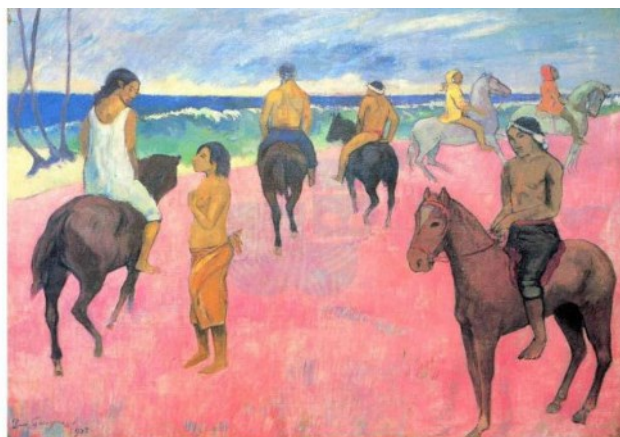




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*  
05 e 07 aprile 2022



# Esperienze di isolamento, stimolazione e infezione con virus dell'anemia infettiva equina, di macrofagi equini

Giusy Cardeti

*IZS Lazio e Toscana, UOC DO Virologia*



## Argomenti:

### -Background

### -Esperienze:

1. isolamento di monociti/macrofagi da milza e sangue periferico di cavalli positivi per AIE;
2. isolamento/stimolazione/infezione di monociti/macrofagi da sangue periferico di cavalli sieronegativi per AIE

Di ogni esperienza, andremo a descrivere:

- a) protocollo messo a punto
- b) campioni esaminati e risultati ottenuti

### -Conclusioni

**PROGETTI DI RICERCA CORRENTE 2017**

N. identificativo progetto: IZS LT 09/17 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
Lazio e Toscana

Area tematica: Sanità Animale, [Sanità Pubblica (One Health)]

Titolo del progetto:

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

Responsabile Scientifico: Maria Teresa Scicluna

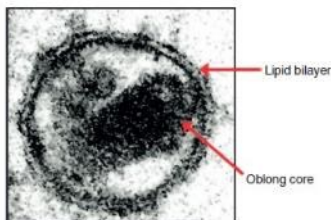


Figure 2 Transmission electron micrograph of an EIAV particle.

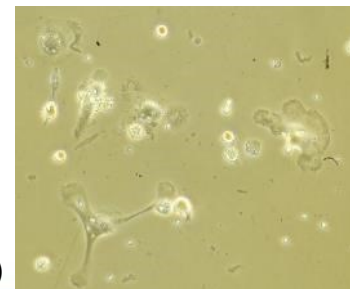
Craig and Montelaro, Encyclopedia of  
Virology, 2008

Il virus dell'anemia infettiva equina (AIE) replica in poche colture cellulari nella maggior parte delle quali (E.derm, EEKi, BS.C1, Cf2th, FEF) non produce effetto citopatico (ECP).

Eccezione: colture di macrofagi (EML-3C, MDM) in cui il virus replica e può dare ECP [Raabe et al, 1998].



Cellule di derma equino (EDe 20x)



Macrofagi equini (M1 e M2\_40x)

# ESPERIENZA 1 - Cavalli positivi per AIE

## PROTOCOLLO ISOLAMENTO MACROFAGI DA MILZA

- Prelievo bioptico di milza (~500  $\mu$ L) mediante siringa 20 mL\_ago 18 o 19 (oppure con punch)
  - Con la stessa siringa aspirare 2-3 mL T-I e trasferire il tutto con una certa pressione in provetta contenente altri 4 mL di T-I
  - incubare x 3-4 h a 37°C
  - lasciando i frammenti sul fondo della provetta, sostituire il terreno con T-II
  - trasferire in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> o piastre multiwell e incubare x 3 gg a 37°C
  - sostituire 5 mL di terreno con T-II fresco
  - incubare x 7 gg a 37°C sostituendo 7 ml di T-II (R1)
  - ogni 7 gg sostituire 9 mL di T-II.
- Ad ogni raccolta, in totale almeno 4 (R2-3-4), centrifugare il surnatante a 800 g x 20', aliquotare 0,5 mL per il test RT-activity conservando a -80°C

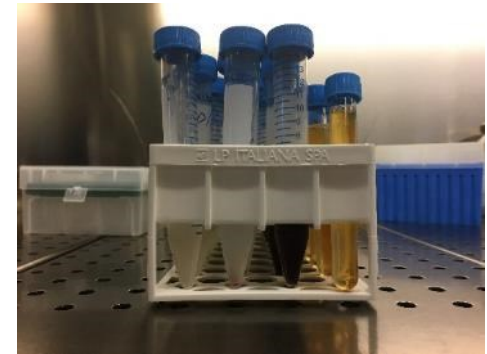
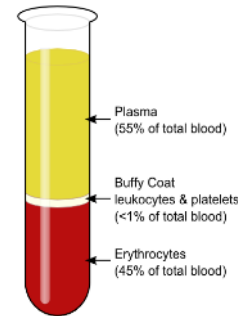


### Terreno

T-I -> DMEM + 1% glutamina + 1% PSF, 0,1% Gentamicina, 1% aaNE, 1% Vitamine + NaPiruvato 10mM  
T-II -> T-I + 10% SE inattivato a 56°C x 30'

## PROTOCOLLO ISOLAMENTO MONOCITI/MACROFAGI DA SANGUE PERIFERICO

- Prelevare sangue in EDTA dalla vena giugulare di cavalli sieropositivi per AIE
- raccogliere i PBMC con la metodica descritta precedentemente da R. Nardini e risospendere il pellet in T-I [Crespo et al, 2013]
- distribuire 0,8 mL/pz di sospensione di PBMC in space 12 pz e incubare overnight
- dopo 18-20 h di incubazione a 37 °C al 5% di CO<sub>2</sub>, lavare due volte con PBS (Ca<sup>-</sup> e Mg<sup>-</sup>) e aggiungere T-II
- sostituire il terreno una prima volta dopo 3 gg, quindi ogni 7 gg (totale 4 settimane)
- conservare il surnatante per i successivi esami virologici.



### Terreno

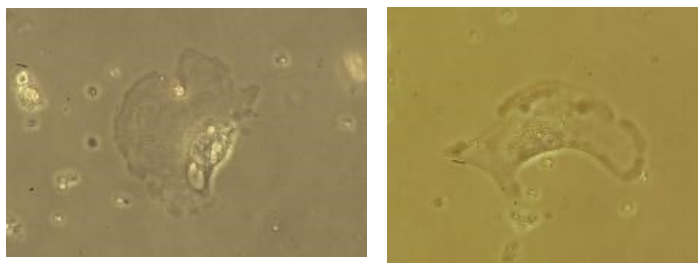
T-I: RPMI 1640 + 1% Glutamina,  
1% PSF, 0,1% Gentamicina, 2-  
Mercaptoetanolo 50μM,  
NaPiruvato 10mM  
T-II -> T-I + 10% SE inattivato

e incubare overnight

## CAMPIONI DI MILZA ESAMINATI E RISULTATI

### CAMPIONI

- eseguito prelievo con punch da biopsia su 37 milze prelevate a cavalli positivi al mattatoio
- lavorazione dei campioni come da protocollo precedentemente descritto



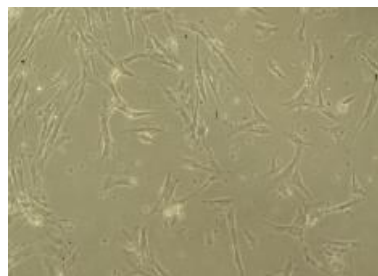
Macrofago\_14gg\_20x

### Indagini Molecolari

Si rimanda al prossimo intervento di Antonella Cersini "Diagnosi molecolare e sequenziamento di ceppi EIAV"

### RISULTATI

- dopo 3-4 h dall'inoculo (PI) in fiasca: osservate cellule arrotondate simil-macrofagi adese al substrato
- a 3gg PI: macrofagi (M) adesi, linfociti in sospensione e allontanati con il cambio terreno
- a 7gg PI: macrofagi di tipo M1 presenti in tutti i campioni; molti M in 5 campioni
- a 14gg PI: comparsa di fibroblasti in 3 campioni
- camp.n.27: surnatante R1 positivo ai metodi molecolari, ma basso numero di macrofagi



Fibroblasti\_20x

## CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO - ESAMINATI e Risultati

### CAMPIONI

E' stato prelevato sangue periferico in EDTA a:

- n.11 cavalli positivi, al mattatoio
- n.1 soggetto sieropositivo in isolamento
- n.1 soggetto infetto sieroproduttore

Per la messa a punto del protocollo, i PBMC ottenuti sono stati processati con differenti metodiche -> in totale sono stati lavorati 50 campioni



Nerone, cavallo AIE positivo di proprietà dell'IZSLT, detenuto secondo le norme di biosicurezza previste dalla normativa nazionale



## CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO - RISULTATI

32 camp. da 8 cavalli positivi: eMDM in 3 camp. (Figura 1).

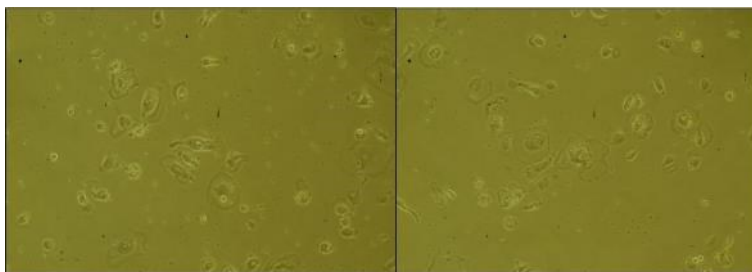


Fig.1-Macrophagi (M1?) a 30 gg  
PI (20X)

14 camp. da 7 prelievi Nerone: eMDM in 8/14 camp. (4/7 prelievi) (Figura 2).

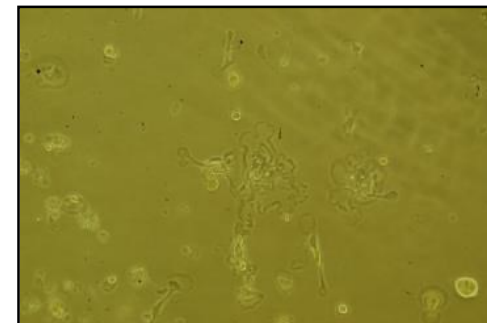


Fig.2-Macrophagi (M1?) del soggetto sieropositore a 30 gg PI  
(20X)

1 camp. Sogg. di Carsoli: pochi eMDM

3 camp. presso il Mattatoio di Cassino: eMDM in 2 camp.

(Figura 3).

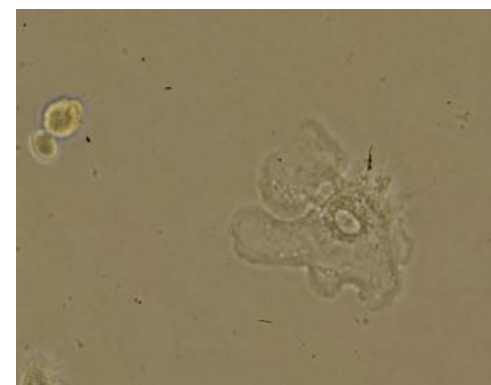


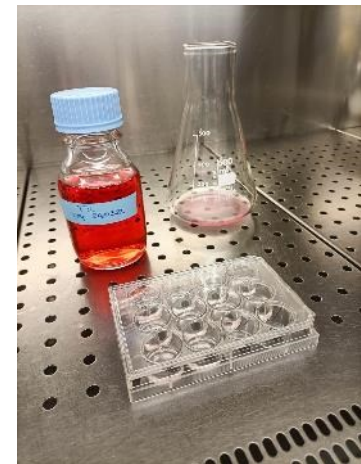
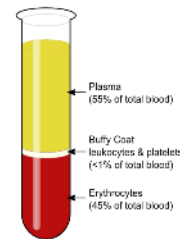
Fig.3-Macrophagi (M1?) di 1/3 soggetti da Cassino 30 gg  
PI (20X)

Indagini Molecolari  
Si rimanda al prossimo intervento di  
Antonella

## PROTOCOLLO ISOLAMENTO/STIMOLAZIONE/INFEZIONE CON EIAV DI MONOCITI/MACROFAGI DA SANGUE PERIFERICO

### ISOLAMENTO

- Prelievo sangue con EDTA cavallo sieronegativo (aliqu. x PCR EHV\_1-2-4-5) + emocromo per conta Leucociti/Monociti;
- preparazione buffy coat in PBS-EDTA x conta leucociti e monociti mediante analizzatore ematologico
- risospendere il buffy coat in X mL di T-I (Raab et al, 1998  $2-4 \times 10^6/\text{mL}$ ) per inoculare almeno 24 pz (2 Space/12pz con 0,8 mL/pz) con circa  $6 \times 10^5$  monociti/pz
- Incubazione 18-20 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>
- 2-3 lavaggi in PBS (no sali di Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) + T-II
- 3 gg di incubazione e CT con T-II (1,7 mL) addizionato di citochine



#### Terreno

T-I: RPMI 1640 + 1% Glutamina, 1% PSF, 0,1% Gentamicina, 2-Mercaptoetanol 50μM, NaPiruvato 10mM  
T-II: T-I + 10% SE inattivato

## PROTOCOLLO ISOLAMENTO/STIMOLAZIONE/INFEZIONE CON EIAV DI MONOCITI DA SANGUE PERIFERICO

### STIMOLAZIONE con Citochine equine

- a 3 gg di incubazione: sostituire 1,8 mL del terreno con T-II addizionato di citochine: Space A x IFN-g, Space B x IL4 (N.B. come da schema, inserire pz Ctrl) (SD<sub>0</sub>)
- a 3 o 4 gg (SD<sub>3-4</sub>): sostituire il 50% del terreno con nuovo T-II + citochine
- a 7 gg (SD<sub>7</sub>) di trattamento (tempo x la trasformazione dei monociti in eMDM): raccogliere con scraper i macrofagi di 1 pz trattato con ciascuna citochina x lo studio in PCR dell'espressione dei geni dei marker di polarizzazione citochina-indotti

Citochine ricombinanti equine (5μ)

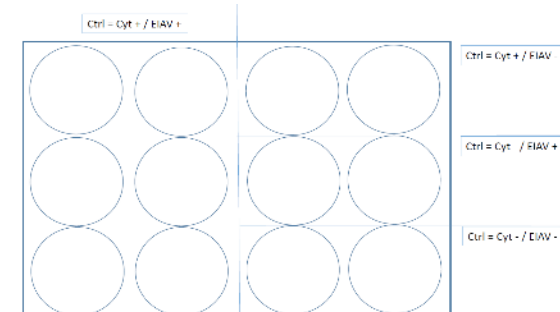
- Conservare il prodotto liofilizzato a +4°C
- risospendere in 1 mL di T-I
- aliquotare in 20 epp/50 μL e cong. a -80°C
- registrare la scadenza



### Terreno

- T-II: T-I + 10% SE inattivato + IFN-g (concentrazione finale 50 ng/mL)
- T-II: T-I + 10% SE inattivato + IL4 (concentrazione finale 50 ng/mL)

6pz -> Cyt pos \_ EIAV pos  
2pz -> Cyt pos \_ EIAV neg  
2pz -> Cyt neg \_ EIAV pos  
2pz -> Cyt neg \_ EIAV neg



## PROTOCOLLO ISOLAMENTO/STIMOLAZIONE/INFEZIONE CON EIAV DI eMDM DA SANGUE PERIFERICO

### INFEZIONE con virus AIE (EIAV)

Dopo 7 gg di stimolazione:

Inoculare ciascun pz come da schema con ceppo virale (Crespo et al, 2013: 0,1 TCID<sub>50</sub>/cell) come di seguito descritto:

- nei pz dedicati allontanare il terreno e inoculare 200 µL di Virus + 200 µL di T-II;
- incubare x 3-4 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>;
- aspirare l'inoculo e eseguire 3 lavaggi con PBS;
- aggiungere T-II (2 mL/pz)

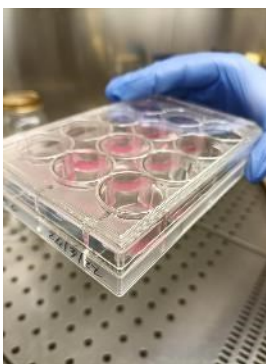
1) A 7 gg e (se eMDM ancora vitali) a 10 gg dall'infezione, raccogliere con scraper gli eMDM da 1 pz (Cyt -/EIAV+) per lo studio in PCR dell'espressione dei geni dei marker di polarizzazione virus-indotta

2) Ogni 3-4 gg (due volte/settimana) raccogliere da ogni pz delle due Space (a pool di 2 pz dello stesso tipo) 150 µL/pz e congelare a -80°C. Su tali campioni verranno eseguite le analisi molecolari per la costruzione della curva di crescita del virus.

Procedere per almeno 2-3 settimane dall'infezione, e comunque fin quando eMDM vitali

## CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO ESAMINATI E RISULTATI

- Individuato cavallo sieronegativo per AIE
- eseguiti n.3 campionamenti
- isolati monociti
- stimolati con 2 citochine (IFN-g e IL4) ricombinanti equine x 7 gg
- eMDM infettati con EIAV ceppo Wyoming (nel 3° campionamento, usato anche ceppo Miami)
- prelievo eMDM per studio geni di espressione dei marker di polarizzazione citochina e virus-indotta
- Prelievo del surnatante a pool di 2 pz per 2 volte/settimana x test RT-Activity



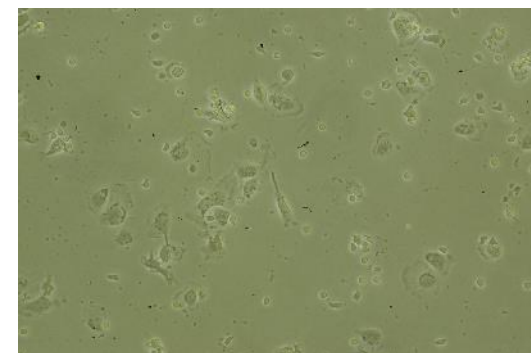
3 gg dopo adesione\_Monociti e altre cellule\_10x

## CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO ESAMINATI E RISULTATI

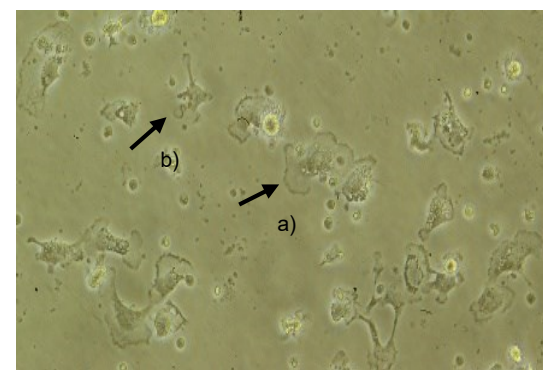
Campionamento 1 e 2:

Osservazioni al MO nei primi 10 giorni:

- dopo incubazione di 18-20 h: cellule adese riferibili a monociti (rotondeggianti con scarso citoplasma) + piastrine e linfociti in sospensione.
- 3 giorni dall'adesione: monociti adesi in evoluzione a macrofago (citoplasma > volume); monociti adesi e linfociti e piastrine in sospensione (tendono a scomparire x apoptosi nei CT successivi)
- 7 gg di stimolazione con citochine: macrofagi con citoplasma abbondante e > numero; evidenti M1 in IFN $\gamma$  e M2 in IL4

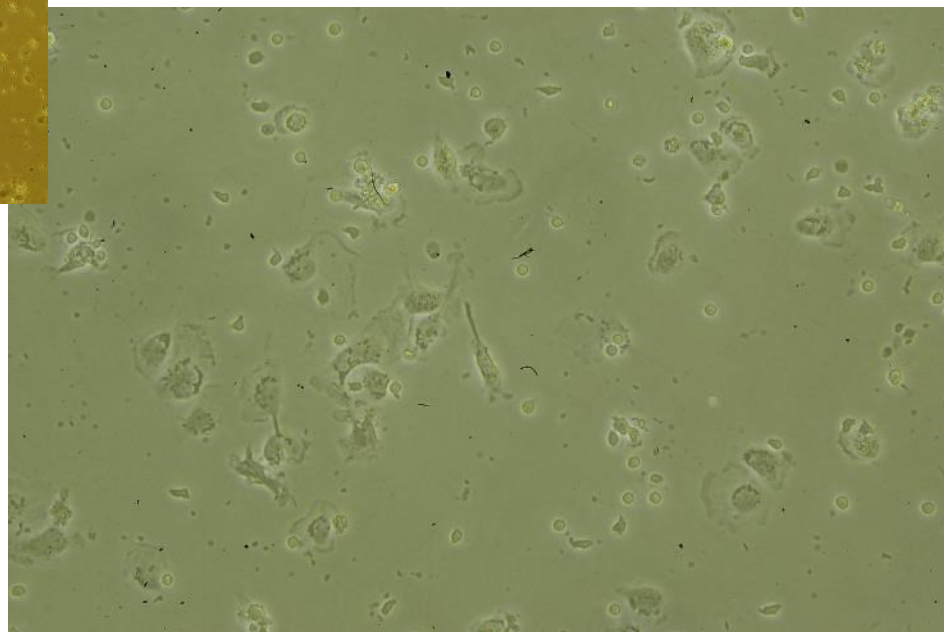


3gg dall'adesione: Macrofagi adesi e altre cellule in sospensione (40X)



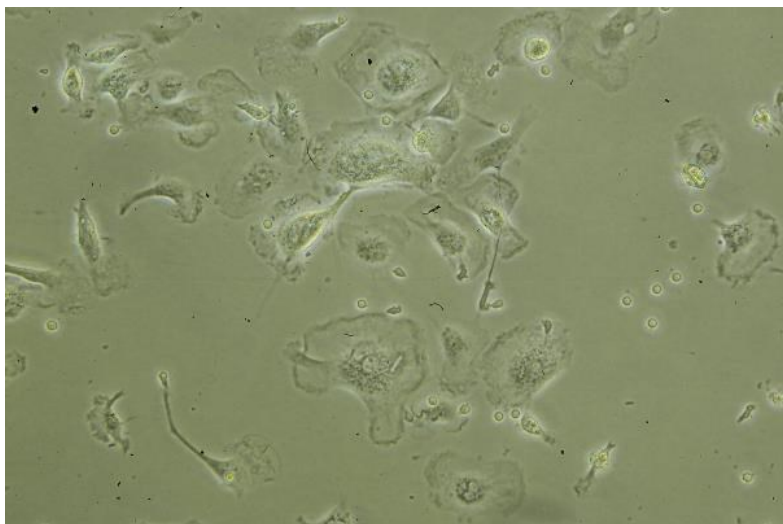
eMDM a 8 gg dalla stimolazione (40X): tipo a) M1 e b) M2

3 gg dopo adesione (SD<sub>0</sub>)\_Macrofagi e altre  
cellule\_10x e 40x

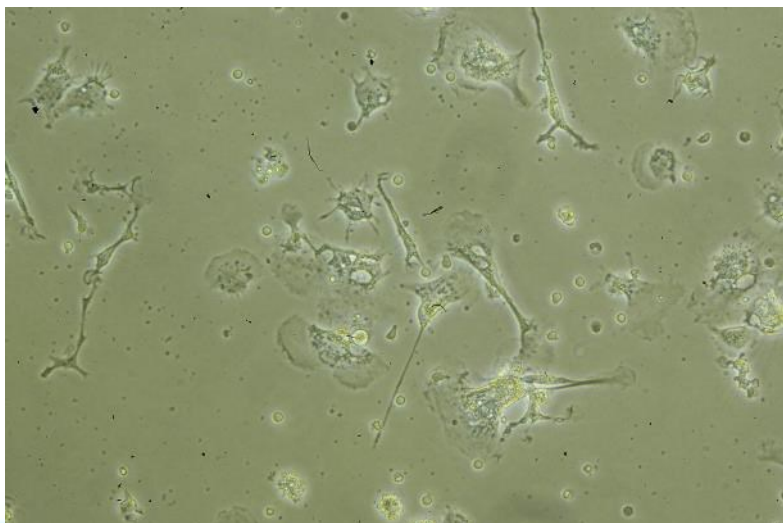


## STIMOLAZIONE CON CITOCHINA

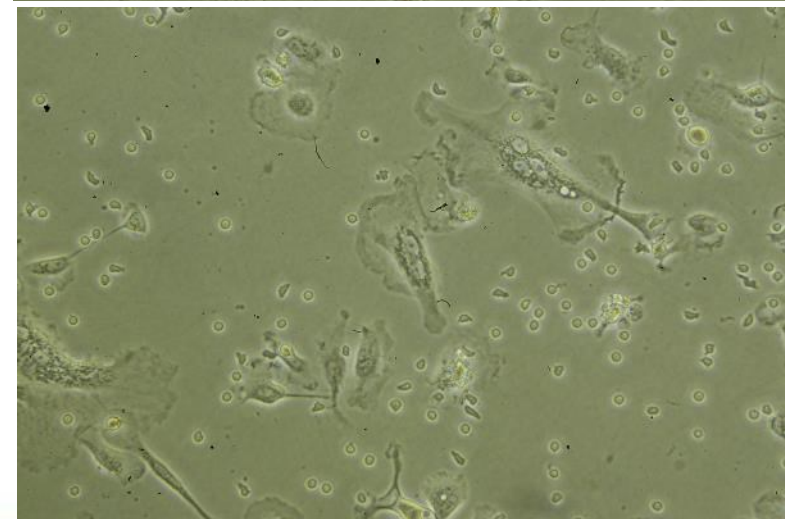
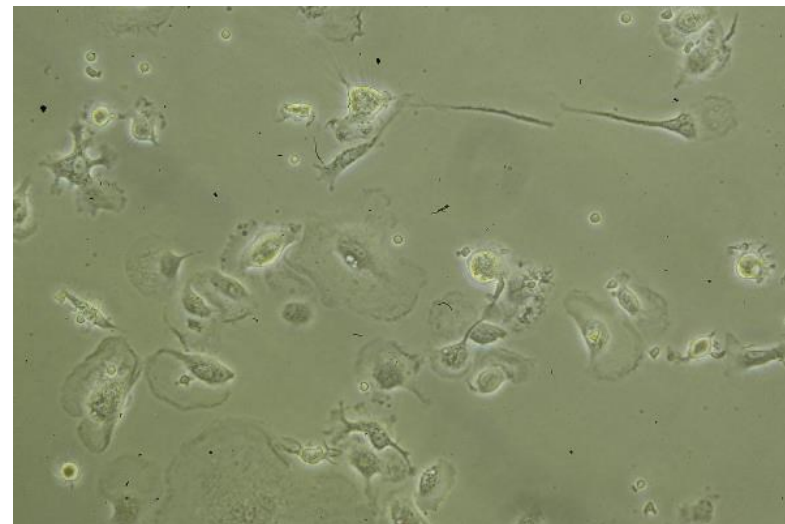
IFN $\gamma$



IL4

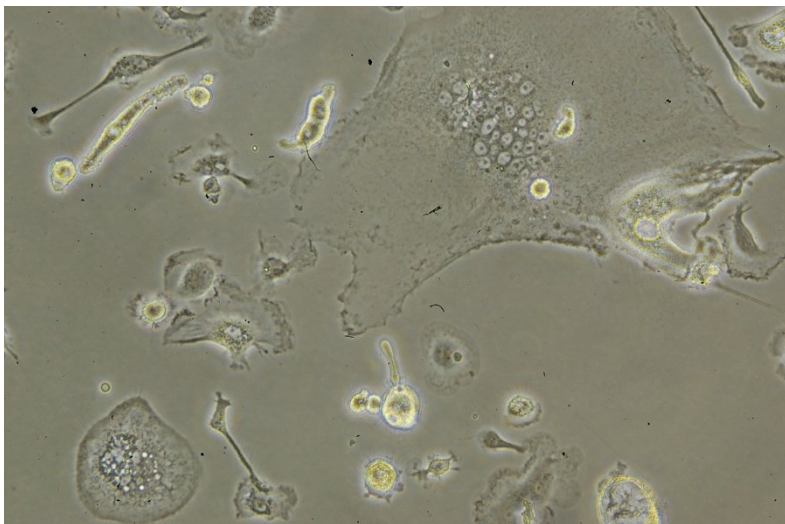


## CONTROLLO NEGATIVO

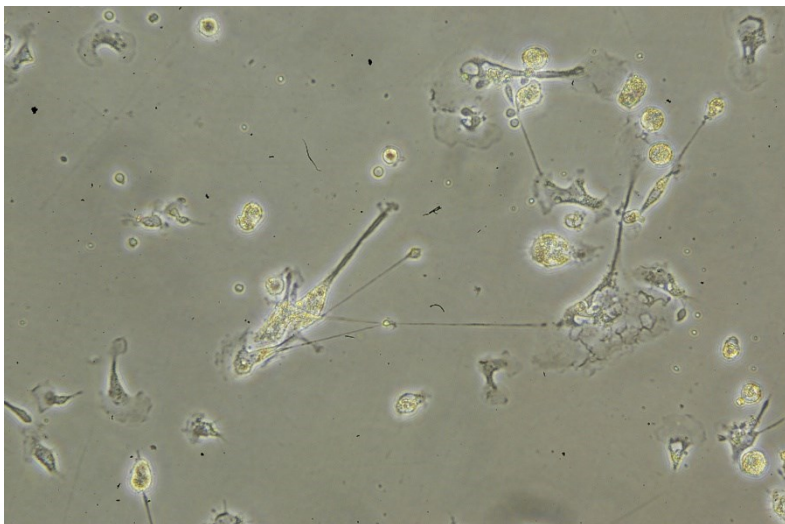


### STIMOLAZIONE CON CITOCHINA

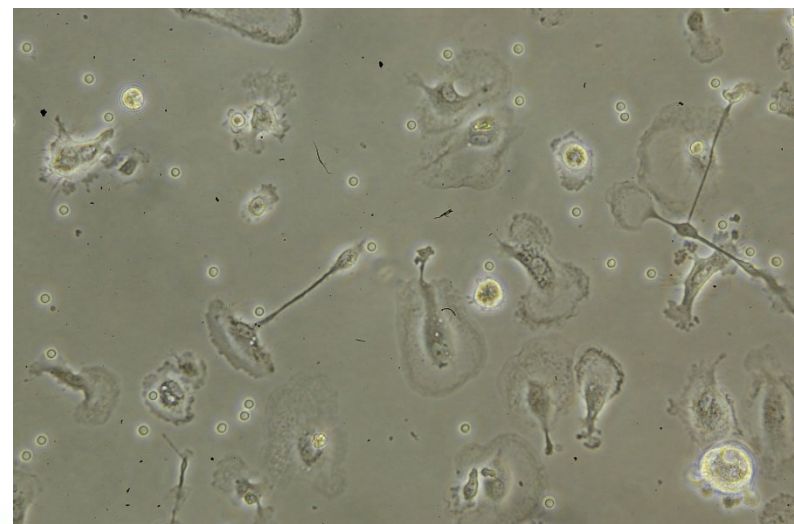
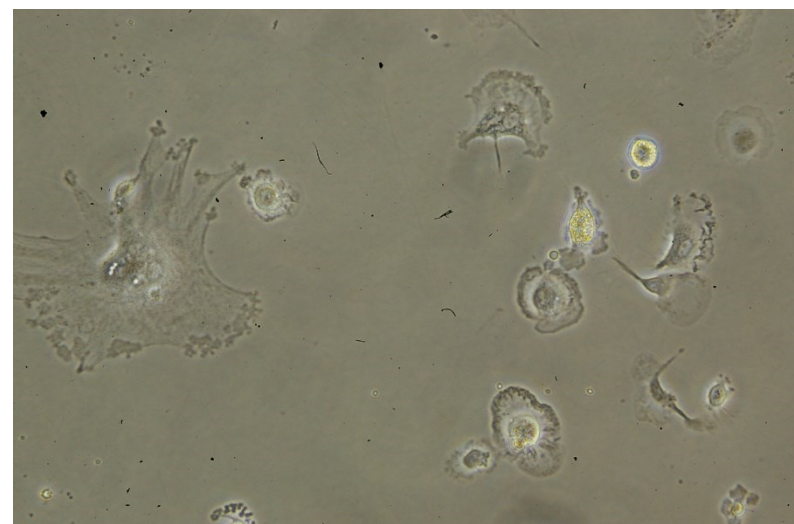
IFNg



IL4



### CONTROLLO NEGATIVO



### CAMPIONI ESAMINATI E RISULTATI

Campionamenti 1 e 2:

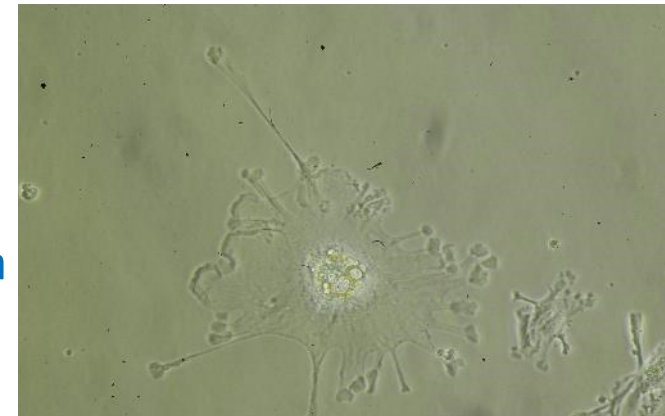
Osservazioni al MO, settimane successive alla stimolazione:

a) pz stimolati con Cyt (con e senza EIAV):

- pz stimolati con IFNg: soprattutto M1 (ulteriore aumento di volume con membrana cellulare irregolare)
- pz stimolati con IL4: soprattutto M2 (macrofagi ad aspetto dendritico)

b) pz Cyt- e infettati con EIAV: presenza di M1

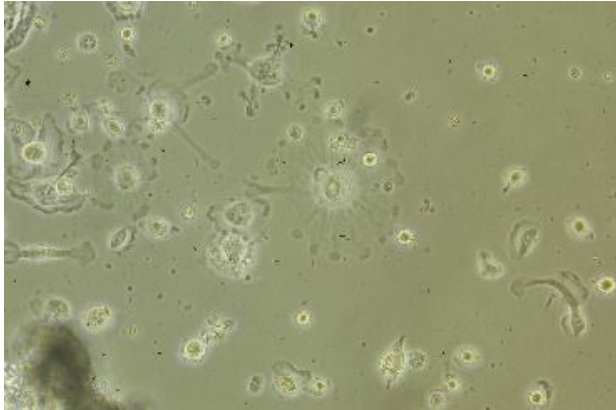
c) pz dei ctrl neg: presenza di eMDM a morfologia mista (M1 >> M2).



eMDM Cyt- 32 gg dopo adesione

## STIMOLAZIONE CON CITOCHINA

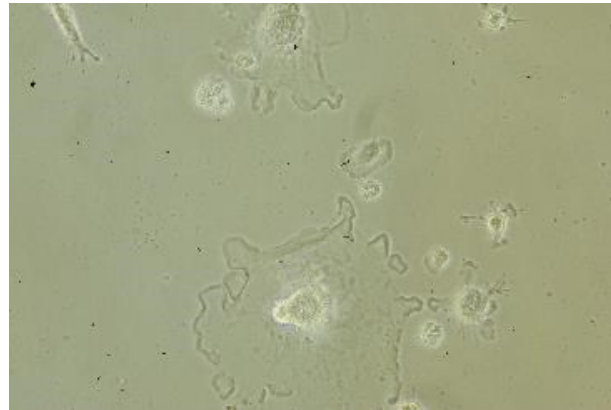
IFN $\gamma$ +\_EIAV+



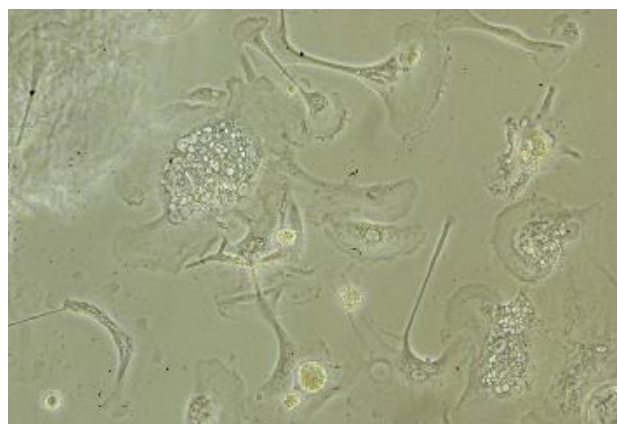
IL4+\_EIAV+



IFN $\gamma$ +\_EIAV-

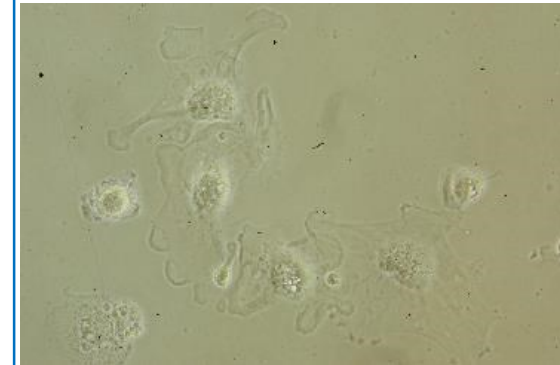


IL4+\_EIAV-

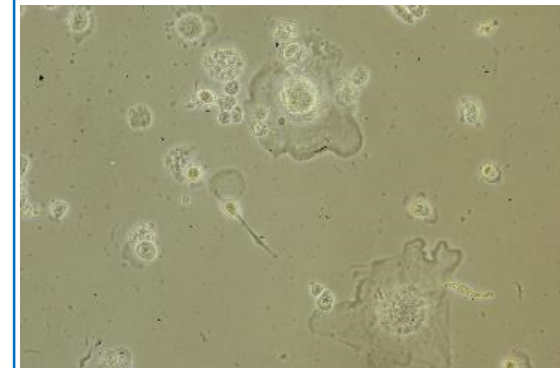


## STIMOLAZIONE CON VIRUS

EIAV+

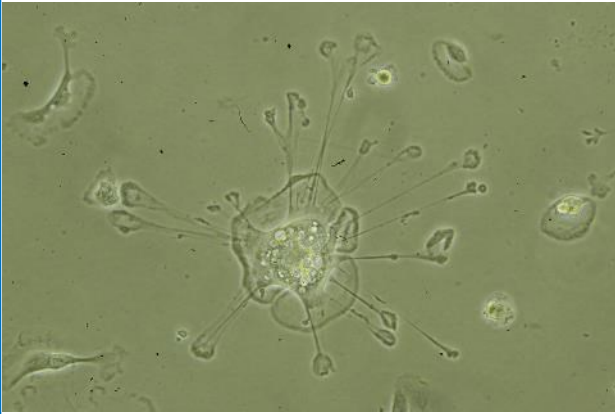


CONTROLLO NEGATIVO

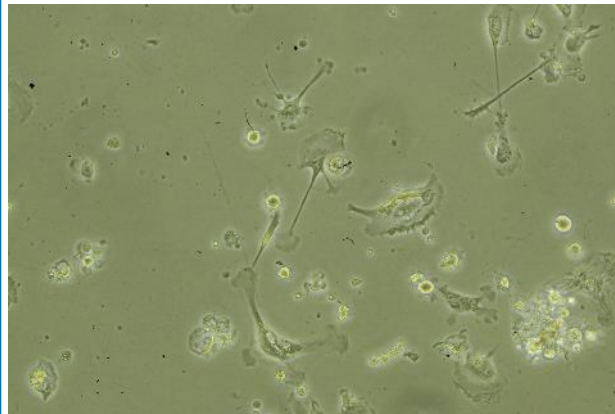


## STIMOLAZIONE CON CITOCINA

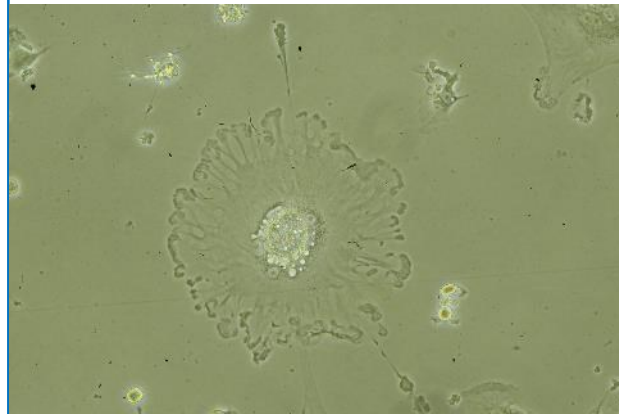
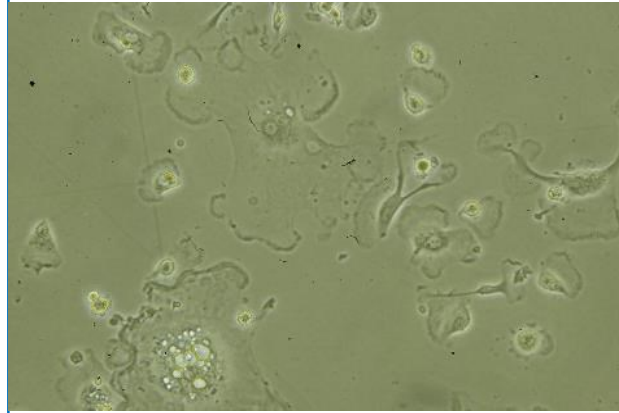
IFN $\gamma$ +\_EIAV+



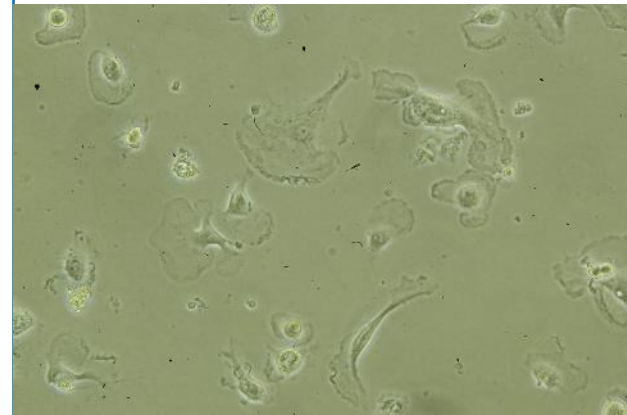
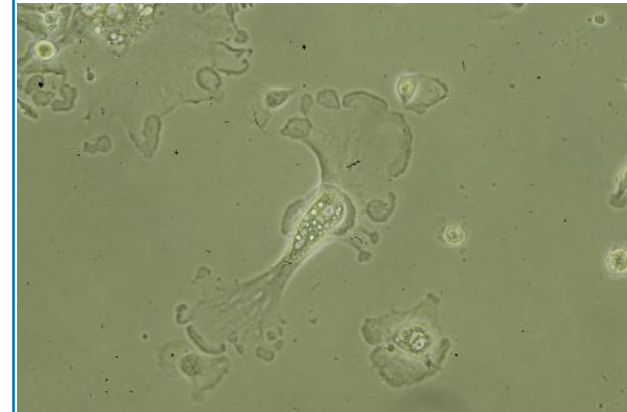
IL4+\_EIAV+



## STIMOLAZIONE CON EIAV



## CONTROLLO NEGATIVO



## STIMOLAZIONE CON CITOCHINA

IFNg+\_EIAV+



IL4+\_EIAV+



## STIMOLAZIONE CON VIRUS

IFNg-\_EIAV+



IL4-\_EIAV+



## CONTROLLO NEGATIVO



## STIMOLAZIONE CON CITOCHINA

IFNg+\_EIAV+



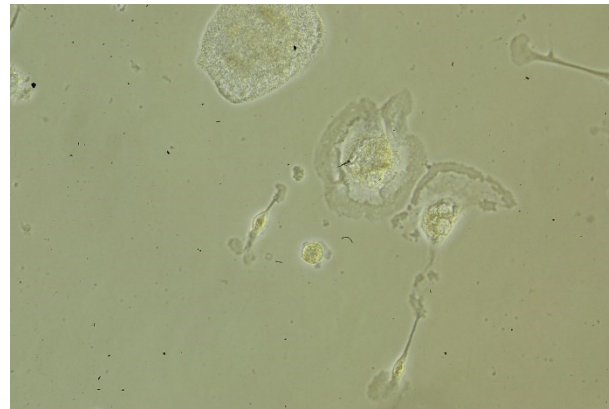
IFNg+\_EIAV-



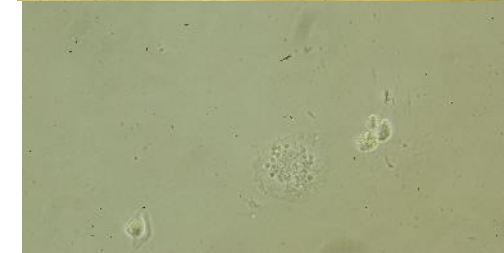
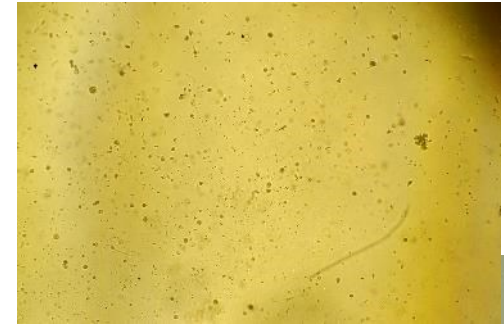
IL4+\_EIAV+



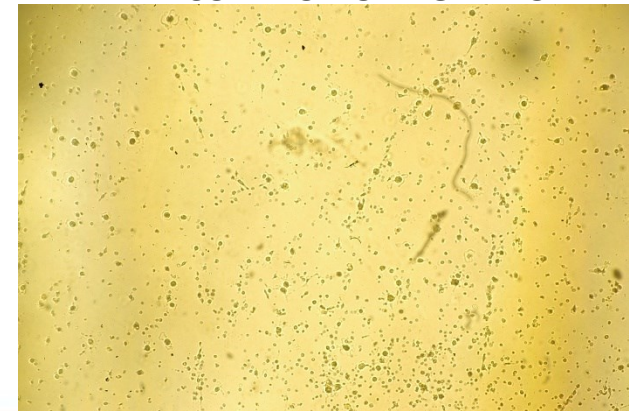
IL4+\_EIAV-



## STIMOLAZIONE CON EIAV



## CONTROLLO NEGATIVO



### CAMPIONI ESAMINATI E RISULTATI

#### Conclusioni Campionamenti 1 e 2 (marzo e settembre 2021):

- eMDM isolati: distinguibili in M1 (stimolaz. con IFN $\gamma$ ) e in M2 (stimolaz. con IL4)
- M1 numero in calo a 17 gg dall'adesione (ID7)
- pz di Ctrl neg di ogni piastra: presenti M1 >> M2
- valutare la differenza tra gli eMDM trattati con le 2 citochine mediante lo studio dei geni di espressione dei marker di polarizzazione citochina-indotta
- non eseguito prelievo di eMDM da 1 pz/cyt- post infezione con EIAV (ID7)

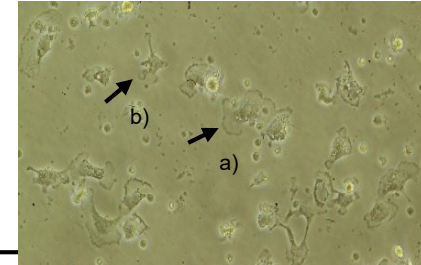
Tutti i campioni (originale e surnatanti delle R) sono risultati negativi in PCR per Herpesvirus equini

# ESPERIENZA 2 - Cavalli sieronegativi per AIE

## CAMPIONI ESAMINATI E RISULTATI

### Osservazioni al MO - Campionamento 3:

- 3 gg dall'adesione: circa 150-180 monociti/campo; morfologia mista (a uovo fritto e allungati), piccoli
- 7 gg di trattamento con Cyt: evidente differenza di morfologia degli eMDM in funzione della citochina usata.
- In seguito ad infezione con EIAV\_Wyoming e EIAV\_Miami:



eMDM a 7 gg  
dalla  
stimolazione  
(40X): tipo a)  
M1 e b) M2

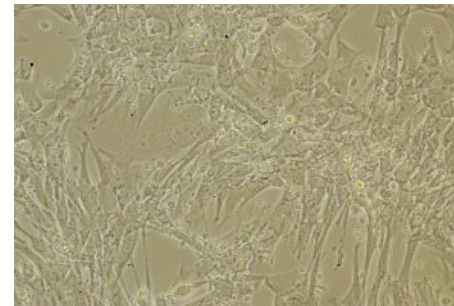
- Pz + IFNg (EIAV+ e EIAV-): M1 grandi e granulosi
- Pz + IL4 (EIAV+ e EIAV-): +++ M2 all'inizio; a ID<sub>7</sub> inizio diminuzione; misti con M1
- Pz solo infezione (Cyt- e EIAV+): +++ M1
- Pz Ctrl neg (Cyt- e EIAV-): misti, ma soprattutto M1; a ID<sub>7</sub> inizio diminuzione numero

### EIAV\_W

- Comparsi precocemente Fibroblasti (SD<sub>7</sub>=ID<sub>0</sub> piccoli focolai in pochi pz), aumentati nel tempo -> prelievo in alcuni pz non più eseguito. Cong. dopo 3 settimane dall'infezione

### EIAV\_M

- Comparsi meno Fibroblasti a pz e in < numero di pz
- eMDM in < numero ma ben visibili dall'inizio



cellule fibroblastiche

Tutti i campioni negativi in  
PCR per Herpesvirus equini

Indagini Molecolari x EIAV  
Da eseguire. Si rimanda ai  
prossimi interventi di  
Antonella e Giuseppe

## ESPERIENZA 1 - Cavalli positivi per AIE

1. isolamento di macrofagi da milza
  - a) protocollo messo a punto
  - b) n. 37 campioni esaminati e risultati
2. isolamento di monociti/macrofagi da sangue periferico
  - a) protocollo messo a punto
  - b) n. 50 campioni esaminati e risultati

## ESPERIENZA 2 - Cavalli sieronegativi per AIE

- A. isolamento di monociti/macrofagi da sangue periferico
- B. stimolazione con 2 citochine equine
- C. infezione con virus AIE (2 ceppi)
  - protocollo messo a punto
  - n. 3 campionamenti eseguiti e risultati



I monociti da sangue periferico si differenziano sempre in macrofagi, spesso dando origine a popolazioni miste di M1 e M2. L'aggiunta di citochine specifiche o di un antigene (EIAV), determina una differenziazione più specifica.

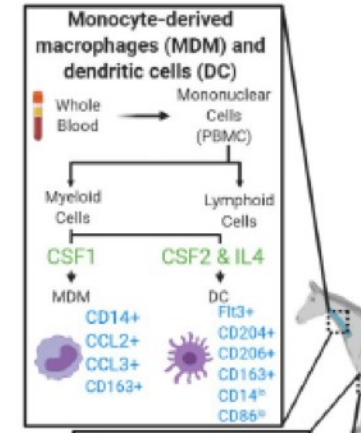
Utilizzate citochine equine ricombinanti Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) e Interleuchina 4 (IL4).

La stimolazione con **IFN- $\gamma$**  sembrerebbe polarizzare i macrofagi verso M1 (a uovo fritto, con forma più o meno irregolare);

**M1 macrophages** are classically activated, typically by IFN- $\gamma$  or lipopolysaccharide (LPS), and produce proinflammatory cytokines, phagocytize microbes, and initiate an immune response. M1 macrophages produce nitric oxide (NO) or reactive oxygen intermediates (ROI) to protect against bacteria and viruses.

La stimolazione con **IL4** sembrerebbe polarizzare i macrofagi verso M2 (emissione di lunghi pseudopodi, simile a cellule fibroblastiche)

**M2 macrophages** are alternatively activated by exposure to certain cytokines such as IL-4, IL-10, or IL-13. M2 macrophages will produce either polyamines to induce proliferation or proline to induce collagen production. These macrophages are associated with wound healing and tissue repair.



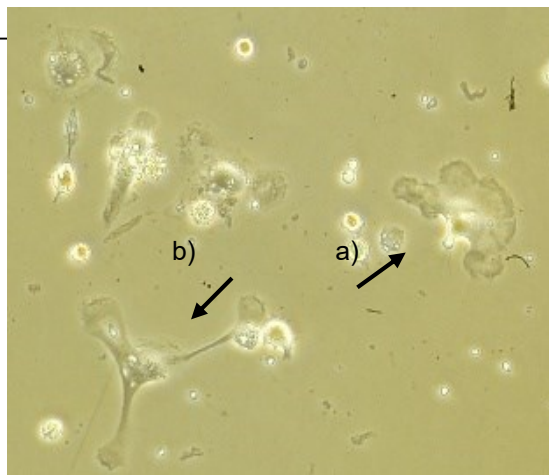
Karagianni et al, Eq Vet J 2020

Legenda: CSF1 e IFN $\gamma$  stessa azione -> stimolano verso M1 (nella foto MDM); IL4 + CSF2 stimolano verso DC; in azzurro i markers di superficie espressi

	M1 Macrophages	M2 Macrophages
Activation	Classical (Th1)	Alternative (Th2)
Stimuli	IFN- $\gamma$ , LPS	IL-4, IL-13, Immune Complexes, LPS, Glucocorticoids, Etc.
Proinflammatory Cytokines	High Levels	Low Levels
Antigen Presentation	Yes	No
Nitric Oxide Production	Yes	No
Function	Kill Microbes	Build Extracellular Matrix

La successiva infezione con EIAV dei macrofagi stimolati, avrebbe determinato le seguenti situazioni:

- nei tre campionamenti eseguiti, è stata osservata una sensibile differenza nella morfologia dei macrofagi stimolati dalle due citochine e da EIAV
- eMDM di tipo M1: diminuiti di numero in minor tempo rispetto agli M2
- eMDM di tipo M2: rimasti vitali per maggior tempo
- lo studio dei geni di espressione dei marker di polarizzazione citochina e virus-indotta e la curva di crescita del virus, dovrebbero aiutarci a capire cosa è successo nelle due tipologie di eMDM infettati.



eMDM 34 gg dopo adesione al substrato (20X): a) M1 b) M2



Grazie



A VOI PER L'ATTENZIONE  
e a tutti coloro che hanno contribuito a  
questo lavoro

*Marina, Stefania; Luigi, Barbara e Sergio; Ramses; Maria Teresa*