

SINTESI IN ITALIANO [titolo in italiano, testo comprensivo di obiettivi, breve sintesi della metodologia, risultati della ricerca, breve discussione e conclusione, con grafici, tabelle e bibliografia più significativi (formato A4, interlinea 1, carattere Times New Roman normale 12 punti); recapito e-mail dell'UO; indicazione delle parole chiave; indicazioni per consentire la citazione del rapporto (autori, mail riferimento, anno, titolo, ecc)]

Titolo:

Studio del ruolo dell'immunità innata del cavallo nel controllo dell'infezione dell'anemia infettiva equina

[Testo]

Il virus dell'Anemia Infettiva Equina (EIAV) appartiene al genere Lentivirus, famiglia Retroviridae. All'interno dello stesso genere si trovano, oltre al virus dell'immunodeficienza umana (HIV) altri importanti patogeni di interesse veterinario come il Bovine Immunodeficiency virus (BIV), il Feline Immunodeficiency virus (FIV) e il complesso dei Lentivirus dei Piccoli Ruminanti (SRLV).

I lentivirus sono specie-specifici e l'immunità innata sarebbe alla base della barriera di specie e dei meccanismi di trasgressione e blocco. Come descritto per i lentivirus dei piccoli ruminanti, ciò potrebbe verificarsi anche nei confronti dei lentivirus omologhi. L'attività dell'immunità innata è esercitata precocemente rispetto alla risposta del sistema adattativo, in quanto in grado di individuare pattern molecolari specificamente associati ai patogeni attraverso differenti molecole con funzione di recettori di riconoscimento degli stessi. A seguito del riconoscimento, i segnali di trasduzione delle cellule immunitarie (macrofagi e/o cellule dendritiche), inducono una serie di eventi in grado di contrastare l'infezione. Il provato riconoscimento dell'efficace inibizione sul ciclo di replicazione virale, è alla base dell'aumento d'interesse per i fattori intrinseci dell'immunità innata. La letteratura scientifica riporta studi sul ruolo del sistema di restrizione innato nel controllo dei lentivirus nei piccoli ruminanti (2, 3) e anche HIV, tuttavia, non esistono in analogia ricerche nel modello equino per quanto riguarda EIAV. Inoltre, per quest'ultimo, sono disponibili in letteratura studi filogenetici limitati ad alcune porzioni dell'acido nucleico virale, mentre sono poche le sequenze dell'intero genoma in grado di fornire informazioni utili anche per scopi diagnostici.

L'obiettivo generale del progetto è la ricerca diretta/indiretta della presenza nel cavallo dei geni responsabili del sistema di restrizione innato e la valutazione "in vitro" dei suoi meccanismi di azione nei confronti di EIAV.

[obiettivi]

Obiettivi del progetto sono stati i seguenti: individuazione della popolazione equina da campionare ai fini dello studio; isolamento di stipiti virali circolanti a livello nazionale; caratterizzazione molecolare dei ceppi di campo; isolamento e caratterizzazione dei macrofagi a partire da differenti matrici biologiche; valutazione della produzione virale e dell'espressione dei marker di polarizzazione.

[breve sintesi della metodologia]

Selezione popolazione da sottoporre a campionamento

Indagini per EHV2 ed altri herpesvirus equini (EHV1, EHV4, EHV5)

Isolamento di macrofagi da milza e da sangue periferico

Isolamenti virali ed amplificazione dei ceppi da macrofagi e da siero/plasma

Caratterizzazione del genoma virale in assenza di isolamento in coltura

Verifica dell'attività RT dal surnatante delle colture di macrofagi e dal siero/plasma di soggetti infetti
Analisi dei dati per la caratterizzazione molecolare degli stipiti con particolare attenzione agli aspetti epidemiologici
Aggiornamento delle relazioni filogenetiche ed evolutive dei ceppi circolanti rispetto alle referenze depositate
Caratterizzazione dei marker di polarizzazione mediante PCR real time
Conferma dei marker dei fattori di restrizione e di immunità naturale con RT-PCR quantitativa
Caratterizzazione dei pattern di espressione in seguito a infezione con stipiti di referenza e/o di campo
Quantificazione dei livelli di produzione virale in macrofagi polarizzati
Formazione del personale delle UUOO sugli aspetti di propria competenza

[risultati]

I risultati dell'attività di ricerca sono stati i seguenti:

- messa a punto di protocolli standardizzati per l'isolamento e la coltura di un virus fino ad oggi non sufficientemente studiato per le difficoltà incontrate impiegando comuni metodologie virologiche *in vitro*;
- isolati ceppi di campo in macrofagi isolati da milza e sangue periferico di cavalli sieropositivi per AIE;
- verifica sulla capacità di differenziazione dei macrofagi in sottopopolazioni a seguito di stimolazione con citochine e conseguente espressione dei geni responsabili dei meccanismi di restrizione in animali sani;
- caratterizzazione degli stipiti virali isolati mediante sequenziamento Sanger e NGS ai fini degli studi filogenetici e per la messa a punto di metodiche molecolari dotate di elevata sensibilità diagnostica;
- caratterizzazione dei pattern di polarizzazione della linea macrofagica in cavalli non infetti, mediante stimolazione con IFN- γ (M1) e IL4 (M2);
- tutti i campioni esaminati (materiale biologico e surnatanti di colture macrofagiche) sono risultati negativi in PCR per Herpesvirus equini.

[breve discussione e conclusione]

Nell'ambito del presente progetto di ricerca, sono stati messi a punto dei protocolli di isolamento e di coltivazione *in vitro* di macrofagi equini, che hanno permesso di ottenere cellule dalle quali è stato possibile amplificare e sequenziare quasi l'intero genoma del virus dell'anemia infettiva equina (AIE), usando l'NGS.

La matrice biologica risultata più efficace per l'isolamento e coltivazione dei macrofagi ai fini della replicazione del virus dell'AIE è rappresentata dal sangue intero con anticoagulante, con risultati migliori se confrontati con quelli ottenuti da milza.

In maniera preliminare, dai sequenziamenti ottenuti con le diverse metodiche è stato possibile con l'utilizzo del protocollo Nested PCR LTR-tat correlare i ceppi di EIAV italiani con quelli identificati in Mongolia ed Austria, denotando un'ampia circolazione virale.

Invece, la sequenza del genoma ottenuta con la tecnica NGS, ed in particolare per il gene Gag, indica che l'EIAV rilevato sia relativamente divergente dai ceppi presenti nei database disponibili.

Infatti, la maggiore similarità basata su Gag è da riferirsi a ceppi francesi caratterizzati nel 2009 (identità di sequenza nucleotidica 84,2%).

La notevole divergenza riscontrata a livello di proteina TM fra l'isolato Frosinone ed il ceppo di riferimento Wyoming è meritevole di ulteriori approfondimenti. Tale sequenza infatti è spesso incorporata come antigene diagnostico in alcuni kit commerciali e potrebbe non essere in grado di rilevare anticorpi da soggetti infetti con stipiti così divergenti. Sarà quindi utile generare peptidi sintetici corrispondenti ai ceppi circolanti in Italia per una verifica delle performance diagnostiche, soprattutto nelle popolazioni equine residenti in aree interessate da recenti focolai.

Per l'attività relativa all'ottenimento di colture di macrofagi di cavalli non infetti ai fini della valutazione della polarizzazione nelle diverse sottopopolazioni mediante stimolazione con IFN- γ (M1) e IL4 (M2) i protocolli di esecuzione (isolamento dei macrofagi, stimolazione con citochine equine, infezione con EIAV) messi a punto, hanno permesso di rilevare che i monociti da sangue periferico si differenziano sempre in macrofagi, spesso dando origine a popolazioni miste morfologicamente riferibili a M1 e M2. L'aggiunta di citochine specifiche o di un antigene virale, determina una differenziazione più specifica.

Nei nostri esperimenti, sono state utilizzate citochine equine del commercio Interferon-gamma (IFN- γ) e Interleuchina 4 (IL4) equine ricombinanti: la stimolazione con citochina IFN- γ ha polarizzato i macrofagi verso l'isoforma M1 (a uovo fritto, con forma più o meno irregolare); la stimolazione con citochina IL4 ha polarizzato i macrofagi verso l'isoforma M2 (emissione di lunghi pseudopodi, simile a cellule fibroblastiche).

L'infezione virale (virus AIE ceppo Wyoming e ceppo Miami) ha determinato la trasformazione morfologica dei macrofagi in M1.

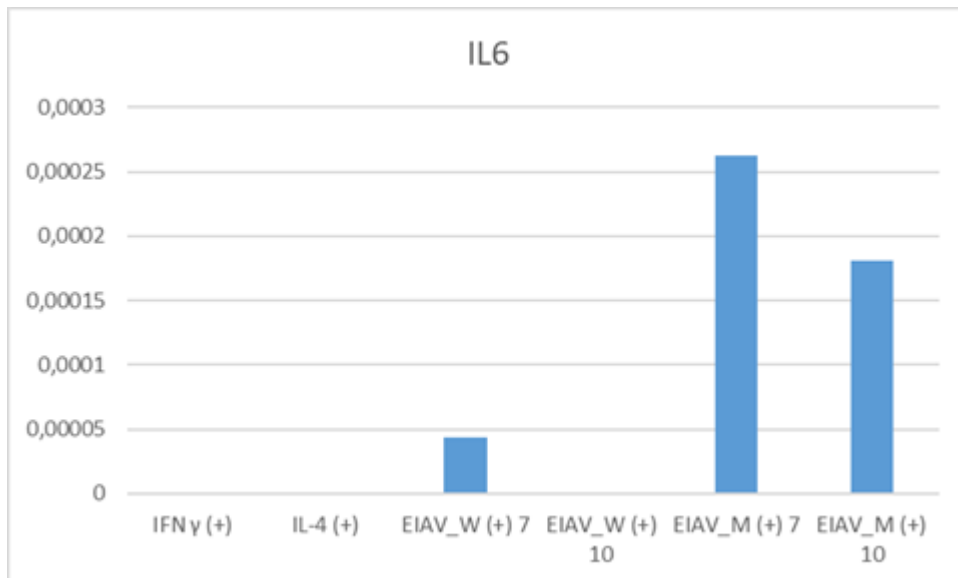
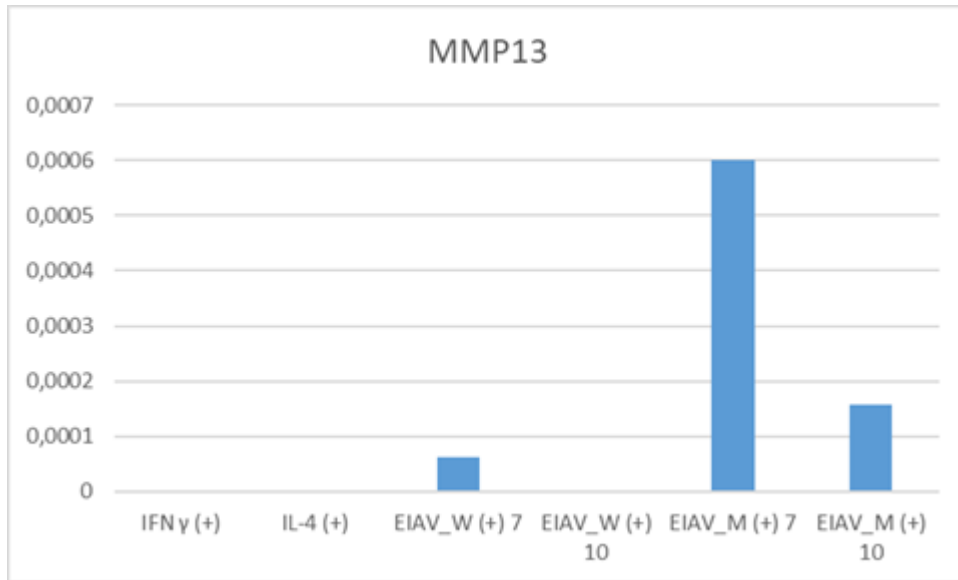
Ai fini dello studio della polarizzazione dei macrofagi equini in seguito a stimolazione con citochine e virus, è stato possibile verificare che il sistema di rilevazione con i primers scelti e la SybrGreen PCR, funziona. Mentre l'interpretazione dei risultati è in corso, continueremo ad individuare nuove coppie di primers per nuovi geni al fine di ampliare lo studio di espressione e porre le basi per il successivo sviluppo di una metodica in NGS.

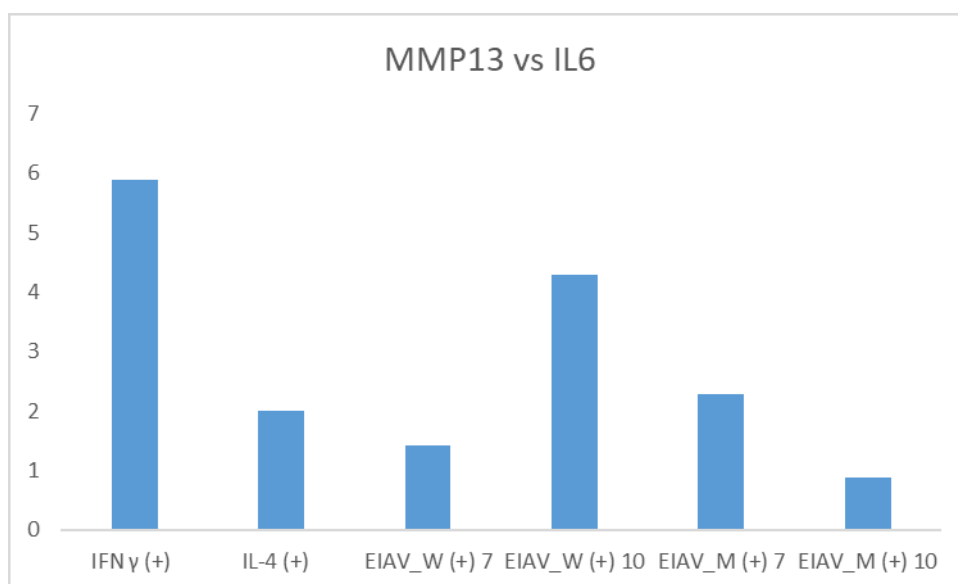
Purtroppo due anni di pandemia da COVID-19 hanno sensibilmente rallentato l'esecuzione delle attività previste dal progetto in quanto il laboratorio di Virologia dell'IZSLT (UO 1) è tra i laboratori incaricati di eseguire la diagnostica molecolare del SARS-CoV-2. Per questo motivo, non è stato possibile portare a termine alcune attività previste dal progetto.

Lo studio più approfondito dei geni di espressione dei marker di polarizzazione degli eMDM sia citochina-indotta che virus-indotta, potrà aiutarci a capire se tali marker sono nel cavallo gli stessi riscontrati in altre specie animali (suini, ovini, caprini, uomo) con modalità simili di attivazione dell'immunità innata nei confronti dei lentivirus. La quantificazione del virus nei pozzetti infettati, potrà aiutarci a comprendere l'attività proinfiammatoria (restrittiva) o antiinfiammatoria (permissiva) degli eMDM polarizzati nelle due isoforme in funzione della citochina usata, nei confronti del virus dell'anemia infettiva del cavallo. Tutto questo per comprendere l'azione svolta dall'immunità innata del cavallo in seguito ad infezione con EIAV.

[Grafici più significativi]

Espressione relativa dei marker proinfiammatori (MMP13 e IL6) in macrofagi di cavallo sieronegativo dopo stimolazione con citochine e con EIAV ceppo Wyoming (W) o Miami (M) a 7 e 10 giorni.





[Bibliografia più significativa]

Dong, J. et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch. Virol.* (2012) 157:2105-2111.

Cook, S.J. et al. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. (2001) *Vet. Mic.* 79: 93–109.

Crespo H et al. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet Res.* (2013) 26;44:83.

Raabe MR et al. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. (1998). *Journal of Virological Methods* 71: 87–104.

Karagianni A.E. et al. The equine mononuclear phagocyte system: The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J.* 2020;00:1–19. DOI: 10.1111/evj.13341

Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology* 10 (24 maggio 2019): 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.

Haltmayer E, Ribitsch I, Rosser J, Gueltekin S, Peham J, et al. Co-culture of osteochondral explants and synovial membrane as in vitro model for osteoarthritis. *PLoS ONE* 14(4): e02147209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214709>

[Recapito e-mail dell'UO]

teresa.scicluna@izslt.it

[Parole chiave]

Cavallo, immunità innata, virus anemia infettiva equina, citochine, PCR, filogenesi, polarizzazione

[indicazioni per consentire la citazione del rapporto (autori, mail riferimento, anno, titolo, ecc)]

Scicluna M.T. – teresa.scicluna@izslt.it

Nardini R. – roberto.nardini@izslt.it

Cersini A. – antonella.cersini@izslt.it

Manna G. – giuseppe.manna@izslt.it

Cardeti G. – giusy.cardeti@izslt.it

Rosati S. – sergio.rosati@unito.it

Reina R. – ramses.reina@csic.es

Relazione finale progetto di ricerca corrente LT 09/17: Studio del ruolo dell'immunità innata del cavallo nel controllo dell'infezione dell'anemia infettiva equina. Anno 2018-2022