



ILRI

INTERNATIONAL
LIVESTOCK RESEARCH
INSTITUTE



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

**Pleuropolmonite Contagiosa Bovina (PPCB):
analisi della risposta immunitaria *in vivo* in corso
di infezione da *Mycoplasma mycoides* subsp.
mycoides - IZSAM RC 06/06**



Auditorium del Parco della Scienza
Teramo, 9 luglio 2012

Flavio Sacchini

f.sacchini@izs.it

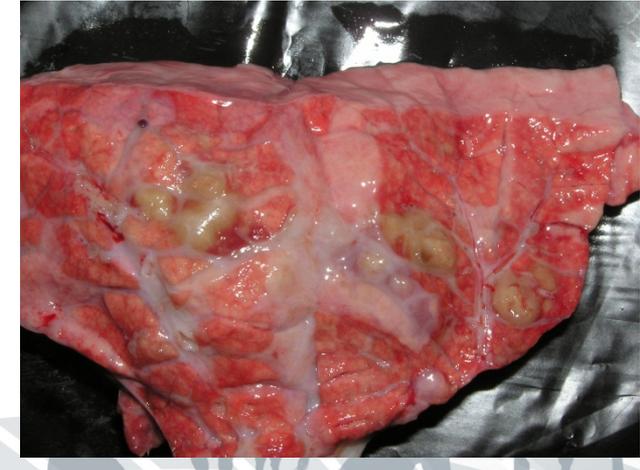
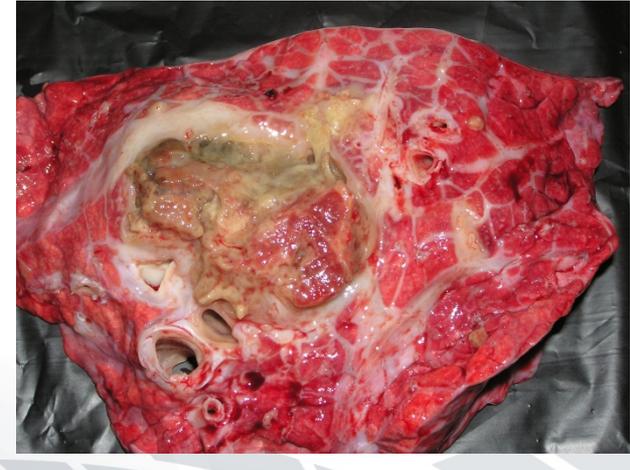
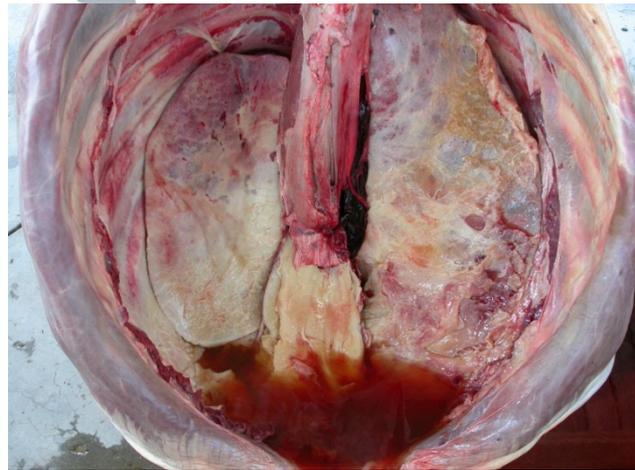


Introduzione

- Il progetto è stato ideato nell'ambito dei compiti istituzionali del Ce.S.M.E. e del Laboratorio di Referenza OIE per la PPCB:
 - Implementare le conoscenze sulla patogenesi della malattia per lo sviluppo di strumenti diagnostici e vaccinali per un controllo più efficace della patologia nei territori infetti.
- Lo studio è stato condotto in collaborazione con il gruppo di ricerca PPCB dell'International Livestock Research Institute (ILRI) di Nairobi (Kenya)



Cosa sappiamo della PPCB



Obiettivi

- Investigare *in vivo* il ruolo svolto dai linfociti T CD4⁺ nella patogenesi della PPCB e la loro importanza nel condizionare l'evoluzione della malattia. (Linfociti T CD4⁺ IFN- γ ⁺)
- Correlare le concentrazioni plasmatiche di citochine pro- e anti-infiammatorie nella fase primaria di infezione con l'evoluzione della malattia



Materiali e metodi

- Esperimento condotto presso i laboratori dell'ILRI (BSL2).
- 20 bovini maschi di razza Boran (*Bos indicus*) di età compresa tra 14 e 16 mesi
- Infezione endotracheale con *Mmm Afadé* (5×10^9 ufc/ml) previa sedazione



M&M - Disegno sperimentale

- Due gruppi di animali selezionati random (10 animali per gruppo)
- Un gruppo è stato depleto per i linfociti T CD4⁺

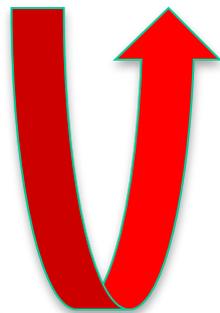
Afadé

5 x 10⁹ ufc

Deplezione

CD4⁺ (6 d.p.i)

Esami
Post
Mortem



Time post infection in days

0

5

10

15

20

25

28



M&M: Deplezione dei linfociti T CD4⁺

- 5 dosi crescenti di liquido ascitico contenete un MAb(IgG2a – clone IL-A11) anti CD4⁺ bovino (50µl, 200 µl, 2000 µl, 7750 µl)
- somministrazione per via endovenosa
- liquido ascitico (conc. MAb 11,8 mg/ml)
- Legame del complemento (via classica di attivazione) e lisi delle cellule T CD4⁺ a livello sistemico e linfonodale

Naessens *et al.* Total depletion of T cell subpopulations and loss of memory in cattle using mouse monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64 (1998), pp. 219–234.





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

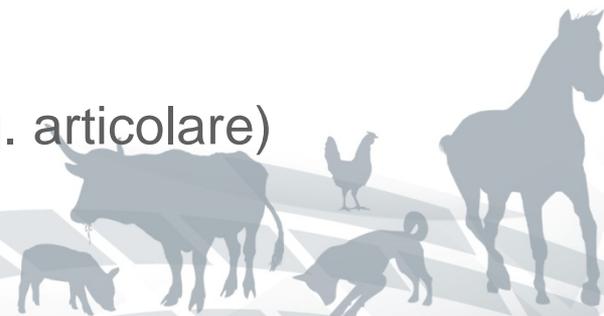
M&M: Campionamento e analisi di laboratorio

ILRI
INTERNATIONAL
LIVESTOCK RESEARCH
INSTITUTE
INTERNATIONAL
LIVESTOCK RESEARCH
INSTITUTE

- Esame clinico quotidiano (T° C)
- Prelievo di sangue e siero due volte a settimana

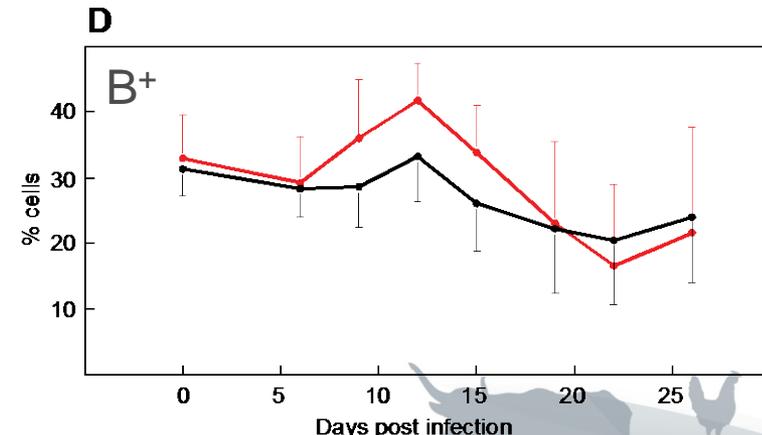
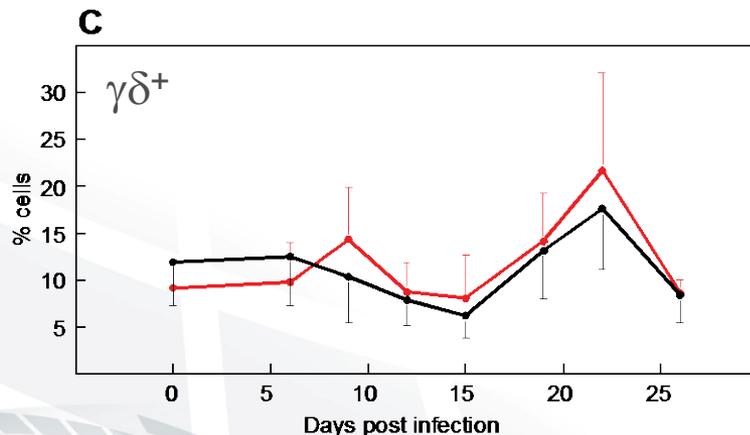
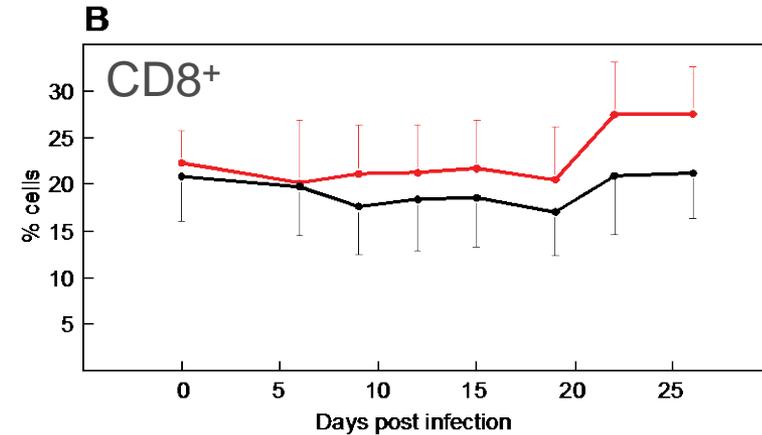
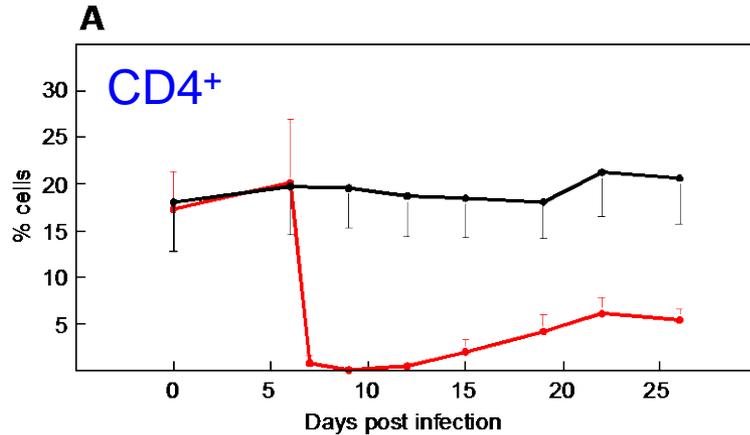
Analisi di laboratorio:

- Analisi citofluorimetriche da sangue periferico (Linfociti T CD4⁺; CD8⁺; $\gamma\delta^{+}$; B⁺)
- Determinazione della concentrazione plasmatica di citochine pro-infiammatorie (**TNF- α** , **IFN- γ** e **IL-4**) e anti-infiammatorie (**IL-10**) mediante ELISA
- Esami sierologici (FdC - cELISA)
- Esami microbiologici (polmoni, liq. pleurico, liq. articolare)
- Esami anatomo-patologici e istologici



Risultati

➤ Analisi citofluorimetriche delle popolazioni linfocitarie:



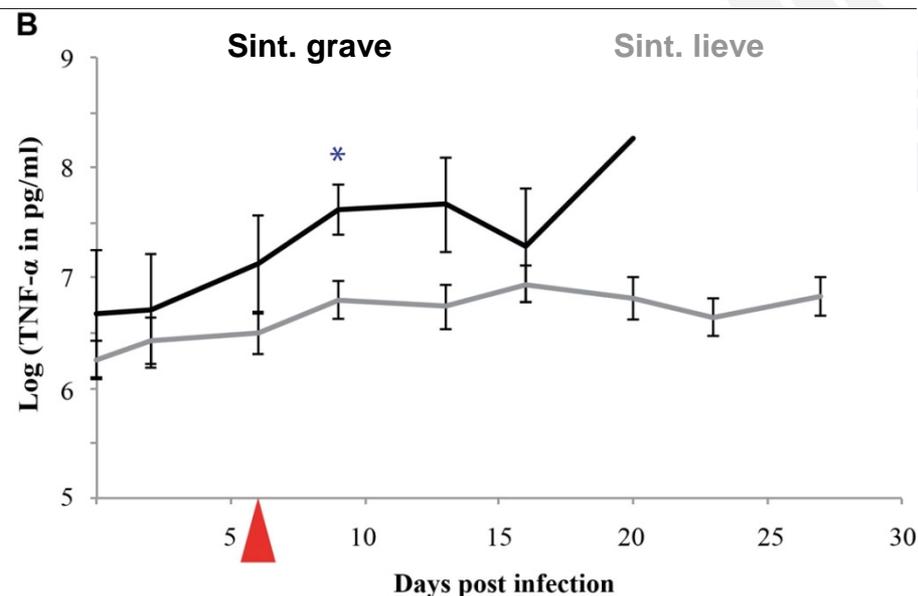
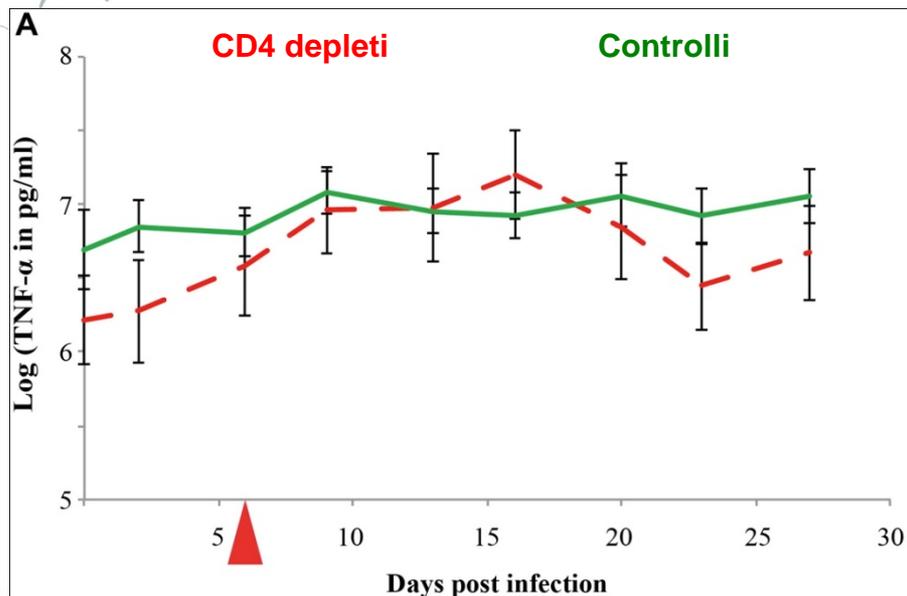
Sacchini et al. A minor role of CD4⁺ T lymphocytes in the control of a primary infection of cattle with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Vet Res. 2011 Jun 12;42(1):77.

Risultati

- No differenze significative tra gruppo CD4 depleto e gruppo di controllo dal punto di vista clinico (febbre, tosse), sierologico e delle lesioni.
- 4 animali hanno manifestato sintomatologia grave e sono stati soppressi prima del termine dello studio. Di questi, 3 appartenevano al gruppo CD4 depleto.
- La differenza di “mortalità” osservata (3/10 vs 1/10) sebbene bassa ha mostrato una certa rilevanza statistica e può essere imputata alla perdita di una risposta protettiva



Risultati: TNF- α

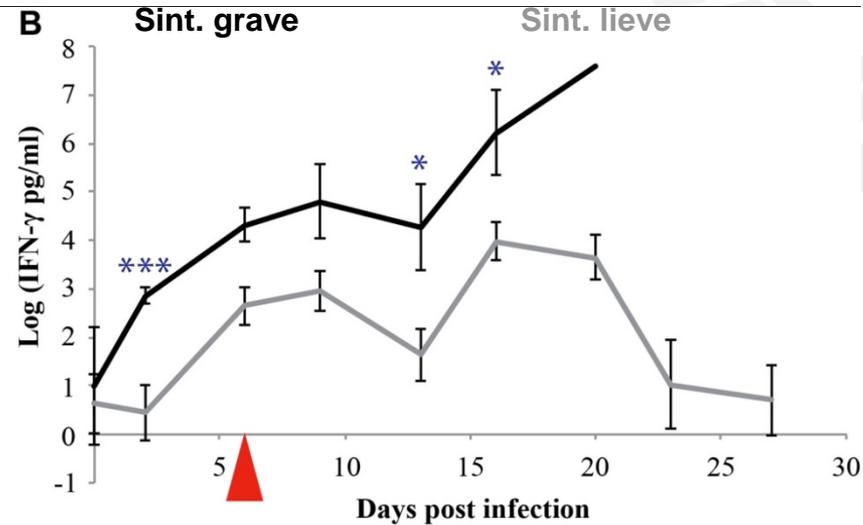
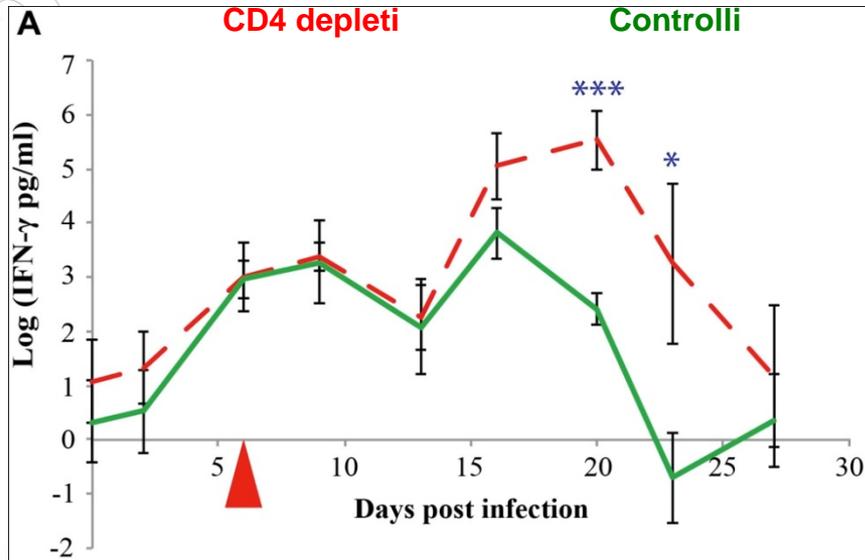


- No differenze significative tra depleti e controlli
- Animali con sintomatologia grave mostrano livelli plasmatici di TNF- α più elevati

Sacchini *et al.* Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia. *BMC Vet Res.* 2012 Apr 25;8:44.



Risultati: IFN- γ

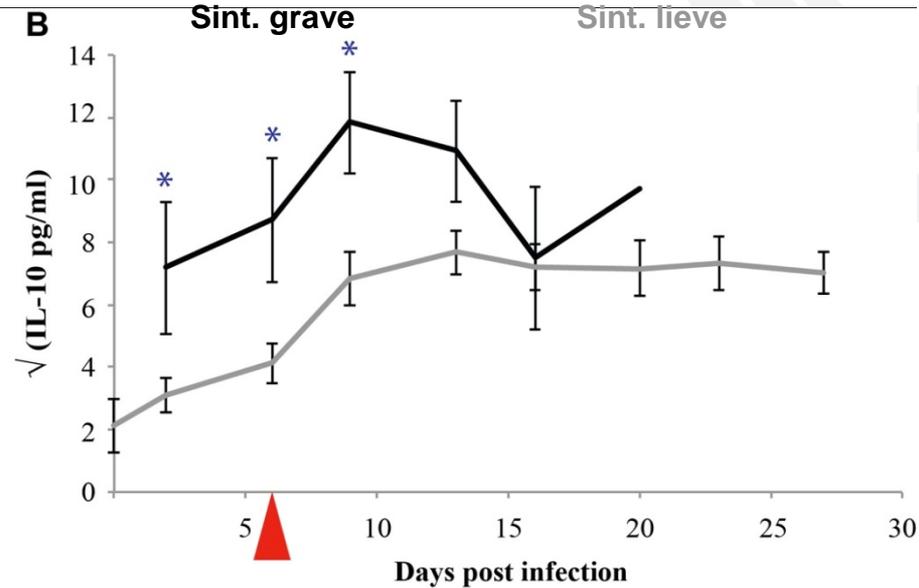
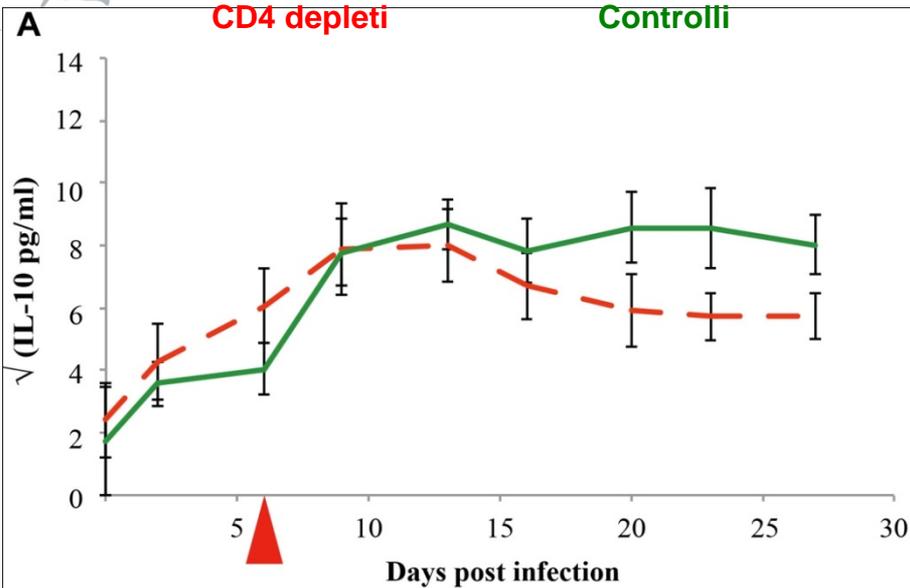


➤ **IL-4**: solo un animale non-depleto con malattia grave ha mostrato elevati livelli plasmatici di IL-4

Sacchini *et al.* Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia. *BMC Vet Res.* 2012 Apr 25;8:44.



Risultati: IL-10



➤ L'IL-10 è una citochina definita anti-infiammatoria in quanto contrasta l'azione delle citochine pro-infiammatorie, controlla e regola l'intensità della risposta immunitaria

Sacchini *et al.* Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia. *BMC Vet Res.* 2012 Apr 25;8:44.



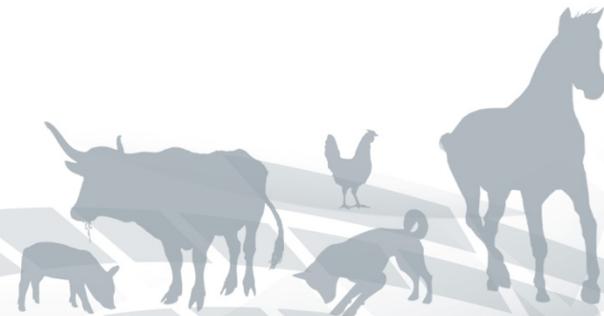
Conclusioni - 1

- Le minime differenze osservate nel decorso della malattia tra animali CD4 depleti e animali immunocompetenti indicano che in corso di una infezione primaria, i linfociti T CD4⁺ svolgono un ruolo minoritario nell'ambito di una risposta immunitaria protettiva.
- L'incremento delle concentrazioni plasmatiche di TNF- α osservato nella maggior parte degli animali a seguito dell'infezione ed in modo particolare negli animali con malattia grave confermano che il TNF- α è uno dei mediatori del processo infiammatorio di pleuropolmonite sierofibrinosa che caratterizza la PPCB.



Conclusioni - 2

- L'aumento di IFN- γ osservato nel gruppo CD4-depleto dopo l'eliminazione dei CD4 suggerisce che i linfociti T CD4⁺ non rappresentano la principale fonte di IFN- γ e che altri elementi cellulari contribuiscono alla sua produzione (NK, TCD8⁺, T $\gamma\delta$ ⁺).
- Inoltre, in contrasto con precedenti studi secondo cui la presenza di IFN- γ si correla a un decorso lieve della malattia, i nostri risultati indicano che elevate concentrazioni di IFN- γ (IL-4) si correlano con malattie grave.



Conclusioni - 3

- Infine, il contemporaneo incremento dei livelli plasmatici di IL-10 e delle citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IFN- γ e IL-4) sottolineano l'incapacità del sistema immunitario di modulare e controllare il processo infiammatorio, evidenziando un rilascio di citochine pro-infiammatorie sbilanciato e incontrollato con conseguente danno tissutale.





RESEARCH

Open Access

A minor role of CD4⁺ T lymphocytes in the control of a primary infection of cattle with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

Flavio Sacchini^{1†}, Jan Naessens^{2†}, Elias Awino¹, Martin Heller³, Andreas Hlinak⁴, Wolfram Haider⁵, Anja Sterner-Kock⁶ and Joerg Jores^{2*}

Sacchini et al. *BMC Veterinary Research* 2012, **8**:44
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/44>



BMC
Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia

Flavio Sacchini¹, Mirella Luciani¹, Romolo Salini¹, Massimo Scacchia¹, Attilio Pini¹, Rossella Lelli¹, Jan Naessens², Jane Poole² and Joerg Jores^{2*}





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

ILRI

INTERNATIONAL
LIVESTOCK RESEARCH
INSTITUTE



Grazie per l'attenzione !!

