

INDAGINI VIROLOGICHE NEI CONFRONTI DEL CIRCOVIRUS SUINO TIPO 2 (PCV2) NEL CENTRO ITALIA: RISULTATI PRELIMINARI

VIROLOGICAL INVESTIGATIONS AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) IN CENTRAL ITALY: PRELIMINARY TESTS

STEFANO PETRINI¹, MATTEO SABBATINI¹, VALENTINA SILENZI¹, SIMONE BAROCCI¹, FRANCESCA CIUTI¹, GIOVANNI PEZZOTTI², MANFREDO FORTUNATI¹, MARTA PANICCIÀ¹.

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sez. Diagn. di Fermo (AP);*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia (PG).*

Parole chiave: PCV2, suini, organi, isolamento virale, PCR.

Key words: PCV2, swine, virus isolation, PCR.

Riassunto. Il Circovirus suino tipo 1 (PCV1) è diffuso nel suino ma non è considerato patogeno. Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è clinicamente associato ad una malattia debilitante denominata sindrome del dimagrimento post-svezzamento (PMWS). In questo studio preliminare, sono stati raccolti 205 campioni d'organo provenienti da 44 allevamenti suini situati nel territorio Umbro-Marchigiano, per le indagini virologiche nei confronti di PCV2. I risultati evidenziano la presenza dell'infezione virale negli organi saggiati in una percentuale variabile dal 16,66% nel fegato al 45,45% nei linfonodi. Inoltre, i campioni risultati positivi provenivano per il 21,73% delle aziende situate nella Regione Marche, mentre per quanto attiene alla Regione Umbria si accertava il 42,85% di positività alla stessa infezione virale. Complessivamente, dalle aziende saggiate, 14 sono risultate positive al virus PCV2 con una percentuale pari al 31,81%.

Abstract. Porcine Circovirus type 1 (PCV1) is considered to be widespread in pigs but non-pathogenic. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) is considered as the causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in domestic pigs. In these preliminary tests, we present the results of samples collection for virological investigations against PCV2 from 44 swine breeding farms inside Marche or Umbria geographical area. The results evidenced virological positivity against PCV2 in organs ranging from 16,66% (liver) to 45,45% (lymph nodes). Moreover, the positive samples from 21,73% to 42,85% were collected from Marche or Umbria geographical area respectively. Altogether, from all swine farms examined, 14 herds had 31,81% positivity to PCV2.

INTRODUZIONE

I virus appartenenti alla Famiglia *Circoviridae* genere *Circovirus*, sono stati descritti nel suino (circovirus del suino, PCV), nel pollo (virus dell'anemia del pollo, CAV), nei psittacidi e nei piccioni (PBFDV). Le stesse infezioni sono associate rispettivamente a specifici ospiti (Ritchie

et al., 1989; Todd *et al.*, 2001; Chae, 2005).

Il Circovirus suino tipo 1 (PCV1) è ubiquitario nel suino, ma non sembra essere responsabile di manifestazioni cliniche in animali adulti, mentre il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è clinicamente associato ad una malattia debilitante denominata sindrome del dimagrimento post-svezzamento (PMWS). In alcune circostanze l'infezione da PCV2 è stata anche associata a nefrite interstiziale (Sarli *et al.*, 2008) e dermatite suina (PDNS), in associazione alla PMWS (Segales *et al.*, 2005). PCV2 risulta essere estremamente diffuso in Europa, USA e Canada (Todd *et al.*, 2001). In particolare la presenza di anticorpi nei confronti di PCV2 è stata dimostrata in percentuali prossime al 100%, sia tra allevamenti di suidi domestici che all'interno degli stessi. Sebbene negli ultimi anni si sia riscontrato un certo decremento nel numero di episodi patologici con quadri clinici tipici dell'infezione da PCV2, i livelli di mortalità e le perdite indirette legate all'infezione, sembrano essere rimaste pressoché costanti (Segales *et al.*, 2007). Ad oggi, le informazioni relative alla presenza del virus negli allevamenti suini italiani risultano incomplete. Per quanto riguarda il territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM), precedenti indagini hanno dimostrato la presenza del virus nei suidi selvatici (Petrini *et al.*, 2008). Scopo del presente lavoro è stato quello di riportare i risultati delle indagini effettuate nel periodo settembre 2007 - dicembre 2008 presso la Sezione diagnostica di Fermo dell'IZSUM. In particolare i dati ottenuti sono relativi alle indagini virologiche effettuate su campioni d'organo di soggetti con sintomatologia clinica riferibile e/o associata ad infezione da PCV2, provenienti da allevamenti suini del territorio Umbro Marchigiano.

MATERIALI E METODI

Animali e campioni

Lo studio ha previsto la raccolta di campioni d'organo per l'isolamento virale provenienti da 44 aziende suine che non effettuavano la vaccinazione nei confronti di PCV2, di cui 21 situate nella Regione Umbria e 23 nel territorio Marchigiano. I suini (ibridi commerciali) sono stati recapitati presso l'IZSUM per accertamenti diagnostici sia da veterinari pubblici che da veterinari aziendali. In sede di esame necroscopico, sono stati prelevati, in funzione delle lesioni macroscopiche osservate, 205 campioni d'organo come evidenziato nella tabella 1.

Isolamento virale

5 grammi di ciascun campione sono stati omogenati in 15 ml di terreno minimo essenziale, MEM (Lonza, Milano, Italia) e centrifugati (Eppendorf 5804 R) a 850 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante dopo essere stato filtrato a 0,45 µm e aggiunto di 5000 U.I. di penicillina, 5000 U.I. di streptomina e 25 µg/ml di fungizone (Lonza, Milano, Italia) per 4 ore a temperatura ambiente (22°C), è stato inoculato su piastre Costar® 24 (Corning, NY, USA) contenenti culture cellulari di rene neonatale di suino (NSK), clone BS CL 177 (Ferrari *et al.*, 2003). Le cellule prima del loro utilizzo sono state saggiate per l'assenza del Circovirus suino tipo 1 (PCV1), del Circovirus suino tipo 2 (PCV2), del virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRSV), e del virus di Aujeszky (PRV). Tre pozzetti di ciascuna piastra sono stati utilizzati per ciascun campione. Dopo aver fatto adsorbire i campioni sulle colture cellulare di cui sopra, per 1 ora a temperatura ambiente (22°C), le piastre sono state poi incubate a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Le stesse sono state controllate giornalmente per la presenza di effetto citopatico e/o tossico e, a distanza di 10 giorni l'uno dall'altro, sono stati effettuati 3 passaggi seriali. Al fine di rilevare la presenza virale, dal surnatante delle colture

sopramenzionate è stata eseguita la PCR. Gli stipti di PCV2 isolati sono stati poi registrati e conservati a - 80°C per l'allestimento di una collezione virale.

PCR

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita con kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Milano, Italia) da singoli omogenati (1:5 in PBS) d'organi. La PCR è stata effettuata secondo il protocollo descritto da Ellis *et al.*, (1999) in un volume di 25 µl contenente MgCl₂ (1 mM), Buffer GoTaq® 1X (Promega, WI, USA), dNTPs (0,2 mM), primers PMWS-150 e PMWS-1443 (1 µM), GoTaq® (1,25 U) e 2,5 µl di DNA. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C x 1 minuto; 35 cicli a 94°C x 1 minuto; 55°C x 1 minuto; 72°C x 1 minuto; l'estensione finale a 72°C x 10 minuti. Gli ampliconi ottenuti sono risultati di 481 bp. La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio al 2%. Per la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il bromuro di etidio (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e come marker di peso molecolare è stato utilizzato il *ladder* 100 bp (Celbio, Milano, Italia).

RISULTATI

Dagli animali sottoposti ad esami necroscopici è stato possibile accertare, in generale, la presenza di condizioni organiche scadenti, associate ad atrofia muscolare, anemia, pallore delle mucose ed aumento di volume dei linfonodi tracheo-bronchiali, inguinali e meseraici. In particolare questi ultimi si presentavano di colore bianco-grigiastro e con superficie esterna multilobulata. Dalle colture cellulari inoculate con gli organi precedentemente menzionati, non è stato evidenziato alcun effetto citopatico (Figura 1). Mentre dalle indagini di biologia molecolare condotte dal surnatante delle stesse cellule, è stato possibile amplificare la sequenza genomica ORF2 di PCV2 in 74 campioni d'organo con una percentuale di positività variabile dal 16,66% nel fegato al 45,45% nei linfonodi degli organi saggiati (Tabella 1) e provenienti da 14 aziende suine (Figura 2). Gli animali risultati positivi provenivano in 9 casi da aziende Umbre (42,85%) e 5 da allevamenti Marchigiani (21,73%). Complessivamente, considerando un totale di 44 aziende esaminate nel territorio Umbro-Marchigiano, 14 sono risultate positive al virus PCV2 con una positività pari al 31,81% (Tabella 2).

DISCUSSIONE

L'infezione da PCV2 risulta estremamente diffusa in tutto il territorio europeo, nord america e Canada. Sebbene negli ultimi anni si sia riscontrato un certo decremento nel numero di episodi riferibili ad infezione da PCV2 sia in Europa che in alcuni Paesi Asiatici, i livelli di mortalità e le perdite economiche causate da questo virus sembrano essere rimasti pressoché costanti (Segales *et al.*,2007). I risultati ottenuti nella presente indagine dimostrano la presenza dell'infezione da PCV2 anche negli allevamenti di suidi domestici del territorio Umbro-Marchigiano. La presenza del virus è stata sempre associata ad animali che provenivano da aziende nelle quali si era osservata una sintomatologia di tipo respiratorio e/o riproduttivo e che presentavano lesioni macroscopiche riferibili ad infezione da PCV2. In particolare i quadri anatomo-patologici evidenziavano forme di polmonite apicale, linfadenopatia generalizzata associata a pallore o aspetto emorragico dei linfonodi, epatiti e nefriti. A fronte di questi quadri macroscopici, le indagini virologiche hanno confermato la presenza del virus principalmente

nel tessuto linfatico (linfonodi, milza) seguito da rene e polmone. I risultati ottenuti in questa indagine sono in accordo con quelli ottenuti da altri Autori (Vincent et al., 2005). E' noto, infatti, che il PCV2 ha il suo tropismo a livello del tessuto linfatico con particolare riferimento ai monociti circolanti. La persistenza virale instaurata dal virus in queste cellule non altera l'attività immunomodulatoria delle stesse, ma interferisce con la produzione di diverse citochine tra cui l'interferon- γ (INF- γ), determinando una immunosoppressione dell'ospite e predisponendo di conseguenza l'organismo all'insorgenza di infezioni batteriche secondarie e/o virali (Segales et al., 2004).

In questo studio, le positività virologiche evidenziate sono tutte riconducibili a stipiti virali di campo, in quanto, al momento delle indagini, nessuna delle aziende saggiate effettuava la vaccinazione nei confronti di PCV2.

Da tutti gli stipiti isolati, verranno successivamente allestite prove di sequenziamento genetico per valutare l'omologia genomica con altri stipiti virali presenti nella banca dati elettronica GenBank, oltre a verificare se tali stipiti appartengono al sottogruppo 2a (PCV2a) o 2b (PCV2b).

CONCLUSIONI

I risultati di questa indagine preliminare depongono per un'ampia diffusione dell'infezione da PCV2 negli allevamenti suini presi in considerazione, in virtù del fatto che le aziende considerate non eseguivano programmi di profilassi vaccinale. Il rilievo di PCV2 da animali con sintomatologia respiratoria e/o riproduttiva in suini situati nel territorio Umbro-Marchigiano supportano l'ipotesi che l'infezione da PCV2 svolga un ruolo eziologico importante nell'insorgenza delle manifestazioni cliniche respiratorie e/o riproduttive in questa area geografica.

In termini di prospettive di lavoro sul PCV2, per approfondire le conoscenze relative al meccanismo patogenetico dell'infezione, con particolare riferimento all'azione immunosoppressiva, presso la Sezione diagnostica di Fermo è stato anche avviato un progetto di ricerca riguardante lo studio dell'immunità umorale e cellulo-mediata in suini sottoposti a nuovi presidi immunizzanti nei confronti di PCV2.

Per quanto attiene invece l'attività più strettamente diagnostica, è in previsione l'utilizzo di una prova sierologica ELISA, per la diagnosi indiretta di PCV2, da affiancare a prove di tipo diretto.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Maura Ferrari dell'IZSLER, di Brescia per aver fornito le colture cellulari e la Dott.ssa Rosita Vignini dell'Associazione Provinciale Allevatori (APA) della provincia di Ascoli Piceno per aver collaborato alla raccolta dei campioni.

Bibliografia

- Chae C. (2004) "Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology" *Vet J* 168:41-49.
- Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., McNeilly F. (1999) "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets" *J Vet Diagn Invest*: 11:(1)3-14.
- Ferrari M., Scalvini A., Losio M.N., Corradi A., Soncini M., Bignotti E., Milanesi E., Ajmone-Marsan P., Barlati S., Bellotti D., Tonelli M. (2003) "Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories" *J Virol Meth* 107:205-212.
- Petrini S., Gavaudan S., Barocci S., Briscolini S., Sebastiani C., Mancini P., Paniccià M., Villa R., Ferrari M. (2008) "Isolamento e caratterizzazione molecolare di diversi stipiti di circovirus suino tipo 2 (PCV2) isolati nel cinghiale nel centro Italia" *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), Salsomaggiore Terme 13-14 Marzo*, pp. 239-245.
- Ritchie B.W., Niagro F.D., Lukert P.D. (1989) "Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virol* 171: 83
- Sarli G., Mandrioli L., Panaresi S., Brunetti B., Segales J., Dominguez J. and Marcato P.S. (2008) "Characterization of interstitial nephritis in pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome" *Vet Pathol* 48:12-18.
- Segales J., Domingo M., Chianini F., Majo N., Dominguez J., Darwich L., Mateu E. (2004) "Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs" *Vet Microb* 98:151-158.
- Segales J., Allan G., Domingo M. (2005) "Porcine circovirus diseases" *Anim Heal Res Rev* 6(2):119-142.
- Segales J. (2007) "PMWS, PCV2...e cos'altro?" *Atti del XXXIII Meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS), Modena 29-30 Marzo*, pp. 87-90.
- Todd D., McNulty M.S., Adair B.M., Allan G.M. (2001) "Animal circovirus" *Adv Vir Res* 57:1-70.
- Vincent I.E., Carrasco C.P., Piriou L.G., McNeilly F., Allan G.M., Summerfield A., McCullough K.C. (2005) "Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2" *Immun* 115, 388-398.

Tabella 1. Campioni d'organo utilizzati per le indagini virologiche nei confronti di PCV2 con prevalenza (%) dell'infezione nei vari tessuti.

Table 1. Sample organs used for virological investigations against PCV2 with tissue prevalence (%).

Organi	No. saggiati	No. positivi	% positivi	No. negativi	% negativi
Polmone	75	30	40%	45	60%
Rene	12	5	41,66%	7	58.34
Fegato	24	4	16,66%	20	83.34
Milza	42	19	45,23%	23	54.77
Tonsilla palatina	1	0	0	1	100%
Linfonodi *	33	15	45,45%	18	54,55%
Intestino	6	0	0	6	100%
App.riprod.**	3	0	0	3	100%
Aborti	9	1	11,10%	8	88,90%
Totale	205	74	36,10%	131	63,90%

* Inguinali, tracheo-bronchiali, meseraici; ** Utero, corno uterino, ovaio

Tabella 2. Regioni di provenienza dei campioni saggiati per presenza del Circovirus suino tipo 2 (PCV2).

Table 2. Geographical area of the samples tested for the presence of the Porcine Circovirus type 2 (PCV2).

Regioni	No. Aziende	Aziende con positività virologica	
		No.	%
Marche	23	5	21,73%
Umbria	21	9	42,85%
Totale	44	14	31,81%

Figura 1. Colture cellulari NSK 7 giorni post-inoculo, 40X colorazione H&E.
Figure 1. Neonatal Swine Kidney cell culture 7 days post inoculation, 40X stained H&E.

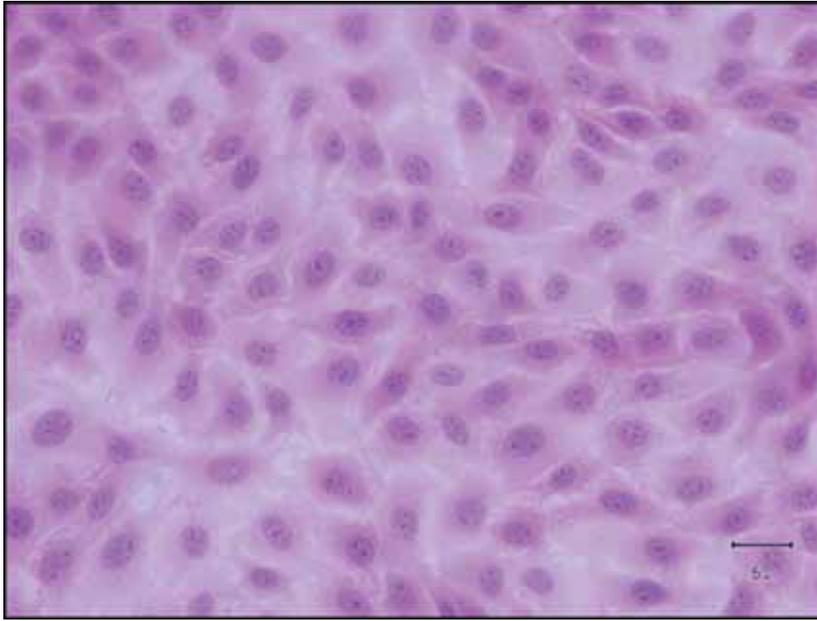


Figura 2. Elettroforesi su gel di agarosio (2%) dei prodotti di PCR eseguita da surnatante di colture cellulari (NSK) inoculate con campioni d'organi positivi (M=ladder 100 bp; campioni positivi da n. 1 a n. 14; C-= controllo negativo; C+=controllo positivo).

Figure 2. PCR reaction from supernatant of NSK cell cultures inoculated with positive organs (M=ladder 100 bp; positive samples from n. 1 to n. 14; C- negative control; C+ positive control).

