

VALUTAZIONE DELLA CIRCOLAZIONE DI PORCINE BOCAVIRUS-LIKE VIRUS (PBO-LIKEV) IN ALLEVAMENTI SUINI IN NORD ITALIA

EVALUATION OF THE CIRCULATION OF PORCINE BOCAVIRUS-LIKE VIRUS (PBO-LIKEV) IN PIG FARMS IN NORTHERN ITALY

CANELLI E., BRESAOLA M., LAVAZZA A., GIACOMINI E., SOZZI E., LELLI D.,
FONTANA R., MORENO A., CORDIOLI P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
IZSLER, sede di Brescia*

Parole chiave: Bocavirus, swine, real time PCR

Keywords: Bocavirus, swine, real time PCR

Riassunto

I Bocavirus sono agenti patogeni emergenti e sono stati descritti in associazione a sintomi respiratori, gastroenterici e a disturbi riproduttivi. La prima descrizione di bocavirus-like nel suino è stata fatta in Svezia in suini con PMWS [2]. Successivamente in Cina è stata riportata un'elevata prevalenza di PBo-likeV in suinetti in svezzamento con sintomi respiratori [14]. Altri studi hanno quindi descritto diverse specie di PBo-like virus in suini in Cina e in Irlanda del Nord [3-5,10,11,13,14]. Ciononostante la significatività clinica e patologica di questo virus nel suino non è stata ancora definita. Lo scopo del presente studio è quello di valutare la presenza di PBo-likeV in allevamenti suini del Nord Italia, mediante l'analisi di 444 campioni (feti, visceri, tamponi nasali e bronchiali) di suini conferiti presso l'IZSLER di Brescia nell'arco di circa quattro mesi (settembre 2011-dicembre 2011). Per la ricerca del DNA di PBo-likeV sono stati impiegati primer e sonda specifici per amplificare una porzione del ORF codificante per la NP1, tipica solo del genoma dei Bocavirus, seguendo la metodica descritta da Li et al., 2011 [7].

Dei 444 campioni analizzati 73 campioni (16,4%) sono risultati positivi alla real time PCR per la ricerca di PBo-likeV. In particolare nessuno dei campioni prelevati da feti è risultato positivo, mentre il DNA di PBo-likeV è stato rilevato in 19 dei 168 visceri (11%) e in 54 tamponi (21%). Dei 159 allevamenti analizzati 35 (22%) sono risultati positivi per la ricerca di PBo-likeV. L'indagine condotta sui campioni scelti per il presente studio ha indicato che PBo-likeV circola negli allevamenti suini del Nord Italia e che i suini in svezzamento sono quelli maggiormente sensibili all'infezione.

Abstract

Bocaviruses are emerging pathogens, and they have been described in association with respiratory and gastrointestinal symptoms, and reproductive disorders. The first description of bocavirus-like in pig has been reported in pigs with PMWS in Sweden [2]. Then a high prevalence of PBo-likeV has been described in weaning piglets with respiratory symptoms in China [14] and then a number of studies led to the description of several species of PBo-like viruses in pig in China and in Northern Ireland [3-5,10,11,13,14]. Nevertheless, the clinical and pathological role of this virus in pigs is not definitely known. The purpose of this study is to assess the presence of PBo-likeV DNA in pig farms in Northern Italy,

analyzing 444 samples from pigs conferred to the IZSLER of Brescia, during the period September 2011-December 2011. For the detection of the DNA of PBo-likeV primers and probe specific for amplifying a portion of the ORF encoding the NP1, typical only of the Bocavirus genome, were used, following the protocol described by Li et al., 2011 [7]. Of the 444 samples analyzed 73 samples (16.4%) were positive in real-time PCR for the detection of PBo-likeV. In particular none of the samples obtained from fetuses were positive, while the DNA of PBo-likeV was detected in 19 of 168 viscera (11%) and in 54 swabs (21%). Of the 159 analyzed farms, 35 (22%) were positive for the detection of PBo-likeV. The survey conducted on the samples chosen for this study indicated that PBo-likeV circulates in swine herds in Northern Italy and that weaning pigs are most susceptible to infection.

INTRODUZIONE

I Parvovirus sono patogeni molto diffusi e responsabili di varie patologie negli animali. La famiglia Parvoviridae è suddivisa in due sottofamiglie, Parvovirinae, i cui membri infettano i vertebrati, e Densovirinae, i cui membri infettano gli artropodi. Il genere Bocavirus, appartenente alla famiglia Parvovirinae, è attualmente composto da vari membri: bocavirus bovino (BPV), canino minute virus (CnMV), bocavirus del gorilla (GBoV), bocavirus dello chimpanzee (ChBoV), quattro specie di bocavirus umano (HBoV) e varie specie di bocavirus suino (PBoV/PBo-likeV). HBoV è il Bocavirus più studiato, in quanto agente eziologico di patologie respiratorie nei bambini [8]. Bocavirus è un virus piccolo, privo di envelope, a DNA a singolo filamento, con capsidi icosaedrico. Il genoma è di 5.4 kb circa e la particolarità unica di questo genere consiste nell'aver un extra ORF che codifica per una proteina non strutturale altamente fosforilata (NP1) [9]. Il nome Bocavirus deriva dagli iniziali due componenti del genere: BPV e CnMN. I Bocavirus sono agenti patogeni emergenti e sono stati descritti in associazione a sintomi respiratori, gastroenterici e a disturbi riproduttivi [9]. Le manifestazioni cliniche della malattia vengono solitamente osservate nei giovani, mentre negli adulti l'infezione è per lo più asintomatica. La prima descrizione di un parvovirus bocavirus-like nel suino è stata fatta in Svezia a partire da linfonodi di suini con PMWS (PBoV/PBo-likeV) [2]. Successivamente, un'elevata prevalenza (38,7%) di PBo-likeV è stata descritta in suinetti in svezzamento con sintomi respiratori in Cina [14]. In seguito il virus è stato rilevato in suini con e senza PMWS, con tassi di infezione del 88% e 46% rispettivamente [1], ed anche in animali sani [14]. Sono poi state descritte in Cina almeno altre 4 specie (PBoV1, PBoV2, PBoV ceppo 6V e ceppo 7V) [3-5, 12, 13] e ulteriori due, definite come PBoV3 e PBoV4, sono state isolate da suini di allevamenti in Irlanda del Nord e in associazione a polmonite e gravi manifestazioni diarroiche e a PMWS [10, 11]. Ciononostante la significatività clinica e patologica di questo virus nel suino non è stata ancora definitivamente accertata.

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la presenza e quindi la circolazione di PBo-likeV in allevamenti suini del Nord Italia, tenendo conto delle differenti situazioni cliniche/patologiche/epidemiologiche al fine di valutare l'associazione del virus con particolari classi di età, sintomatologie o matrici campionate.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati utilizzati 444 campioni di suini conferiti presso la sezione diagnostica o il reparto di virologia dell'IZSLER di Brescia nell'arco di circa quattro mesi (settembre 2011-dicembre 2011). La scelta dei campioni da esaminare è stata eseguita tenendo conto delle diverse localizzazioni dei Bocavirus, ma anche con lo scopo di valutare le classi di età

maggiormente coinvolte e la presenza del virus in situazioni cliniche ed epidemiologiche differenti. Gli allevamenti di suini (n = 159) dai quali provenivano i materiali patologici per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola (Lombardia – Veneto – Piemonte – Emilia Romagna). In totale sono stati analizzati 444 campioni, dei quali 25 feti, 168 visceri (pool di visceri contenenti almeno i polmoni) e 251 tamponi (55 bronchiali e 196 nasali). Una parte degli animali campionati (n=201) è stata conferita al laboratorio per le analisi di routine in seguito a sintomatologie o lesioni differenti: feti abortiti (25/444), sintomi respiratori (99/444), gastro-enterici (33/444) e dimagrimento (5/444), lesioni varie (cistiti, ulcere, rotture epatiche, degenerazioni miocardiche, linfadenomegalie, polisierositi ecc.) (15/444); a volte anche presenti contemporaneamente sullo stesso animale (24/444 casi). Tutti gli altri campioni (n=243), corrispondono a prelievi (tamponi nasali o bronchiali) fatti per altri scopi di ricerca in allevamenti suini su animali a differenti classi di età (solitamente dai suinetti sottoscrofa fino allo svezzamento e quando presenti anche sui suini in magronaggio-ingrasso), senza tener conto dell'eventuale presenza di sintomatologie a livello di singolo animale o di allevamento. In generale i campioni scelti sono risultati rappresentativi delle diverse classi d'età comprendendo: feti (25/444), sottoscrofa, fino a 3 settimane d'età (44/444), svezzamento, da 4 a 12 settimane d'età (218/444), magroni-ingrassi, da 13 settimane d'età (152/444), riproduttori, scrofe (5/444).

Real time PCR

Gli acidi nucleici virali sono stati estratti partendo da 100µl di surnatante dell'omogenato di tessuto (1:10 in MEM-A) o del tampone nasale (mantenuto in circa 1 ml di PBS), mediante l'utilizzo del kit *BioSprint 96 One-For-All Vet Kit*[®] (Qiagen) in un sistema di estrazione semiautomatico *KingFisher*[®] 96 (TermoLabs system). Per la ricerca del DNA di PBo-likeV sono stati impiegati primer e sonda specifici per amplificare una porzione della NP1, seguendo la metodica descritta da Li et al., 2011 [7]. Il gene NP1 è altamente conservato nei Bocavirus, e per questo motivo è stato scelto come target per la ricerca del genoma virale. Le sequenze e la posizione di primer e sonda sono riportate nella tabella. La real-time PCR è stata eseguita in una reazione di 20 microlitri contenente 2 microlitri di DNA estratto, 500 nM di ciascun primer e 250 nM di sonda. L'amplificazione, il rilevamento e l'analisi delle curve sono state effettuate sullo strumento Step One Plus (Applied Biosystems), con le seguenti condizioni: 50 ° C per 2 minuti, 95 ° C per 10 minuti e 45 cicli di amplificazione (15 s a 95 ° C e 1 minuto a 60 ° C). Sono stati considerati positivi i campioni che avevano un ct (*threshold cycle*) pari o inferiore a 37.

Tab. 1 Primer e sonda impiegati nella real time PCR per PBo-likeV. La posizione nucleotidica riportata è da considerarsi rispetto al gene NP1 del ceppo PBo-likeV JSNJ1 (GenBank acc. no. HQ872052)

Gene/Primer	Sequenza (5'-3')	Posizione
<i>NP1/ Forward</i>	TCGAGCTATAACAACCGAAGAAGAGA	37-61
NP1/ Reverse	TGTTTCGGAGATGTCCTTGCT	93-113
NP1/sonda	FAM-5'-CAGCTCTTCGAATCGCCGCTCTCC-3'-TAMRA	63-86

RISULTATI

Dei 444 campioni analizzati 73 campioni (16,4%) sono risultati positivi alla real time PCR per la ricerca di PBo-likeV. In particolare nessuno dei campioni ottenuti da feti è risultato positivo, mentre il DNA di PBo-likeV è stato rilevato in 19 dei 168 visceri (11%) e in 54 tamponi (21%) (Tab. 2). Dei 159 allevamenti analizzati 35 (22%) sono risultati positivi per la ricerca di PBo-likeV.

Tab. 2 Campioni analizzati e positività per PBo-likeV suddivisi per matrice (tamponi, visceri, feti).

Matrice	Tamponi		Visceri	Feti	Totale
	nasali	bronchiali			
Campioni analizzati	196	55	168	25	444
Positivi PBo-likeV	39 (20,0%)	15 (27,0%)	19 (11,0%)	0	73 (16,4%)

Considerando le classi d'età, nessuno dei riproduttori e dei feti è risultato positivo, mentre le percentuali di positività per sottoscrofa, svezzamento e magronaggio-ingrasso sono state del 4%, 25% e 11%, rispettivamente (Tab. 3).

Tab. 3 Campioni analizzati, positività per PBo-likeV e ct in real time PCR suddivisi per classi di età: feto, sottoscrofa (fino a 3 settimane), svezzamento (da 4 settimane a 12 settimane), magroni-ingrassi (da 13 settimane), riproduttori.

Fasce di età	Feti	Sottoscrofa	Svezzamento	Magroni- Ingrassi	Riproduttori	Totale
Campioni analizzati	25	44	218	152	5	444
Positivi PBo-likeV	0	2 (4%)	54 (25%)	17 (11%)	0	73
ct medio (range)	-	35 (34,8-35,5)	29,7 (22,4-37,1)	30 (24,3-37,0)	-	-

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'indagine condotta sui campioni scelti per il presente studio ha indicato che PBo-likeV circola negli allevamenti suini del Nord Italia, infatti una percentuale del 22% degli allevamenti analizzati è risultata positiva in real time PCR, con una maggiore prevalenza nei suini in svezzamento (25%), rispetto ai sottoscrofa (4%) e al settore magronaggio/ingrasso (11%). Questi risultati, insieme al mancato rilevamento del virus in feti abortiti e nei riproduttori, confermano quanto osservato da altri Autori, che descrivono la maggior sensibilità dei suini durante il periodo di svezzamento [10, 14].

Non è stato possibile stabilire un'associazione esatta tra sintomatologia e presenza del virus, in quanto l'anamnesi era presente in meno della metà dei casi (n=201). Ciononostante tutti i campioni per i quali non era riportata erano tamponi nasali o bronchiali. Di questi il 25% è risultato positivo, confermando un forte tropismo del virus per l'apparato respiratorio e indicando il tampone nasale o bronchiale come matrice d'elezione per il rilevamento del

virus. Lau et al., 2011 riportano un ampio tropismo cellulare del virus, suggerendo come possibile campione anche le feci [6]. Nella nostra indagine la presenza del DNA virale è stata riscontrata nel 13% dei soggetti con sintomi o lesioni gastro-enteriche, da sole o in associazione a sintomi o lesioni respiratorie, evidenziando il tropismo gastroenterico già descritto per questo virus [10]. Per nessuno dei suini analizzati era stata specificatamente riportata la diagnosi di PMWS o PCVAD e non è quindi possibile fare associazioni tra la prevalenza riscontrata e queste sindromi. Ciononostante, proprio per questo motivo è possibile ipotizzare che la prevalenza del 16% riscontrata in questo studio, più bassa di quelle riportate in altri paesi (vicine al 40%), possa essere dovuta al non aver esaminato suini per i quali la diagnosi o l'anamnesi era di PMWS o PCVAD.

La real time PCR utilizzata, costruita su un target specifico per i Bocavirus (NP1), si è dimostrata utile e sensibile per lo screening di campioni di suino per PBo-likeV.

Ad oggi la significatività clinica e patologica dei ceppi suini non è ancora stata ben chiarita. Ciononostante le iniziali associazioni di PBo-likeV a PMWS e sintomatologia respiratoria rimangono significative. In particolare il fatto di aver individuato un ulteriore virus associato a PMWS è interessante in quanto sono ancora molte le lacune e le domande aperte riguardanti l'eziologia di questa sindrome. Inoltre l'identificazione del Bocavirus in suini allo svezzamento con patologia respiratoria lo indica come possibile patogeno respiratorio emergente.

Il presente lavoro si pone come valutazione preliminare della presenza e della circolazione del virus negli allevamenti suini italiani e rappresenta la base per ulteriori studi, legati soprattutto alla patogenicità del virus come agente eziologico primario o come co-agente di infezione.

BIBLIOGRAFIA

Blomstrom A. L., Belak S., Fossum C., Fuxler L., Wallgren P., Berg M. (2010), "Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like viruses and torque teno viruses indicated the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs". *Virus Res*, 152, 59-64

Blomstrom A. L., Belak S., Fossum C., McKillen J., Allan G., Wallgren P., Berg M. (2009), "Detection of a novel porcine boca-like viruses in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome". *Virus Res*, 146:125-129

Cheng W.X., Li J.S., Huang C.P., Yao D.P., Liu W., Cui S.X., Jin Y., Duan Z.J. (2010), "Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses". *PLoS ONE*, 5(10): e13583

Cheung A.K., Wu G., Wang D., Bayles D.O., Lager K.M., Vincent A.L. (2010), "Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus". *Arch Virol*, 155:801-806

Lau S.K., Woo P.C., Tse H., Fu C.T., Au W.K., Chen X.C., Tsoi H.W., Tsang T.H., Chan J.S., et al. (2008), "Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4". *J Virol*, 89:1840-1848

Lau S.K., Woo P.C., Yip C.C., Li K. S. M., Fu C. T., Huang Y, Chan K-H., Yuen K-Y. (in press), "Co-existence of multiple strains of two novel porcine bocaviruses in the same pig, a previously undescribed phenomenon in Parvoviridae and evidence for inter- and intra- host genetic diversity and recombination". *JGv* in press, June 2011

Li B., Xiao S., Ma J., Liu Y., Mao L., Wen L., et al.: (2011), "Development of a novel TaqMan-based Real-time PCR assay for the detection of porcine boca-like viruses (PBo-likeV)". *Virol J* 8:357-361

- Lu X.Y., Malinee O.C., Mackay I.M., Sloots T.P., Fry A.M., Erdman D.D. (2006), "Real-Time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens". *J Clin Microbiol*, 44:3231-3235
- Manteufel J., Truyen U. (2008), "Animal bocaviruses: a brief review". *Intervirology*, 51:328-334
- McKillen J., McNeilly F., Duffy C., McMenamy M., McNair I., Hjertner B., Millar A., McKay K., Lagan P., Adair B., Allan G. (2011), "Isolation in cell culture and initial characterization of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland". *Vet Microbiol* 152(1–2):39–45
- McNair I., McNeilly F., Duffy C., McMenamy M., Welsh M., Allan G. (2011), "Production, characterization and application of monoclonal antibodies to two novel porcine bocaviruses from swine in Northern Ireland". *Arch Virol*
- Shan T., Lan D., Li L., Wang C., Cui L., Zhang W., Hua X., Zhu C., Zhao W., Delwart E. (2011), "Genomic characterization and high prevalence of bocaviruses in swine". *PLoS ONE*, 6(4): e17292
- Zeng S.L., Wang D., Fang L.R., Ma J., Song T., Zhang X.R., Chen H.C., Xiao S.B. (2011), "Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus (PBoV)". *J Virol*, 92:784-788
- Zhai S.L., Yue C., Wei Z.Z., Long J.X., Ran D.L., Lin T., Deng Y., Huang L., Sun L.C., et al (2010) "High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China". *Arch Virol*, 155:1313-1317.