

# IDENTIFICAZIONE DI NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA

## IDENTIFICATION OF GII NOROVIRUS IN SWINE FAECAL SAMPLES IN NORTHERN ITALY

RIZZO G.<sup>1</sup>, CAVICCHIO L.<sup>1</sup>, AMATO L.<sup>1</sup>, VIERIA J.T.<sup>1</sup>, FORZAN M.<sup>2</sup>, USTULIN M.<sup>1</sup>,  
MONNE I.<sup>1</sup>, VIO D.<sup>1</sup>, BONFANTI L.<sup>1</sup>, BEATO M.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, (IZSVe), Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (Padova), Italy;*

<sup>2</sup> *Università di Pisa, Veterinary Sciences Department, Viale delle Piagge, 2, 56124 PISA, Italy.*

**Parole chiave:** Norovirus (NoVs), suino, GII

**Keywords:** Norovirus (NoVs), swine, GII

**Riassunto:** I Norovirus (NoVs) sono considerati una delle principali cause di gastroenteriti acute virali nell'uomo a livello globale. Tali virus, appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, sono classificati in 5 genogruppi (G), da GI a GV, suddivisi in 30 genotipi. NoVs umani associati a gastroenterite appartengono ai genogruppi GI, GII e GIV. I NoVs sono stati riscontrati in diverse specie animali, inclusi i suini. L'individuazione di NoV umano GII.4 in feci e prodotti di carne cruda suina ha sollevato preoccupazioni per la salute pubblica circa il potenziale zoonotico di questo virus e il ruolo del suino nell'epidemiologia di questa infezione come possibile fonte di nuovi genotipi ricombinanti pericolosi per l'uomo. Attualmente sono assenti in letteratura dati sulla prevalenza in Italia di NoVs nel serbatoio animale, quale il suino: l'unico caso descritto è relativo a un NoV GII.11, individuato a partire da un campione di feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica.

Nel presente studio sono riportati i risultati derivanti da una prima indagine conoscitiva sulla presenza e circolazione di Calicivirus nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia. Dal campionamento di feci eseguito al macello, è stato possibile identificare NoV GII. Tali dati confermano la presenza di Norovirus nel suino in Italia e sottolineano la necessità di acquisire ulteriori dati anche a livello europeo.

**Abstract:** Noroviruses (NoVs) are one of the major causative agents of non-bacterial gastroenteritis in humans all over the world. NoVs, belonging to *Caliciviridae*, are classified into five genogroups (G), from GI to GV, which are further subdivided into 30 genotypes. NoVs identified in human gastroenteritis cases are only GI, GII and GIV. NoVs have also been isolated from several animal species, including pigs. Detection of GII.4 NoV in swine fecal and retail raw meat samples has raised public health concerns about the zoonotic potential of porcine NoVs and the role of swine in the epidemiology of this infection, as possible source of new viral recombinant strains that can be dangerous for human. Currently, there are no data on the prevalence in Italy of Norovirus in the animal reservoir, such as the pig: the only case described is related to a NoV GII.11, identified in swine fecal sample in absence of gastrointestinal symptomatology.

This study reports results deriving from a first cognitive survey on Calicivirus's presence and circulation, in Veneto and Friuli Venezia Giulia's pig population. Out of 97 faeces samples analyzed, two NoV GIIs have been identified. These data confirm the presence of this important etiological agent in the Italian swine population as previously reported, underlying the necessity to further investigate the prevalence in Italy and other European countries.

## INTRODUZIONE

A livello mondiale si stima che, nell'uomo, circa il 90% dei casi di gastroenterite virale, dovuti all'ingestione di alimenti contaminati, siano causati da Norovirus (NoVs). Tali forme infettive hanno un forte impatto negativo sulla sanità pubblica, risultando un'emergenza sanitaria secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità [1]. La trasmissione di NoV avviene principalmente per via oro-fecale attraverso l'ingestione di alimenti, molluschi, verdura o acqua contaminati in diversi punti della filiera, e secondariamente per via aerea, attraverso il contatto con persone infette o a seguito di formazione di particelle di aerosol generate da episodi di vomito 'a getto' [2]. Inoltre, l'eliminazione fecale del NoV, pre-clinica e prolungata, rispetto all'insorgenza della sintomatologia, aumenta nella popolazione il rischio di eventuali infezioni e re-infezioni. Tali modalità di trasmissione associate a determinate caratteristiche del virus quali bassa dose infettante, elevata resistenza ambientale ed eterogeneità genetica, rendono i NoVs altamente contagiosi e capaci di diffondersi velocemente in ambienti chiusi e in piccole comunità come i luoghi di lavoro, i centri di assistenza medica, gli asili e le scuole [3].

I Norovirus sono virus di piccole dimensioni (circa 25-35nm), con capsidi icosaedrico ma privi di envelope, appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. Presentano un genoma a RNA a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA), lungo circa 7,5Kb, organizzato in tre Open Reading Frame (ORFs) codificanti rispettivamente per proteine non strutturali (ORF1), tra cui la RNA polimerasi RNA-dipendente - RdRp, per la proteina maggiore del capsido Viral Protein 1 -VP1 (ORF2) e per la proteina minore del capsido Viral protein 2-VP2 (ORF3) [4]. Sono classificati in cinque genogruppi (GI – GII – GIII – GIV – GV) in base alla composizione amminoacidica della proteina maggiore VP1 del capsido, coinvolta nei meccanismi di interazione recettoriale e specificità di legame virus-cellula ospite [5]. All'interno dei cinque genogruppi, vengono distinti un totale di 30 diversi genotipi. L'alto tasso di mutazione e la ricombinazione genica, che nei NoV avviene frequentemente in una regione *hotspot* a livello della giunzione ORF1/ORF2 mediante un meccanismo simile al crossing-over, rendono spesso la classificazione alquanto complessa. Infatti, oltre all'individuazione di nuovi genotipi e specie, è frequente isolare ceppi ricombinanti con caratteristiche genotipiche intermedie, difficili da classificare [6].

I virus appartenenti ai gruppi GI, GII e GIV sono responsabili di gastroenteriti acute nell'uomo. In particolare, il genotipo 4 del genogruppo II (GII.4) è responsabile di circa l'85% degli episodi epidemici di gastroenterite nell'uomo. La variante NoV GII.4 Sydney, isolata per la prima volta in Australia nel 2012, sembra essere associata a livello globale a tali focolai infettivi [7].

I suini ospitano, nel loro tratto gastroenterico, NoVs appartenenti al solo gruppo GII, quali GII.11, GII.18, GII.19, molto simili dal punto di vista genetico e antigenico ai NoVs GII umani [8]. NoVs GII.11, GII.18 e GII.19 sono stati isolati sia in feci di animali clinicamente asintomatici sia in feci di animali affetti da patologia gastroenterica [9, 10]; tali genotipi riscontrati nei soli suini non sono mai stati identificati nell'uomo. Al contrario, il genotipo umano NoV GII.4 è stato isolato sia in feci di suino, dimostrando come tale virus possa infettare uomo e ospite animale anche in condizioni naturali, sia in prodotti di carne suina, suggerendo una possibile trasmissione zoonosica attraverso la catena alimentare [11]. Tali evidenze sperimentali hanno posto l'attenzione sul potenziale zoonosico dei Norovirus e sul ruolo del suino nell'epidemiologia di questa complessa infezione, anche come fonte di nuovi genotipi pericolosi per l'uomo. Attualmente sono assenti in letteratura dati sulla presenza in Italia di NoVirus nel serbatoio animale, quale il suino: l'unico caso descritto è relativo a un NoV GII.11, individuato a partire da un campione di feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica [12].

Nel presente contributo sono riportati i risultati derivanti da una prima indagine conoscitiva sulla presenza e circolazione di Calicivirus, e più in dettaglio Norovirus, nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati in totale 18 intestini di suino provenienti dal Friuli Venezia Giulia, prelevati da capi risultati affetti da patologia gastroenterica all'esame autoptico, e 79 pool di feci, prelevati in due differenti macelli del Veneto e Friuli Venezia Giulia, nel periodo compreso tra Marzo e Giugno 2017. In assenza di dati bibliografici relativi alla prevalenza inter-aziendale, la numerosità campionaria minima necessaria per la stima della prevalenza di Norovirus in ogni Regione è stata calcolata ipotizzando una prevalenza del 50% (con una confidenza del 95% e un margine di errore del 5%) e ripartita proporzionalmente sulla base della popolazione di allevamenti di suini da ingrasso complessiva nelle due Regioni. Il numero complessivo delle aziende da ingrasso, attive al 31/12/2016, era pari a 396 per il Friuli Venezia Giulia e 1411 per il Veneto. Un'azienda è stata definita "attiva" quando è stato registrato in Banca Dati Regionale dell'Anagrafe Zootecnica Regionale almeno un censimento con n. capi > 0 o una movimentazione di animali nell'anno di riferimento. Il campionamento è stato svolto in sede di macellazione presso stabilimenti regionali selezionati in base al numero di aziende conferenti capi. Le feci sono state raccolte in pool da 5 individui per azienda. Dei 79 campioni di feci, 46 campioni provenivano da allevamenti suinicoli della regione Veneto e 33 da allevamenti suinicoli del Friuli Venezia Giulia. In Veneto sono state campionate le province di: Padova, Vicenza, Treviso, Rovigo, Belluno, Venezia e Verona; per il Friuli le province di: Pordenone, Udine e Gorizia, per un totale di 40 aziende in Veneto e 39 in Friuli.

L'RNA è stato estratto, per i campioni d'intestino, con kit commerciale "High Pure RNA Tissue kit" (Roche Life Science) a partire da 20-40mg di tessuto omogenati in 0,5ml di MEM (Minimal Essential Medium, Sigma Aldrich) supplementato con 1% di PenStrep (10000 UI/ml di Penicillina G, 100mg/ml di Streptomina), mediante Tissue Lyser (Qiagen). Per ciascun campione di feci, 1gr di materiale è stato diluito 1:5 (w/v) in 4ml di MEM supplementato con 1% di PenStrep. Il campione è stato quindi miscelato con vortex e centrifugato per 5 minuti a 14000xg e il surnatante utilizzato per l'estrazione dell'RNA mediante il kit "QIAamp Viral RNA mini kit" (QIAGEN). Gli estratti, trattati con DNAasi, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La fase di RetroTrascrizione (RT) degli RNA in cDNA è stata eseguita utilizzando dei random primers e seguendo le istruzioni d'uso riportate nel kit "SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" (Invitrogen). Al fine di non escludere nell'analisi molecolare alcuna variante di Norovirus animale, si è scelta come metodica di screening una PCR in grado di identificare tutti i generi virali appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, ragione per la quale, per confermare un eventuale campione positivo per Norovirus, si è reso necessario il sequenziamento del prodotto di PCR ottenuto. Tale PCR utilizza la coppia dei primers "p290-p110", che hanno come target un frammento di 300 paia di basi (bp) del gene codificante per l'RdRp [13]. La fase di amplificazione dei cDNA è stata condotta con il kit "GoTaq G2 Flexi" (Promega).

I prodotti di PCR sono stati in seguito visualizzati su gel di acrilamide al 7%, colorato mediante impregnazione argentea. Gli amplificati dei campioni risultati positivi mediante PCR, che hanno mostrato su gel una banda idonea in termini di dimensioni e quantità dell'amplificato, sono stati sequenziati mediante metodo Sanger, utilizzando la coppia di primers "p290-p110". Le sequenze ottenute del gene RdRp, lunghe circa 300 nucleotidi, sono state confrontate con quelle attualmente disponibili in GenBank usando il software BLAST.

## **RISULTATI**

Quattordici campioni (13 feci e 1 intestino) su 97 analizzati (79 feci e 18 intestini) sono risultati positivi mediante RT-PCR “p290-p110”. I campioni risultati positivi per la presenza del gene RdRp provengono sia dalla regione Veneto (6 campioni di feci) e sia dal Friuli Venezia Giulia (7 campioni di feci e 1 intestino). I 6 campioni di feci positivi riscontrati in Veneto appartengono ad aziende zootecniche situate nella provincia di Padova (2 campioni), Verona (2 campioni), Treviso (1 campione), Belluno (1 campione). I rimanenti 8 campioni positivi riscontrati in Friuli Venezia Giulia provengono da aziende situate nelle provincie di Pordenone (6 campioni di feci) ed Udine (1 campione di feci e 1 intestino).

A causa della presenza, in alcuni campioni, di bande di debole intensità in termini di quantità di amplificato, solo per 4 campioni è stato possibile ottenere il dato relativo alla tipizzazione molecolare in base alla sequenza nucleotidica del frammento dell’RdRp. Nello specifico, l’analisi di sequenza ha evidenziato per due campioni di feci una similarità nucleotidica, compresa tra l’89% e il 92%, con NoVs suini isolati in Europa. Per i restanti due campioni, 1 di feci e 1 di intestino, l’analisi di sequenza ha evidenziato una similarità nucleotidica, compresa tra l’87% e il 90%, con Sapovirus di origine suina.

## **DISCUSSIONE**

Tramite analisi di sequenza del frammento del gene RdRp, è stato possibile identificare due Sapovirus e due Norovirus di origine suina. I due campioni risultati positivi per Sapovirus, 1 di feci e 1 di intestino, provengono rispettivamente dalla provincia di Verona e dalla provincia di Udine. La sequenza relativa all’amplificato del campione positivo proveniente da Verona ha una similarità nucleotidica dell’87% con un Sapovirus suino isolato in Canada nel 2005 [14], mentre per il secondo campione di intestino proveniente da Udine l’analisi di sequenza ha evidenziato una similarità nucleotidica del 90% con un Sapovirus suino isolato in Irlanda nel 2005 [15].

I due campioni risultati positivi per Norovirus provengono da due diversi allevamenti suinicoli della regione Veneto, siti nello specifico nelle province di Padova e Verona. Nessuna positività è stata riscontrata nei campioni provenienti dal Friuli Venezia Giulia.

Il NoV identificato nella provincia di Padova presenta una similarità tra l’87% e l’89% con sequenze parziali di Norovirus suini identificati in Europa, Brasile e in America dal 2008 ad oggi, ed in particolare con un campione di NoVs suino identificato in Danimarca nel 2009 e un NoV GII isolato in suino a partire da contenuto intestinale in Brasile nel 2008 [16]. Il NoV identificato nella provincia di Verona presenta omologia del 92% solo con tre sequenze depositate in GenBank, di cui due sequenze riferibili a due NoVs isolati in suini in Olanda nel 2009 [17] e una terza sequenza di un NoV GII.11 isolato a partire da feci di suino in Taiwan nel 2008 [18].

Le basse omologie riscontrate dall’analisi di sequenza necessitano di considerazioni e interpretazioni.

In primo luogo, il numero di sequenze disponibili in Genbank di NoVs animali è molto limitato. Inoltre, il frammento del gene RdRp analizzato ha una lunghezza di circa 300bp, dimensione esigua rispetto ai 7,5Kb del genoma virale. Di conseguenza, il sequenziamento di una porzione genica maggiore, quale il gene VP1 (proteina del capsido), anche ai fini dell’analisi filogenetica, potrebbe consentire di ottenere informazioni più esaustive circa la tipizzazione e classificazione dei NoV isolati.

I dati presenti in letteratura circa la presenza di NoV nella popolazione suina non sono omogenei. Diversi studi riportano la rilevazione di NoVs non a seguito di campionamenti strutturati ma come identificazioni occasionali effettuate a partire da campioni precedentemente archiviati in laboratorio per altri scopi, solo una parte di questi studi si basano su campionamenti

effettuati ad hoc. In questo ultimo caso rimane comunque difficile paragonare i dati, in quanto gli schemi di campionamento sono diversi e pochi mettono in relazione i risultati ottenuti con l'età dell'animale, la stagionalità e la presenza o meno di sintomatologia gastroenterica.

## CONCLUSIONI

Attualmente, l'unico caso descritto circa la presenza di NoVs nel suino in Italia, è relativo a un NoV GII.11, individuato in una collezione di 201 campioni di feci archiviati, prelevati da animali asintomatici in due periodi distinti, Gennaio-Giugno 2006 e Novembre-Dicembre 2007, in allevamenti suinicoli del Nord Italia. Nello specifico, il NoV GII.11 è stato isolato da feci di un suino di 3 mesi d'età.

Il presente studio conferma la presenza di NoV nella popolazione suina italiana, già precedentemente rilevata nel 2011, con l'identificazione di due ceppi NoV nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia, riconducibili in base ai dati attualmente a disposizione a genotipi appartenenti al genogruppo GII. Ulteriori analisi molecolari sul gene VP1 consentiranno di caratterizzare ulteriormente i due ceppi isolati e individuare possibili ceppi ricombinanti.

## RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC 12/15).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Belliot G., Lopman B.A., Ambert-Balay K., Pothier P. (2014) "The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection". *Clin Microbiol Infect* 20:724-30.
- 2) Mathijs E., Stals A., Baert L., Botteldoorn N., Denayer S., Mauroy A. et al. (2012) "A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses" *Food Environ Virol* 4:131-52.
- 3) Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Toren K., Andersson L.M., Westin J. et al. (2014) "Norovirus GII.4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks" *J Clin Microbiol* 52:2352-8.
- 4) de Rougemont A., Ambert-Balay K., Belliot G., Pothier P. (2010) "Norovirus infections: an overview" *Med Sci (Paris)* 26:73-8.
- 5) Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. (2006) "Norovirus classification and proposed strain nomenclature" *Virology* 346:312-323.
- 6) Bull R.A., Hansman G.S., Clancy L.E., Tanaka M.M., Rawlinson W.D., White P.A. (2005) "Norovirus Recombination in ORF 1/2 overlap" *Emerg Infect Dis* 11:1079-85.
- 7) Zhang J., Shen Z., Zhu Z., Zhang W., Chen H., Qian F. et al. (2015) "Genotype distribution of norovirus around the emergence of Sydney\_2012 and the antigenic drift of contemporary GII.4 epidemic strains" *J Clin Virol* 72:95-101.
- 8) Wang Q-H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J. (2005) "Porcine noroviruses related to human noroviruses" *Emerg Infect Dis* 11:1874-1881.
- 9) Machnowska P., Ellerbroek L., Johne R. (2014) "Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany" *Vet Microbiol* 168:60-8.
- 10) Silva P.F., Alfieri A.F., Barry A.F., de Arruda Leme R., Gardinali N.R., van der Poel W.H. et al. (2015) "High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems" *Trop Anim Health Prod* 47:237-41.
- 11) Mattison K., Shukla A., Cook A., Pollari F., Friendship R., Kelton D., Bidawid S., Farber J.M. (2007) "Human norovirus in swine and cattle" *Emerg Infect Dis* 13:1184-88.

- 12) Di Bartolo I., Tofani S., Angeloni G., Ponterio E., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2014) "Detection and characterization of porcine caliciviruses in Italy" *Arch Virol* 159:2479-84.
- 13) Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M., Farkas T., Cubitt D.W., Matson D.O. (1999) "Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR" *J Virol Methods* 83:145-154.
- 14) L'Homme Y., Sansregret R., Plante-Fortier E., Lamontagne A.M., Lacroix G., Ouardani M., Deschamps J., Simard G., Simard, C. (2009) "Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007" *Arch Virol* 154:581-593.
- 15) Collins P.J., Martella V., Buonavoglia C., O'Shea H. (2009) "Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms" *Vet Microbiol* 139:176-182.
- 16) Cunha J.B., de Mendonca M.C., Miagostovich M.P., Leite J.P. (2010) "Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil" *Arch Virol* 155:1301-1305.
- 17) Mauroy A., Van der Poel W.H., der Honing R.H., Thys C., Thiry E. (2012) "Development and application of a SYBR green RT-PCR for first line screening and quantification of porcine sapovirus infection" *BMC Vet Res* 8: 193
- 18) Chao D.Y., Wei J.Y., Chang W.F., Wang J., Wang L.C. (2012) "Detection of multiple genotypes of calicivirus infection in asymptomatic Swine in Taiwan" *Zoonoses Public Health* 59:434-444.