

ASTROVIRUS: POSSIBILE IMPLICAZIONE NELL'EZIOLOGIA DI ENTERITE NEL SUINO

ASTROVIRUSES: POSSIBLE IMPLICATION IN SWINE ENTERITIS ETIOLOGY

CANELLI E., LAVAZZA A., BRESAOLA M., BARBIERI I., 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: Astrovirus, enterite, suino

Keywords: Astrovirus, enteritis, swine

Riassunto

Gli Astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope a singolo filamento di RNA. L'Astrovirus suino (porcine Astrovirus, pAstV) è stato descritto per la prima volta utilizzando la microscopia elettronica (ME) nel 1980 in feci di suinetti diarroici [1]. I dati riguardanti la distribuzione, l'epidemiologia e la significatività degli Astrovirus nel suino sono ancora limitati. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di analizzare mediante RT-PCR per la presenza di pAstV, campioni di suini con enterite o diarrea, per i quali la diagnosi in microscopia elettronica era di presenza di particelle enterovirus-like (EVL). Sono stati analizzati 18 campioni di feci e contenuti intestinali, di questi sono risultati positivi per pAstV 10 campioni, sette dei quali sono stati poi sequenziati e analizzati filogeneticamente. I risultati ottenuti indicano che pAstV è presente negli allevamenti suini in Italia e lasciano ipotizzare un possibile coinvolgimento eziopatogenetico nelle enteriti che caratterizzano i suini alle età critiche.

Abstract

The Astrovirus (AstV) are small non-enveloped viruses with single-stranded RNA. The porcine Astrovirus (pAstV) has been described for the first time by electron microscopy (EM) in 1980 in faeces of diarrheic piglets [1]. Data on the distribution, epidemiology and significance of Astrovirus in swine are still limited. The purpose of this work was therefore to analyze by RT-PCR for the presence of pAstV samples (faeces and intestinal contents) of pigs with enteritis, for which the diagnosis by negative staining electron microscopy was of presence of enterovirus-like particles. Eighteen samples were analyzed, 10 of these samples were positive for pAstV, and seven of them were then sequenced and phylogenetically analyzed. The obtained results indicate the presence of pAstV even in Italian pig farms and fortify the hypothesis of an aetiopathogenetical involvement in enteritis of pig at critical ages.

INTRODUZIONE

Gli Astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope a singolo filamento di RNA, di dimensioni variabili tra 6.4 e 7.3kb. Appartengono alla famiglia Astroviridae, che comprende due generi, Avastrovirus e Mamastrovirus, i cui membri infettano rispettivamente le specie aviari e i mammiferi. Gli Astrovirus umani sono un'importante causa, seconda solo ai Rotavirus, di gastroenterite con ospedalizzazione nei bambini. In generale i Mamastrovirus sono virus rilevati in diverse specie (uomo, pecora, suino, cane, gatto, coniglio, mammiferi marini ecc.) in associazione a enterite [9], per quanto riguarda i ceppi aviari sono stati invece collegati a

manifestazioni cliniche intestinali ma anche extraintestinali [4; 10]. Zhu et al., 2009 indicano la presenza di 7 gruppi genetici, dei quali il gruppo 1 contiene ceppi umani, suini e felini, i gruppi 2, 5, 6 e 7 solo ceppi isolati da pipistrelli e il gruppo 3 e 4 ceppi ovis, di visone e di pipistrelli [15]. Il genoma di Astrovirus presenta tre open reading frames (ORF). ORF1a codifica per la poliproteina non strutturale 1a, mentre la ORF1b codifica per la poliproteina 1ab, la quale contiene una RNA polimerasi RNA-dipendente (RDRP) che si esprime attraverso un frameshift ribosomiale a livello della giunzione ORF1a/1b. Infine ORF2 codifica per la poliproteina strutturale del capside virale [10].

Astrovirus suino (porcine Astrovirus, pAstV) è stato descritto per la prima volta in microscopia elettronica (ME) nel 1980 in feci di suinetti diarroici [1] ed è poi stato isolato su colture cellulari [3, 13]. Recentemente alcuni lavori hanno descritto sia la variabilità genetica dei ceppi di pAstV, sia alcuni eventi di ricombinazione e hanno anche dimostrato il ruolo del suino nell'ecologia e nell'evoluzione del virus [5; 9; 12; 14]. pAstV è stato spesso riportato in associazione a gastroenterite [1; 13; 3], e la malattia è stata riprodotta anche in condizioni sperimentali [3; 13]. Ciononostante Luo et al., 2011 hanno rilevato la presenza di Astrovirus anche in suini sani [9]. I dati riguardanti la distribuzione, l'epidemiologia e la significatività degli Astrovirus nel suino rimangono ad oggi limitati.

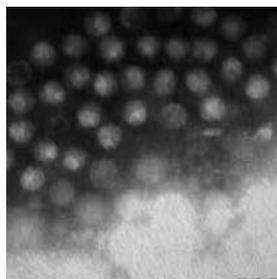
Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la presenza di pAstV in campioni (feci e contenuti intestinali) di suini con enterite o diarrea, risultati positivi in microscopia elettronica per la presenza di particelle enterovirus-like (ELV) e successivamente di caratterizzare gli eventuali stipiti rilevati dal punto di vista genetico.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio sono stati analizzati 18 campioni di contenuti intestinali o feci di suini conferiti al laboratorio di Microscopia Elettronica dell'IZSLER tra il 2008 e il 2011. Gli allevamenti di suini dai quali proveniva il materiale patologico per le analisi si trovano in un'area ad alta densità suinicola (Lombardia, Emilia Romagna, Veneto). Gli animali prelevati presentavano forme cliniche riferibili ad enterite o gastroenterite e diarrea. L'età e le altre informazioni riguardanti i campioni sono riportate nella tabella 1. I campioni sono stati scelti poiché all'osservazione in ME in colorazione negativa (nsME), previa ultracentrifugazione con Airfuge Backman [7] sono risultati positivi per particelle EVL. Queste particelle sono morfologicamente e di dimensioni paragonabili a quelle degli Astrovirus, e non è possibile differenziarle tra loro utilizzando solo la ME (Fig.1). I campioni erano già stati analizzati in routine per i principali patogeni enterici del suino, come riportato in Tab. 1.

Figura 1. Particelle virali morfologicamente riferibili a enterovirus-like. Colorazione negativa NaPt 2%. Bar = 100 nm



RT-PCR

Gli acidi nucleici virali presenti nei campioni sono stati estratti utilizzando QIAmp MinElute Virus Spin (Qiagen) e successivamente analizzati mediante RT-PCR [12] per la ricerca del RNA di pAstV. Per la reazione sono stati utilizzati primer specifici (pAstV-F, 5'-TGACATTTTGTGGATTACAGTT e pAstV-R, 5'-CACCCAGGGCTGACCA) che amplificano una regione di 799nt delle ORF1b e 2. Le reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione sono state condotte insieme in un sistema one step-RT-PCR utilizzando il kit one step-RT-PCR (Qiagen). Il profilo termico prevede 30' a 50°C ,15' a 94°C e 40 cicli di 30" a 95°C, 45" a 55°C e 45" a 72 °C, con un'elongazione finale di 7' a 72°C. I prodotti della reazione di RT-PCR sono poi stati analizzati su gel di agarosio all'1.5% per valutare la presenza di bande del peso atteso (799bp).

Sequenziamento e analisi filogenetica

Per confermare il risultato ottenuto e avere maggiori informazioni sui campioni positivi, gli amplificati positivi alla RT-PCR sono stati sequenziati, dopo purificazione utilizzando BigDye terminator kit (Applied Biosystems) con gli stessi primers della RT-PCR, in entrambe le direzioni con sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), e analizzati filogeneticamente utilizzando BLAST. L'allineamento delle sequenze è stato calcolato utilizzando CLUSTAL W (software Lasergene-DNASTAR Inc.) e l'analisi filogenetica è stata costruita utilizzando PAUP (software MEGA version 5.0). Le sequenze dei campioni analizzati sono poi state confrontate con quelle dei ceppi riportati in altre pubblicazioni [6,9,12] e presenti in Gen Bank. L'albero è stato costruito utilizzando Neighbor-joining con 1000 Bootstrap Replications e il Kimura 2-parameter model.

RISULTATI

RT-PCR

Dieci dei 18 campioni analizzati sono risultati positivi alla RT-PCR per pAstV (Tab.1).

Tabella 1. Campioni analizzati suddivisi per anno, numero progressivo, provincia, materiale, età dell'animale, risultati dei vari esami precedentemente condotti sul campione (esame anatomico-patologico, batteriologico per *Salmonella*, ELISA virologico per Coronavirus della PED, ELISA/nsME per Rotavirus, RT_PCR per Enterovirus suini (Teschovirus/PEV-A/PEV-B) ed esito RT-PCR per pAstV. (legenda: n.r.: non riportato)

Anno	N. progr.	Prov	Materiale	Età	Anatomopat.	<i>Salmonella</i>	PEDV	Rotavirus	Enterovirus	pAstV
2008	1	TV	cont.intest.	svezzamento	enterocolite	neg	neg	neg	pos	pos
2009	2	VR	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	pos	neg	neg
	3	BS	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	4	CR	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	5	BS	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
2010	6	BS	cont.intest.	sottoscrofa	enterite catar.	neg	neg	neg	pos	neg
	7	BS	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	8	VR	fece	magrone	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	9	MI	cont.intest.	svezzamento	enterite	neg	neg	neg	pos	neg
	10	CR	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	pos	neg	pos
2011	11	CR	fece	n.r.	diarrea	pos	neg	pos	pos	pos
	12	BS	fece	n.r.	diarrea	pos	neg	pos	neg	pos
	13	BS	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	pos
	14	MN	fece	n.r.	diarrea	pos	neg	neg	neg	pos
	15	PC	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	neg
	16	PC	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	neg	neg
	17	PC	fece	n.r.	diarrea	neg	neg	neg	pos	neg
	18	BS	cont.intest.	svezzamento	enterocolite	neg	neg	neg	pos	pos

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati preliminari ottenuti da questo studio confermano l'identificazione di pAstV nel contenuto intestinale e nelle feci di suini conferiti al laboratorio a seguito di una diagnosi clinica o anatomo-patologica di diarrea o enterite/gastroenterite e indicano quindi la presenza di questo virus anche negli allevamenti suini in Italia.

In 4 campioni sono stati riscontrati come unico agente infettivo coinvolto, in altri 2 casi in associazione a Enterovirus, in 1 caso a *Salmonella* e in 3 casi in associazione a Rotavirus. Questi risultati rendono plausibile una possibile correlazione eziopatogenetica di pAstV con quadri di enterite/diarrea nel suino. Ciononostante il loro ruolo definitivo sia come agente primario che come co-patogeno nella patogenesi di enterite deve essere meglio chiarito.

La nsEM si è confermata come un metodo di scelta per uno screening iniziale di enterite virale, poiché è veloce, totipotente (*catch-all-method*), in grado di identificare virus che non possono essere isolati o identificati con altri metodi ed è anche in grado di mostrare infezioni miste, tuttavia non consente ulteriori discriminazioni e caratterizzazioni di virus morfologicamente simili tra loro, fatto questo che impone l'uso di PCR, in combinazione o meno con il sequenziamento dei prodotti. Quindi, in associazione alla nsME o come metodica specifica per la ricerca diretta di pAstV nei campioni fecali, la RT-PCR si è dimostrata sensibile e adeguata. L'albero filogenetico (Fig.2) contiene i diversi gruppi dei Mamastrovirus e Avastrovirus. L'analisi filogenetica fatta sulla regione ORF 1b e ORF 2 dimostra che i ceppi analizzati di pAstV si dispongono in diversi rami di un unico cluster all'interno dell'albero Mamastrovirus ed in particolare insieme ai ceppi del pAstV4. I nostri risultati preliminari confermano quindi una certa variabilità genetica dei ceppi di pAstV anche se non paragonabile a quella descritta dai vari gruppi che negli ultimi anni hanno studiato le caratteristiche genetiche di pAstV [3; 9; 12]. In generale la variabilità genetica degli AstV suggerisce diverse origini dei diversi lineaggi e presume che esistano eventi di ricombinazione e trasmissione interspecifica tra diverse specie di ospiti mammiferi [4; 9]. Ulloa et al., 2010 hanno mostrato correlazioni genetiche tra Astrovirus del suino ed umani, ipotizzando una possibile ricombinazione interspecifica degli Astrovirus di queste specie [14]. La ricombinazione è un fenomeno frequente e comune nei virus a RNA a senso positivo, quindi risulta possibile anche per gli AstV. Nell'uomo si conoscono lineaggi geneticamente differenti di HAstV (HAstV classici, HAstV-MLB e HMOAstV) [2] e i ceppi di pAstV sono associati non solo al ceppo prototipo dell'Astrovirus umano, ma anche a ceppi umani scoperti recentemente, sottolineando che eventi di trasmissioni interspecifiche multiple tra questo ospite e altre specie sono possibili [9].

Le infezioni sperimentali condotte da Bridger, 1980 e Shimizu et al., 1990 hanno dimostrato la patogenicità di pAstV nel suinetto, ma non ne provano il ruolo definitivo come agente primario di enterite. Nonostante ciò, va ricordato che anche lievi diarree o enteriti inducono gravi perdite nell'allevamento suino andando ad aumentare gli scarti, le disparità nella nidata e i costi per il diminuito incremento e le spese mediche e diagnostiche. In realtà la compartecipazione/associazione con altri agenti patogeni che agiscono allo stesso livello e in soggetti della stessa età (ad esempio i campioni risultati positivi anche per Enterovirus e Rotavirus), l'induzione di sintomi enterici anche lievi o di manifestazioni più gravi negli animali giovani sono state osservate per gli Astrovirus in tutte le altre specie e quindi possono essere espressione della patogenicità anche di pAstV nel suino.

I patogeni emergenti rappresentano un costante rischio per la sanità animale e umana. I suini sono sempre più identificati come portatori di un ampio range di virus che sembrano stabilire una persistenza a lungo termine in questa specie, e inoltre appaiono spesso come reservoir per molti agenti zoonosici [5]. Di conseguenza dovrebbe essere implementata una costante

sorveglianza per rilevare ogni nuovo virus identificato nel suino, che deve poi essere studiato e analizzato con attenzione per capirne l'ecologia, la patogenesi e l'epidemiologia.

BIBLIOGRAFIA

- Bridger J.C. (1980), "Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhea". *Vet Rec* 107, 532–533
- Finkbeiner S. R., Le B. M., Holtz L. R., Storch G. A. & Wang D. (2009), "Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children". *Emerg Infect Dis* 15, 441–444
- Indik S., Valicek L., Smid B., Dvorakova H., Rodak L. (2006), "Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus". *Vet Microbiol* 117, 276–283
- Jonassen C.M., Jonassen T.O., Saif Y.M., Snodgrass D.R., Ushijima H., Shimizu M., Grinde B. (2001), "Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses". *J Gen Virol* 82, 1061–1067
- Lan D., Ji W., Shan T., Cui L., Yang Z., Yaun C., Hua X. (2011), "Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China". *Arch Virol* 156, 1869–1875
- Laurin M.-A., Dastor M., L'Homme Y. (2011), "Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses". *Arch Virol* 156, 2095–2099
- Lavazza, A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990) Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet Rec*, 126, 581.
- Lukashov V.V. & Goudsmit J. (2002), "Evolutionary relationships among Astroviridae". *J Gen Virol* 83, 1397–1405
- Luo Z., Roi S., Dastor M., Gallice E., Laurin M.-A., L'homme Y. (2011), "Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs". *Vet Microbiol* 149, 316–323
- Mendez E. & Arias C.F. (2007), "Astroviruses". In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds) "Fields virology". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5th ed., vol. 1, pp 981–1000
- Monroe S.S. (2005), "Astroviridae". In: Carter M.J., Herrmann J., Mitchel J.K., Sanchez-Fauquier A. (eds) "Virus taxonomy". Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, pp 859–864
- Reuter G., Pankovics P., Boros A. (2011), "Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary". *Arch Virol* 156, 125–128
- Shimizu M., Shirai J., Narita M., Yamane T. (1990), "Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney". *J Clin Microbiol* 28, 201–20
- Ulloha J.C. & Gutierrez M.F. (2010), "Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses". *Can J Microbiol* 2010 56(7), 569–577
- Zhu H. C., Chu D. K., Liu W., Dong B. Q., Zhang S. Y., Zhang J. X., Li L. F., Vijaykrishna D., Smith G. J. & other authors (2009), "Detection of diverse astroviruses from bats in China". *J Gen Virol* 90, 883–887.