del cavallo nel controllo dell'infezione dell'Anemia Infettiva Equina

G. Cardeti¹, A. Cersini¹, G. Manna¹, R. Nardini¹, M. Cittadini¹, S. Sittinieri¹, R. Conti¹, G. Pietrella¹, S. Tofani¹, R. Reina Arias², S. Rosati³, M.T. Scicluna¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", via Appia Nuova 1411 - Roma

²Instituto de Agrobiotecnología CSIC-UPNA, Pamplona, Navarra, Spagna

³Università degli Studi di Torino, Dip. di Scienze Veterinarie, Largo Paolo Braccini, 2 - Grugliasco, Torino

Progetto di Ricerca corrente IZSLT 09/17 RC

Responsabile scientifico: Maria Teresa Scicluna, UOC DO Virologia

Introduzione e scopo della ricerca

L'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa contro i patogeni, in grado di controllare le infezioni da lentivirus in specie animali come primati, gatti e piccoli ruminanti [1]. Poco conosciuti invece sono i meccanismi di restrizione innata messi in atto durante l'infezione nel cavallo da virus dell'Anemia Infettiva Equina (EIAV), genere *Lentivirus*, famiglia *Retroviridae* [2]. Scopo principale della ricerca: studio *in vitro* dell'immunità innata del cavallo mediante la stimolazione di macrofagi con citochine equine e con ceppi di riferimento dell'EIAV; identificazione e studio filogenetico dei ceppi circolanti in Italia.



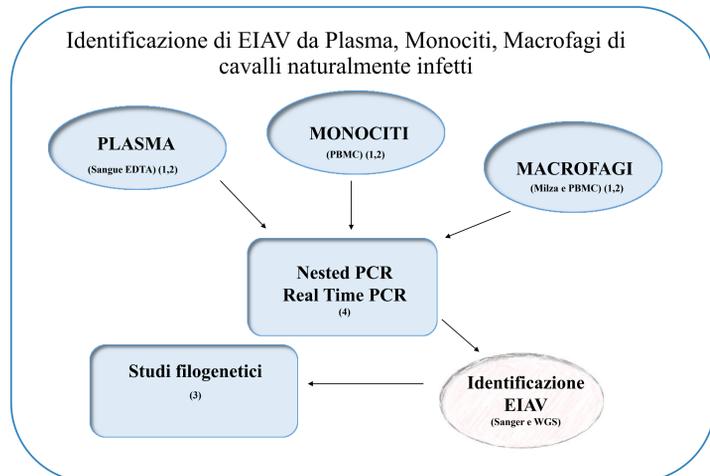
Metodologia

- Messa a punto e utilizzo di due specifici protocolli per: isolamento di Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) a partire da sangue periferico in EDTA mediante chiarificazione, concentrazione e separazione con Histopaque® ed isolamento di macrofagi derivati da monociti equini (da milza e da sangue periferico) [1].

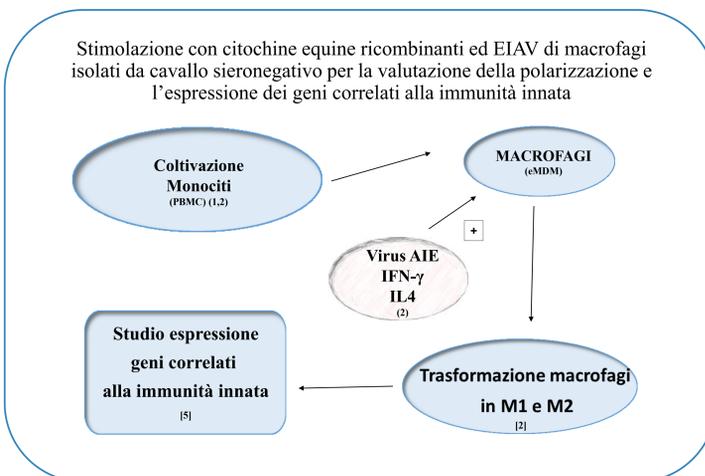
- Studi *in vitro* di immunità innata su monociti/macrofagi da cavalli negativi per EIAV.

- Applicazione di protocolli per il sequenziamento e lo studio filogenetico degli isolati [3]

A - STUDIO DI IDENTIFICAZIONE E DI FILOGENESI CONDOTTI SU N.56 CAVALLI POSITIVI PER EIAV



B - STUDIO *IN VITRO* DI IMMUNITÀ INNATA SU MONOCITI/MACROFAGI DI CAVALLI NEGATIVI PER EIAV



Risultati

A - STUDIO DI IDENTIFICAZIONE E DI FILOGENESI CONDOTTI SU CAVALLI POSITIVI PER EIAV

Isolamento di EIAV - Equine Monocyte-Derived Macrophage (eMDM) prelevati a soggetti EIAV sieropositivi sono stati isolati dai PBMC di 13 cavalli. I monociti si sono evoluti da cellule piccole e arrotondate a cellule grandi a) con pseudopodi o b) con margini irregolari ed estensioni protoplasmatiche (Fig.1), prima della loro morte che avviene generalmente a 3 o 4 settimane.

Metodi molecolari - la nested-PCR ha rilevato EIAV in 9 soggetti (Fig.2); sono state ottenute 4 sequenze identificate come: EIAV-27309L/2013 (due), Austria (95% di omologia) e EIAV-F3/2016 (due), Irlanda (92% di omologia). L'analisi del WGS ha evidenziato una correlazione con ceppi francesi caratterizzati nel 2009 [6].

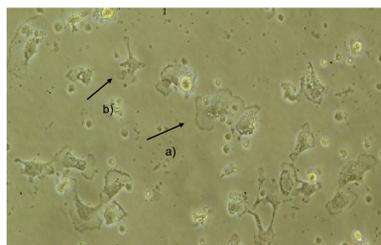


Fig.1 - eMDM Tipo a) e b) a 8 gg dopo l'adesione al substrato (40X)

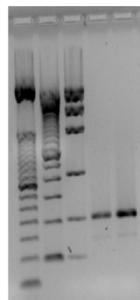


Fig.2 - EIAV F3/2016 prodotti di PCR LTR-tat; 203 bp

B - STUDIO *IN VITRO* DI IMMUNITÀ INNATA SU MONOCITI/MACROFAGI DI CAVALLI NEGATIVI PER EIAV

Isolamento di EIAV - Sulla base della morfologia, la stimolazione con IFN- γ ha polarizzato i macrofagi verso l'isoforma M1 (Fig.3), mentre la stimolazione con IL-4 ha polarizzato verso l'isoforma M2 (Fig.4). L'infezione con ceppi di riferimento EIAV (Wyoming e Miami) ha indotto in entrambi i casi una morfologia simile a quella di M1.

Metodi molecolari - La PCR per PanHerpesvirus [7] ha escluso in tutti i campioni la presenza di herpesvirus equini.

Lo studio della polarizzazione M1/M2 degli eMDM sottoposti alla stimolazione con le due citochine equine ricombinanti IFN- γ e IL-4 o infettati con il virus dell'AIE, mediante real time PCR SybrGreen ha rilevato un livello di espressione dell'mRNA dei geni proinfiammatori (MMP13 e IL-6) che conferma i risultati della morfologia della coltura cellulare.

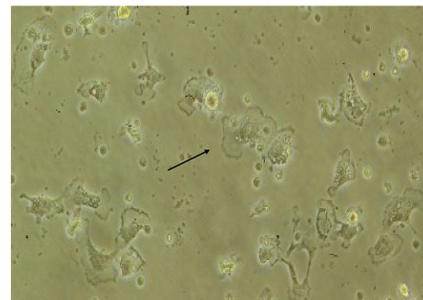


Fig.3 - eMDM tipo M1 a 7 gg dopo stimolazione con IFN- γ (40X)



Fig.4 - eMDM tipo M2 a 24 gg dopo stimolazione con IL-4 (20X).

Discussione e Conclusioni

Gli eMDM isolati da PBMC rappresentano una matrice biologica adatta per l'isolamento di EIAV da utilizzare per vari scopi tra cui l'analisi filogenetica dei ceppi e studi di immunità innata. Il sequenziamento e l'NGS hanno confermato che ceppi circolanti da noi identificati sono simili a quelli identificati in altri paesi europei.

Come osservato per altre infezioni da lentivirus, IFN- γ e IL-4 hanno polarizzato morfologicamente l'eMDM rispettivamente verso le isoforme M1 e M2. Relativamente all'infezione da EIAV, in questo studio il virus si sarebbe comportato come l'IFN- γ polarizzando i macrofagi verso l'isoforma M1 e inducendo l'espressione di marcatori proinfiammatori MMP13 e IL-6, avvalorando l'ipotesi che *in vivo* la risposta immunitaria innata potrebbe limitare la replicazione del virus. La quantificazione della carica virale nelle cellule infette che è in corso, aiuterà a comprendere il ruolo dell'attività proinfiammatoria o antinfiammatoria negli eMDM polarizzati M1 o M2 coinvolti nel controllo dell'infezione da EIAV. Prosegue anche l'attività di valutazione dei marcatori innati equini, identificati sulla base della differenziazione dei macrofagi che può contribuire ad identificare sottopopolazioni di macrofagi in grado di limitare la replicazione di EIAV [5].

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute, progetto RC IZSLT 09/17

Bibliografia

1. Raabe MR et al. (1998). J. Virol. Meth. 71:87-104
2. Crespo H et al. (2013). Vet. Res. 44:83
3. Colitti B et al. (2019). Plos One 21;14(2):e0212585
4. Scicluna MT et al. (2013). Vet Microbiol. 165:123-134
5. Menarim BC et al. (2020). Front. Vet. Sci. 7:568756
6. Deshiere et al. (2019). Virology 537:121-129
7. VanDevanter DR et al. (1996). J of Clin Microbiol. 34: 1666-71