

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI PCV2 NEI SUINI SELVATICI E DOMESTICI IN SARDEGNA

Dei Giudici S.^{*[1]}, D'Avino C.^[1], Salaris A.A.^[1], Sulas A.^[1], Madrau M.P.^[1], Sanna M.L.^[1], Oggiano A.^[1]

Keywords: *Porcine Circovirus Type II, Phylogenetic analysis,*

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna ~ Sassari

SUMMARY: *The aim of this work is to establish the genetic characteristics of Porcine Circovirus Type II (PCV2) strains circulating in Sardinian swine. The molecular characterization was done on 20 positive samples collected among swine samples from all over the island. The viral DNA extracted from tissues was detected by Real time PCR. The results were compared with those previously obtained from wild boars and have showed that the predominant genotype in Sardinia is PCV2b and there are no differences between PCV2 strains circulating in swine and wild boars.*

INTRODUZIONE: *Il circovirus suino Tipo 2 (PCV2) è responsabile, da solo e/o in associazione con altri patogeni, di diverse sindromi patologiche che colpiscono i suini e i cinghiali, indicate con il termine generico di Porcine Circovirus Disease (PCVD), ed è causa di ingenti danni economici e sanitari.*

PCV2 è diffuso in tutti i paesi a suinicoltura avanzata e nella quasi totalità degli allevamenti europei è presente positività sierologica. Il virus appartiene alla famiglia Circoviridae, genere Circovirus, ha un diametro di circa 17-22 nm, simmetria icosaedrica ed è privo di envelope; il genoma è costituito da ssDNA circolare con polarità ambisenso di 1.767-1.768 kb e contiene tre principali ORF. La proteina Cap è la maggiore proteina strutturale espressa dall'ORF2 ed è la responsabile dell'alta variabilità antigenica del virus, uno dei fattori a cui è dovuta la difficoltà di controllo delle patologie associate al PCV2 (1). Attualmente si distinguono tre genotipi differenti di PCV2: PCV2a suddiviso in cinque cluster (2A, 2B, 2C, 2D e 2E), PCV2b suddiviso in tre cluster (1A, 1B ed 1C) e PCV2c di cui si conoscono solo tre ceppi isolati in Danimarca (3).

Il nostro gruppo ha di recente tipizzato alcuni isolati rinvenuti in cinghiali sardi (3), ma non esistono informazioni sulle caratteristiche dei ceppi circolanti nei suini in Sardegna o in Italia.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare le sequenze genomiche di alcuni ceppi di PCV2 ottenuti dai suini e confrontarle con quelle precedentemente ottenute dai cinghiali per evidenziare eventuali differenze filogenetiche fra gli stipti.

MATERIALI E METODI: *Sono stati esaminati campioni di tessuto, milza o linfonodi, prelevati da 124 suini. I campioni sono stati scelti fra quelli, provenienti da tutta l'isola, recapitati presso l'Istituto Zooprofilattico per attività correlate al piano di eradicazione della peste suina africana negli anni 2011 e 2012; non vi erano informazioni sull'eventuale presenza di patologie legate al PCV2.*

I campioni di cinghiali, analizzati in precedenza (3), erano stati raccolti durante la campagna venatoria e di riduzione della popolazione effettuata nel centro-nord dell'isola negli anni 2009-2012.

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita con il Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche) su omogenati d'organo al 10% in PBS.

La ricerca del genoma di PCV2 è stata condotta mediante Real Time PCR, come precedentemente descritto (4). In tutte le

reazioni è stato inserito un controllo positivo, costituito da un isolato di campo, che è stato sequenziato insieme ai campioni positivi (KPCV2).

Per la reazione di sequenza è stata amplificata una porzione dell'ORF2 di 481 bp compresa fra i primers PMWS150 e PMWS1443 secondo quanto descritto in precedenti lavori (5). 20 amplificati positivi, indicati con la sigla S1-S20, di cui si riportano le caratteristiche nella tabella 1, sono stati purificati con il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega), secondo le istruzioni della ditta e sottoposti a sequenziamento diretto utilizzando BigDye terminator® v1.1 Cycle Sequencing Kit e lo strumento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Le sequenze ottenute sono state inviate in banca dati (Blastn) per verificare la corretta identificazione ed allineate mediante il software ClustalW con sequenze di riferimento e con quelle di 15 cinghiali precedentemente ottenute. Le sequenze prelevate dalle banche dati sono state scelte in base all'anno, al paese di isolamento ed allo stato sanitario (sconosciuto, clinicamente sano o affetto da PCVD). L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il metodo Neighbor-Joining (NJ) con il modello Kimura 2-parametri ed il software MEGA (versione 5.1). L'analisi statistica è stata condotta con il metodo Bootstrap su 1000 replicati.

RISULTATI E CONCLUSIONI: *Dei 120 campioni di suino analizzati, 98 sono risultati positivi per la ricerca del PCV2 in real time PCR (81,6%). Le sequenze parziali della proteina Cap, ottenute da 20 amplificati hanno mostrato una similarità del 92-100% fra di loro e del 87-100% con quelle dei cinghiali.*

La figura 1 mostra l'albero filogenetico ottenuto dalla comparazione delle sequenze con quelle riportate in banca dati. E' possibile osservare come il genotipo prevalente nei suini domestici e selvatici in Sardegna sia il PCV2b (34/35 campioni). 17 suini e 14 cinghiali appartengono al sottotipo 1A/B e 3 suini al sottotipo 1C. Un solo campione, un cinghiale, appartiene al genotipo PCV2a, sottotipo 2E.

I campioni clusterizzano insieme a ceppi di riferimento isolati in tutto il mondo in anni differenti ed indipendentemente dallo stato sanitario degli animali. Infatti è noto che non esiste un legame fra le caratteristiche genetiche dei ceppi isolati e la presenza dei sintomi clinici ascrivibili alle patologie correlate al PCV2. Invece è stata dimostrata con studi retrospettivi l'esistenza di uno shift genetico fra il PCV2a ed il PCV2b associato alla comparsa delle PCVD in tutto il mondo fra gli anni 90 e 2000 (6). I nostri dati sembrerebbero confermare che, come accaduto in altri paesi, il genotipo 2a sia stato quasi completamente sostituito dal 2b.

Non si evidenziano differenze sostanziali fra i ceppi circolanti nelle due specie, suino e cinghiale, né relazioni con l'area geografica di provenienza, con l'eccezione dei campioni S4, S17 ed S20 appartenenti al sottotipo 1C del PCV2b che provengono da due allevamenti diversi situati nel comune di Alà dei Sardi. Questi ceppi appartengono ad un cluster formato quasi esclusivamente da isolati cinesi. Lavori recenti riferiscono che si tratti

del sottotipo prevalente in Cina negli anni 2009-2010 mentre dal 2001 al 2008 il principale sottotipo era rappresentato da 1A/B (7). Gli isolati di ciascun genotipo di PCV2 possiedono un motivo specifico fortemente conservato, localizzato fra gli aminoacidi 86 e 91 (86-SNPRSV-91) della proteina capsidica che è stato associato alla virulenza di PCV2b. Il sottotipo PCV2b-1C presenta una mutazione (R in L) in posizione 89 rispetto al PCV2b-1A/B che potrebbe influenzare la sua patogenicità, la quale andrà ulteriormente indagata. Sarebbe interessante ve-

dere se anche in Sardegna questo sottotipo in futuro tenderà a prevalere su quello 1A/B. In Europa sono stati segnalati solo due ceppi appartenenti a questo cluster, uno olandese ed uno tedesco, e a nostra conoscenza questa è la prima segnalazione in Italia. I nostri risultati indicano che, a parte il cluster 1C, non vi sia differenza fra i ceppi circolanti fra i suini e i cinghiali. Estendere l'analisi ad un maggior numero di campioni su un'area più vasta del nostro territorio, potrà permettere di confermare e integrare i risultati ottenuti.

| Campione | Anno | Specie | Comune | Genotipo |
|----------|------|-----------|---------------------------|-------------|
| S1 | 2011 | Suino | Muravera (CA) | PCV2b, 1A/B |
| S2 | 2011 | Suino | Muravera (CA) | PCV2b, 1A/B |
| S3 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S4 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1C |
| S5 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S6 | 2011 | Suino | Gavino Monreale (VS) | PCV2b, 1A/B |
| S7 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S8 | 2012 | Suino | Butei (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S9 | 2012 | Suino | Butei (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S10 | 2010 | Suino | Sinnai (CA) | PCV2b, 1A/B |
| S11 | 2012 | Suino | Oschiri (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S12 | 2012 | Suino | Burgos (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S13 | 2012 | Suino | Burgos (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S14 | 2012 | Suino | Burgos (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S15 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S16 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1A/B |
| S17 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1C |
| S18 | 2012 | Suino | Gergei (CA) | PCV2b, 1A/B |
| S19 | 2011 | Suino | Benetutti (SS) | PCV2b, 1A/B |
| S20 | 2012 | Suino | Alà dei Sardi (OT) | PCV2b, 1C |
| C1 | 2009 | Cinghiale | Butei (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C2 | 2009 | Cinghiale | Butei (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C3 | 2009 | Cinghiale | Arzachena | PCV2b, 1A/B |
| C4 | 2009 | Cinghiale | Pattada (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C5 | 2009 | Cinghiale | Pattada (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C6 | 2009 | Cinghiale | Butei (SS) | PCV2a, 2E |
| C7 | 2010 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C8 | 2011 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C9 | 2010 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C10 | 2010 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C11 | 2010 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C12 | 2010 | Cinghiale | Porto Conte (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C13 | 2012 | Cinghiale | Villanova Monteleone (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C14 | 2012 | Cinghiale | Butei (SS) | PCV2b, 1A/B |
| C15 | 2011 | Cinghiale | Berchidda (OT) | PCV2b, 1A/B |

Tabella 1: caratteristiche dei campioni di suini e cinghiali tipizzati in questo studio, distinti per comune, specie, anno di isolamento e genotipo

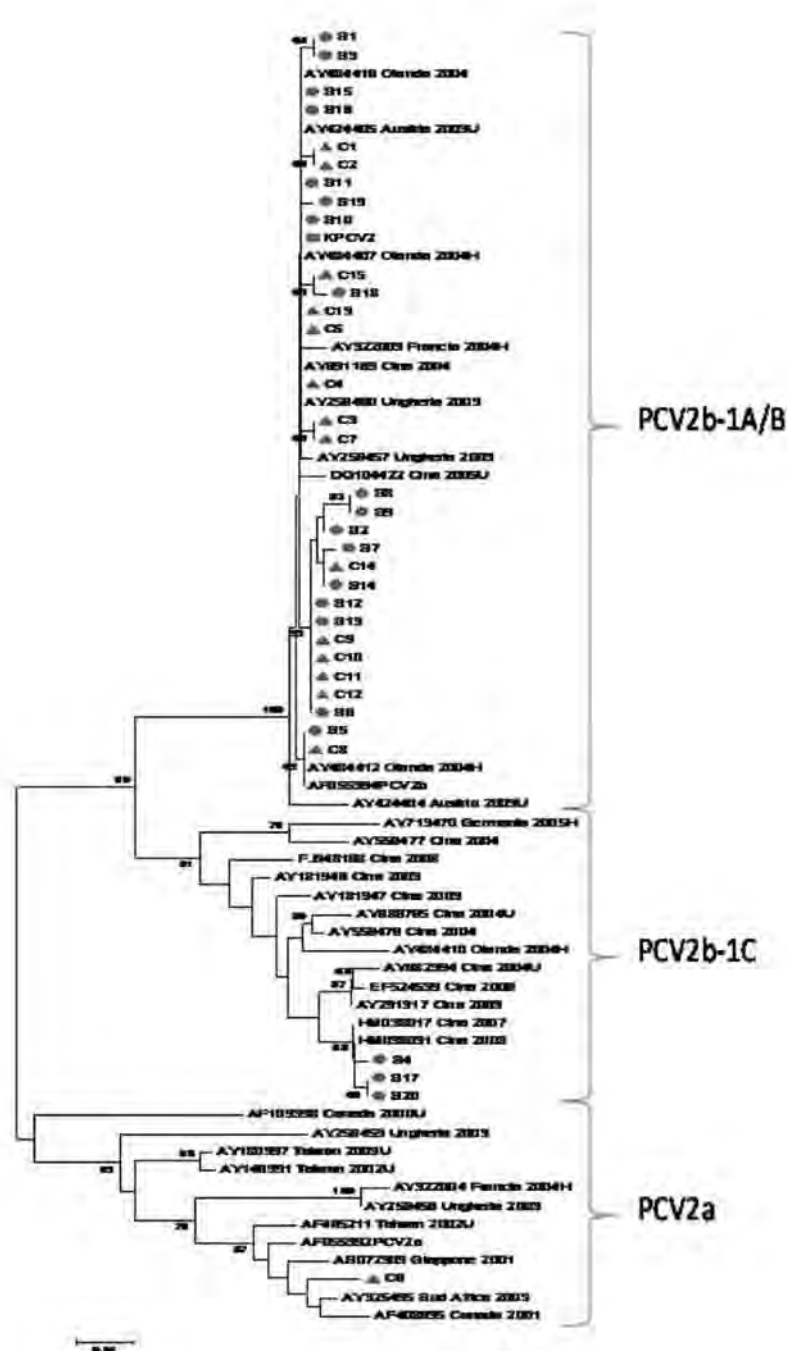


Figura 1. Albero filogenetico NJ ottenuto dal confronto delle sequenze parziali del gene codificante per la proteina Cap del PCV2 dei ceppi sardi con quelle presenti in banca dati. I simboli rossi indicano i campioni analizzati. Cerchio: suini; triangolo: cinghiali; quadrato: controllo positivo. La sigla accanto ai ceppi di referenza indica lo stato sanitario. U: unknow, H: healthy. Nessuna sigla: animale con PCVD.

BIBLIOGRAFIA: 1. Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S., (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81: 2281-2288.
 2. Segalés L., Olvera A., Grau-Roma L. et al., (2008) PCV2 genotype and nomenclature. *Veterinary Record* 162, 867-868
 3. Dei Giudici S., Angioi P., Manca A.F., Vidili M.L., Zinellu S., Oggiano A. (2011) Caratterizzazione molecolare dei ceppi di PCV2 circolanti nei cinghiali in Sardegna. *Atti SIDILV*, p.203-204
 4. Yu S., Opiressnig T., Kitikoo P., Nilubol D., Halbur P. G., Thacker E. (2007). Porcine Circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115 261-272

5. Meehan BM., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis JA., Krakowka S., Allan GM. (2001) Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology* 2001; 146(4): 835-42.
 6. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Laersen L.E. (2008) Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotype with time. *Australian Veterinary Journal* 128, 56-64.
 7. Cai L, Ni J, Xia Y, Zi Z, Ning K, Qiu P, Li X, Wang B, Liu Q, Hu D, Yu X, Zhou Z, Zhai X, Han X, Tian K. (2012) Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus Res. Apr*;165(1):95-102