

STUDIO PRELIMINARE SULLA VARIABILITÀ GENETICA DEI CEPPI DI PCV2 ISOLATI TRA IL 1999 E IL 2002 E DAL 2007 AD OGGI.

PRELIMINARY STUDY ON THE GENETIC VARIABILITY OF PCV2 STRAINS ISOLATED IN THE 1999-2002 PERIOD AND SINCE 2007 UP TO NOW.

CANELLI¹ E., CATELLA¹ A., ALBORALI² L., SOZZI¹ E., LELLI¹ D., MORENO¹ A., FONTANA¹ R., CORDIOLI¹ P.

¹Laboratorio di virologia; ²Sezione Diagnostica IZSLER sede di Brescia

Parole chiave: PCV2a, PCV2b, PCR, PCVAD

Keywords: PCV2a, PCV2b, PCR, PCVAD

RIASSUNTO

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un agente virale coinvolto nella PCVAD (porcine circovirus associated diseases), un problema globale ed emergente che crea notevoli perdite economiche nel settore dei suini. Il virus dal punto di vista filogenetico è stato classificato in due cluster: PCV2a e PCV2b (Gagnon *et al.*, 2007). Gli studi sull'evoluzione genetica del PCV2 hanno assunto negli ultimi anni una maggiore importanza date le ipotesi sulla differente patogenicità dei due sottotipi. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare i ceppi isolati dal laboratorio di virologia dell'IZSLER di Brescia dal 2007 al 2009 e di confrontare i risultati ottenuti con quelli riguardanti gli isolati degli anni 1999-2002 nella stessa area. A tal fine, 36 ceppi di PCV2 isolati nei due periodi sopracitati, sono stati genotipizzati utilizzando una metodica PCR. Tutti i ceppi analizzati provenivano da aziende con anamnesi riferibile a PCVAD. I risultati ottenuti hanno permesso la suddivisione dei ceppi in 30 per il PCV2b, 2 per il PCV2a e 4 per entrambi i genotipi. È interessante notare che, a conferma di quanto descritto in altri paesi Europei, anche in Italia, l'isolamento del PCV2a appare irrilevante rispetto al 2b, che è il genotipo prevalente già nei focolai di PMWS del 1999.

ABSTRACT

Porcine circovirus 2 (PCV2) is associated with several diseases in pigs, all defined as PCVD (porcine circovirus associated diseases), that are now considered as a global problem causing significant economic losses in the swine industry. The virus has been classified by phylogenetic analysis into two genetic types of PCV2a (defined also as cluster 2) and PCV2b (cluster 1). Although the PCV2b was commonly associated with PMWS, there are only hypotheses about the differences in viral virulence between the two subtypes. In order to differentiate the two PCV2 subtypes, two polymerase chain reaction (PCR) assays were developed. In this study, 30 PCV2b strains, 2 PCV2a strains and 4 strains showing both genotypes on a total of 36 strains were detected. All the PCV2 strains were originated from farms with PMWS-anamnesis or from swine with pathological lesions. The results showed that the PCV2b is the prevalent genotype in both period in the analyzed area.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un piccolo virus, circolare, senza envelope, a DNA a singola elica, appartenente alla famiglia *Circoviridae*, coinvolto nel complesso PCVAD (Porcine CircoVirus Associated Diseases), un problema globale a livello di allevamenti intensivi suini.

La PMWS è stata identificata per la prima volta in Canada nel 1991 (Harding and Clark,

1997) ed è poi stata descritta anche in Europa a partire dal 1995 (Le Cann *et al.*, 1997). Nel 2004 è stato osservato sempre in Canada un marcato aumento di focolai di PMWS clinica e ad elevata gravità. La stessa situazione è stata riportata anche in altri paesi del Nord Ovest dell'America, facendo sospettare l'introduzione di un ceppo di PCV2 con una maggiore patogenicità. Gli studi che seguirono identificarono, oltre al PCV2a (definito anche cluster genetico 2), un nuovo genotipo definito PCV2b (cluster 1), sporadico tra i ceppi di PCV2 antecedenti il 2004 e preponderante dopo questa data (Horlen *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2007; Cheung *et al.* 2007). Per questo motivo si ipotizzò che fosse proprio il genotipo 2b quello responsabile della forma clinica e della maggior gravità dei focolai, e che quindi fosse un nuovo tipo più virulento del 2a o derivato da questo mediante shift genetico. Studi successivi dimostrarono che il PCV2b era presente anche in allevamenti senza patologie PCV2-associate. Si pensò allora ad una variabilità tra ceppi appartenenti allo stesso genotipo (Opriessing *et al.*, 2008), senza dimenticare la presenza di tutti i fattori concomitanti nel determinismo della patologia clinica.

Dal punto di vista genetico, il virus presenta 6 ORF. Le principali sono ORF1 (codificante per *Rep*,) ORF2 (che codifica per *Cap*) e ORF3 (associata a apoptosi cellulare e a patogenicità in vivo). Filogeneticamente l'omologia tra PCV2a e PCV2b sull'intero genoma è del 97.5%, mentre è del 92.2% quella nucleotidica a livello di *Cap* (Opriessing *et al.*, 2008). La tecniche di differenziazione tra i due genotipi si basano quindi principalmente sull'analisi di un frammento della ORF2. Questo gene codifica per il capsido, che è la più importante componente virale esterna che stimola la risposta immunitaria. L'ipotesi di una variabilità genetica associata a una differente virulenza, oltre al fatto che genotipi diversi possano indurre una minore o mancata cross protezione immunitaria, hanno portato ad un aumento degli studi sull'evoluzione genetica del PCV2. Sulla base dei dati sopra riportati, nel presente lavoro è stata eseguita la sottotipizzazione di ceppi di PCV2 isolati da campioni patologici conferiti presso il laboratorio di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) sia nei primi anni dopo la comparsa della PMWS (1999-2002), sia negli ultimi tre anni.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati utilizzati omogenati di tessuti (prevalentemente organi linfatici) di soggetti conferiti presso la sezione diagnostica o il reparto di virologia dell'IZSLER di Brescia nei periodi di tempo compresi tra il 1999 e il 2002 e tra il 2007 e il 2009. Il campionamento è stato eseguito con lo scopo di valutare la prevalenza dei due sottotipi a distanza di anni e in situazioni cliniche ed epidemiologiche differenti.

In totale sono stati esaminati 36 ceppi, 24 del primo periodo e 12 del secondo. Gli allevamenti di suini dai quali provenivano i materiali patologici per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola. Gli animali campionati presentavano la forma clinica o erano animali infetti, che pur in presenza di viremia non presentavano i caratteri clinici ed anatomopatologici delle PCVAD; in generale l'anamnesi di allevamento era riconducibile a PCVAD.

Isolamento e immunofluorescenza

Il materiale patologico è stato estratto in MEM-A, centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato seminato su colture cellulari NLPK PCV-free. Per ogni campione sono stati fatti tre passaggi, il terzo passaggio è stato poi analizzato in immunofluorescenza indiretta per valutare la crescita del virus (Fig. 1), utilizzando un pool di anticorpi monoclonali (mAb) specifici per PCV2 (3B11; 4H8; 2A11) (Rigola *et al.*, 2000).

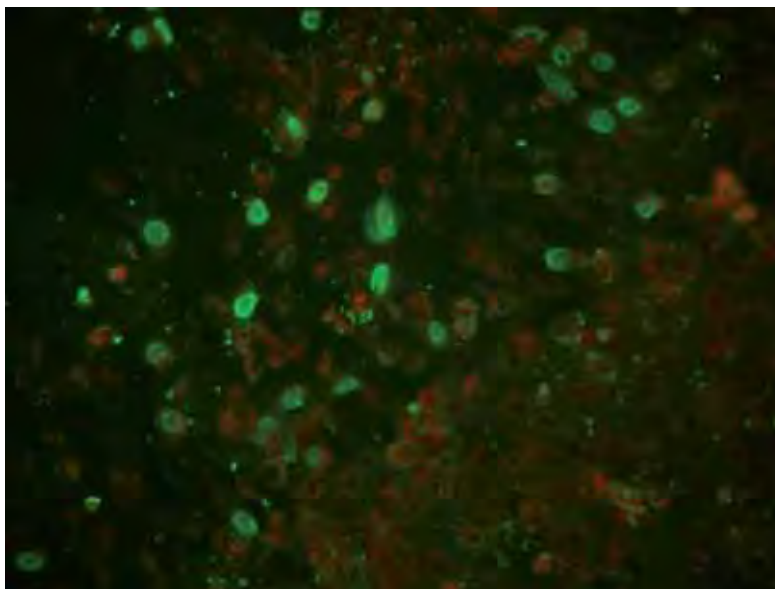


Fig.1 Tessutocoltura di NLPK infette. Immunofluorescenza positiva per PCV2
Fig.1 *NLPK cells infected with sample. PCV2-positive immunofluorescence reaction*

PCR

Per la ricerca del DNA virale sono stati impiegati primer specifici per amplificare una porzione della ORF2, in grado di differenziare i due sottotipi, secondo la metodica descritta da Horlen *et al.*, 2007, e modificata. Le sequenze dei primer sono riportate nella tabella 1, in particolare il primer forward è comune ad entrambi i sottotipi mentre sono differenti i primer reverse.

<i>Primer</i>	<i>sequenza (5'--3')</i>
ARev PCV2a	GGGGGACCAACAAAAATCTC
AFor PCV2	CAGTTCGTCACC
ARrev PCV2b	GGGGCTAAACCCCGCTC

Tab. 1 Primers impiegati
Tab. 1 *Primers*

Il DNA virale è stato estratto partendo da 200 μ l di surnatante della tessuto coltura mediante un protocollo interno che prevede l'uso di trizolo. Per entrambe le reazioni sono stati utilizzati 0,25 μ M di ciascun primer, 2 μ l di MgCl₂ 25 μ M, e 0,3 μ l di TAQ 5U/ μ l in 25 μ l finali. Il DNA è stato poi amplificato secondo il seguente profilo termico: 4 minuti a 95°C, 35 cicli di amplificazione (30 secondi a 95°C, 30 secondi a 54°C e 1 minuto a 72°C) ed un'estensione finale di 7 minuti a 72°C. Gli amplificati sono poi stati analizzati su gel di agarosio all'2% per valutare la presenza delle bande attese.

RISULTATI

Tra i ceppi analizzati la maggior parte è risultata appartenere al tipo 2b (94% sul totale) in entrambi i periodi (tab.2). I ceppi appartenenti al genotipo 2a sono stati rilevati solo tra gli isolati del primo periodo, in particolare due ceppi, provenienti dallo stesso allevamento, sono risultati positivi al solo tipo 2a (5.6%), mentre 4 isolati presentavano entrambi i genotipi (11.1%).

	<i>Conferimento</i>	<i>anno</i>	<i>provenienza</i>	<i>genotipo</i>
1.	9264	1999	MN	2b/2a
2.	9367		BS	2b/2a
3.	9964-1		PC	2a
4.	9964-2		PC	2a
5.	9261		BS	2b
6.	9945		MN	2b
7.	9957		BS	2b/2a
8.	6503		MN	2b
9.	12601	2000	LO	2b/2a
10.	12877		PC	2b
11.	4179/2		BS	2b
12.	11995		BS	2b
13.	163	2001	FO	2b
14.	860		BS	2b
15.	798		PR	2b
16.	95788	2002	MN	2b
17.	94155		BS	2b
18.	108201		BS	2b
19.	113490		CN	2b
20.	111129		BS	2b
21.	121314		BS	2b
22.	117910		FE	2b
23.	126513		BS	2b
24.	124449-4		BS	2b
25.	75582	2007	CR	2b
26.	68054		BS	2b
27.	50355/6		CR	2b
28.	83959/1		CR	2b
29.	31075/2		CR	2b
30.	86533/19		BS	2b
31.	286922		BS	2b
32.	51140	2008	BS	2b
33.	181813		BS	2b
34.	230855	2009	BS	2b
35.	68054		BS	2b
36.	215216/2		BS	2b

Tab. 2 Campioni analizzati: numero identificativo, anno di isolamento, provenienza, tipo
Tab. 2 Analyzed samples: identification number, isolation year, origin, type

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti indicano che il PCV2b è il genotipo maggiormente rappresentato e, come già descritto in Francia e Olanda, è rilevabile fin dal 1999, al contrario di quanto riportato nei paesi nord americani, dove è stato individuato solo dopo il 2004.

Da sottolineare la co-presenza dei due sottotipi a livello dello stesso animale e dello stesso allevamento, che suggerisce come il singolo individuo possa infettarsi contemporaneamente con entrambi i genotipi, nonostante il PCV2b a livello di allevamento rimanga il predominante.

L'analisi è stata effettuata solo su campioni provenienti da suini con lesioni compatibili alle patologie PCV2-associate o da allevamenti con anamnesi di PMWS. La netta prevalenza del PCV2b, rafforza quindi l'ipotesi che sia il tipo associato alla comparsa di patologia clinica e quello che prevale in un'ipotetica competizione tra i due tipi virali, forse grazie a caratteristiche biologico - molecolari che ne permettono un più efficiente adattamento al suino in particolari condizioni. Per confermare questo risultato è in corso l'analisi di nuovi campioni da animali sani e da allevamenti senza precedenti di PCVAD, per valutare se siano presenti ceppi appartenenti ai due genotipi, indipendentemente dalla situazione clinica dell'allevamento.

Il metodo PCR utilizzato si è rivelato ottimale su surnatanti di tessuto-culture, ma è stato anche sperimentato sugli estratti originali di molti dei ceppi analizzati, mostrando di essere un comodo metodo di genotipizzazione. L'analisi sta tuttora proseguendo con studi di sequenziamento col fine di definire meglio l'associazione della genetica a distinte realtà di allevamento e alla gravità delle forme patologiche.

Inoltre i monoclonali utilizzati per l'identificazione degli isolati sono stati prodotti nei confronti di un ceppo appartenente al tipo 2a (ceppo PCV-2 032), e le ricerche in corso presso il nostro laboratorio hanno dimostrato che almeno uno dei tre mAbs ha proprietà neutralizzanti nei confronti di numerosi ceppi appartenenti ad entrambi i genotipi. Il passo successivo sarà quello di analizzare gli isolati anche dal punto di vista antigenico. Queste indagini avranno lo scopo di valutare se la risposta immunitaria nei suini all'infezione con uno specifico cluster genetico conferisca protezione, e in quale misura, nei confronti di un ceppo eterologo, considerando anche i risvolti nell'ambito della vaccinazione come strumento di protezione da patologie PCV2-associate.

BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.M., McNeilly F., McMenemy M., McNair I., Krakowka S.G., Timmusk S., Walls D., Donnelly M., Minahin D., Ellis J., Wallgren P., Fossum C., (2007). Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and non-affected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest* **19**: 368-375.
2. Carman S., Cai H.Y., DeLay J., Youssef S.A., McEwen B.J., Gagnon C.A., Tremblay D., Hazlett M., Lusia P., Fairles J., Alexander H.S., van Dreumel T., (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. *Can J Vet Res* **72**: 259-268.
3. Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R., Dunham A.G., (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* **152**: 1035-1044.
4. de Boisseson C., Beven V., Bigarre L., Thiery R., Rose N., Eveno E., Madec F., Jestin A., (2004). Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol* **85**: 293-304.

5. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Larsen L.E., (2008), Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* **128**: 56-64.
6. Gagnon C.A., Tremblay D., Tijssen P., Venne M.H., Houde A., Elahi S.M., (2007), The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* **48**: 811-819.
7. Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., Lopez-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A., Segales J., (2008), A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* **128**: 23-35.
8. Harding J.C.S. and Clark E.G., (1997), Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *J. Swine Health Prod.* **5**, pp. 201–203.
9. Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., (2008), Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* **132**: 201-207.
10. Horlen K.P., Schneider P., Anderson J., Nietfeld J.C., Henry S.C., Tokach L.M., Rowland R.R., (2007), A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health and Production* **15**: 270-278.
11. Le Cann P., Albina E., Madec F., Cariolet R. & Jestin A. (1997), Piglet wasting disease. *Vet Rec* **141**, 660
12. Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann P., Jestin A., Segales J., Chmielewicz B., Plana-Duran J., Soike D., (2000), Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* **66**: 65-77.
13. Olvera A., Cortey M., Segales J., (2007), Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* **357**: 175-185.
14. Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J., Halbur P.G., (2008), Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* **89**: 2482-2491.
15. Pesch S., Ohlinger V.F., (2007), Two subtypes of PCV2 are widely spread in European pig population causing PCVAD. *Proc 5th Inter Symp Emerg and Re-emerg Pig Disease, Krakau, Polonia, 2007* p.81.
16. Rigola S., Sala G., Cordioli P., Lombardi G., (2000), Standardizzazione ed utilizzo di una metodica sierologica specifica per il circovirus suino tipo 2. *Atti del XXVI meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini, Piacenza 24-25 marzo 2000*, p.67-73
17. Wiederkehr D., Sydler T., Brugnera E., Buergi E., Sidler X., (2007), Different genotypes of porcine circovirus type 2 in immunohistologically positive Swiss pigs from 1986 to 2005. *Proc 5th Inter Symp Emerg and Re-emerg Pig Disease* p.84.
18. Wiederkehr D.D., Sydler T., Buergi E., Haessig M., Zimmermann D., Pospischil A., Brugnera E., Sidler X., (2009), A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet Microbiol* **136**: 27-35.