

CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEI CEPPI DI AUJESZKY ISOLATI IN ITALIA TRA IL 2000 E IL 2010.

GENOMIC CHARACTERIZATION OF PSEUDORABIES VIRUS ISOLATED IN ITALY IN 2000 - 2010.

CATELLA A., MORENO A., SOZZI E., LELLI D., BONIOTTI B., ALBORALI L., LUPPI A., NIGRELLI D., FONTANA R., CORDIOLI P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Brescia

Parole chiave: PRV; geni gC e gE; caratterizzazione genomica; Italia

Key words: PRV; gC and gE genes; genomic characterization; Italy

Riassunto. Questo studio riporta la caratterizzazione genomica, basata sul sequenziamento parziale dei geni UL44 e US8 che codificano rispettivamente le glicoproteine gC e gE, di un totale di 36 ceppi del virus della pseudorabbia isolati in Italia dal 2000 al 2010. Ventinove ceppi sono stati isolati da suini e 7 da cani. L'analisi filogenetica ha evidenziato che 26/29 ceppi suini appartengono per il gene gC e il gE al cluster B che raggruppa la maggior parte di ceppi PRV recentemente isolati da suini in Europa ed America. Un solo ceppo suino presenta una elevata correlazione con i ceppi PRV isolati negli anni 70-80, attualmente quasi scomparsi nella popolazione suina ma prevalenti nei cinghiali. I due ceppi suini restanti sono correlati ai ceppi PRV storici per quanto riguarda il gene gC mentre il gene gE clusterizza con i ceppi PRV recenti. Dai 7 ceppi isolati da cane, 5 ceppi provengono da cani da caccia e presentano una elevata percentuale di omologia con i ceppi isolati da cinghiale. Due ceppi isolati da un cani non utilizzati per le attività venatorie risultano correlati con i ceppi suini. I risultati di questo studio permettono di approfondire le caratteristiche genomiche dei ceppi circolanti nella popolazione suina e nei cinghiali, evidenziando una netta distinzione tra i ceppi isolati da cani adibiti ad attività venatoria, e quindi riconducibili al cinghiale, da quelli isolati da suini domestici.

Summary. This study reports the genomic characterization, based on partial sequencing of the UL44 and US8 genes, of 36 PRV strains isolated in Italy during 2000-2010. Out of these, 29 strains were isolated on swine farms and 7 originated from dogs. Phylogenetic analysis revealed that 26/29 swine strains were placed in cluster B in both phylogenetic trees of the UL44 and US8 genes and were closely related to the recent PRV strains isolated in Europe and America. One swine strain showed high homology to the old PRV strains isolated in the 70's and 80's. In the last twenty years, the presence of these strains are drastically reduced in the swine population whereas is prevalent in wild boars. The last two swine strains exhibited interesting features. The gG gene of these strains was closely related to the old PRV strains but their gE gene showed a high homology to the recent PRV strains. Regarding dog isolates, five of these were isolated from hunting dogs and exhibited a great correlation with PRV strains circulating in wild boars. The other two isolates were closely related to swine PRV strains and originated from dogs not used for hunting. These results provide interesting results about the genomic characterization of PRV strains circulating in the swine population and wild boars and reveal a clear differentiation between strains isolated from hunting dogs, which could be referable to the wild boars strains and those originated from domestic swine.

INTRODUZIONE

Il virus della pseudorabbia (PRV) è un alphaherpesvirus che causa la malattia di Aujeszky, una delle malattie che colpisce frequentemente l'allevamento suinicolo, causando gravi perdite economiche. Unico dal punto di vista antigenico, il virus della PRV ha un ampio spettro d'ospite ma gli unici reservoir dell'infezione sono i suini e i cinghiali.

Il genoma virale è costituito da una doppia catena lineare di Dna di lunghezza pari a 143 kb, suddiviso nelle due uniche regioni U_L (lunga) e U_S (corta) intervallate tra loro da due sequenze ripetute (IRS e TRS). Il virione è costituito da numerose proteine di cui 11, tutte glicosilate, sono presenti nell'envelope e sono coinvolte nella patogenesi dell'infezione e nell'induzione della risposta immunitaria. Alcune di queste, come gC e gE, influenzano la virulenza del ceppo, ma non sono importanti per la replicazione virale e hanno consentito lo sviluppo di vaccini deleti che permettono di differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati.

La glicoproteina gC è una importante componente dell'envelope virale che permette al virus di adsorbirsi alla cellula ospite, rappresenta il target verso cui è rivolta l'immunità umorale e cellulo-mediata (Katayama S. *et al.*, 1997) e, inoltre, è una delle regioni più variabili del genoma (Ishkawa *et al.*, 1996).

La glicoproteina gE è una componente dell'envelope che assieme alla glicoproteina gI forma un complesso espresso sulla superficie delle cellule infette ed è quella comunemente deleta nei ceppi vaccinali di PRV utilizzati in Europa. Recentemente, Fonseca *et al* (2010) hanno condotto uno studio di caratterizzazione genetica dei ceppi di PRV isolati in Brasile, amplificando una regione parziale dei geni che codificano per le glicoproteine dell'envelope gC e gE.

In Italia dal 1997 è in vigore il Piano nazionale di controllo della Malattia di Aujeszky (D.M: 1 aprile 1997) che prevede la vaccinazione obbligatoria di tutti i suini allevati con vaccini gE-deleti e l'applicazione di accurate misure di biosicurezza allo scopo di ridurre la prevalenza della malattia a livelli tali da essere compatibile con un successivo piano di eradicazione. Nonostante l'applicazione del piano abbia consentito, soprattutto nei primi 5 anni di attività, di ridurre notevolmente la sieroprevalenza, il virus è oggi ancora ampiamente diffuso negli allevamenti suini italiani con valori di prevalenza elevati (Alborali *et al.*, 2007). Inoltre, l'obbligo della profilassi vaccinale ha determinato una quasi completa eliminazione della sintomatologia clinica, ma non della circolazione del virus "da strada" responsabile di danni economici legati a riduzione delle performance riproduttive e degli incrementi ponderali.

In questo contesto, 36 ceppi di PRV isolati in Italia tra il 2000 ed il 2010 sono stati caratterizzati geneticamente attraverso la sequenza parziale dei geni UL44 e US8 che codificano rispettivamente per le glicoproteine gC e gE allo scopo di approfondire le caratteristiche genomiche dei ceppi PRV circolanti.

MATERIALI E METODI

Virus

Lo studio è stato condotto su 36 ceppi di PRV, 29 dei quali di origine suina e 7 di origine canina. I dati riguardanti i campioni conferiti sono riassunti nella tabella 1.

I virus sono stati isolati su monostrati confluenti di colture primarie di rene suino e su monostrati cellulari della linea continua PK15 partendo da matrici biologiche quali omoenati di pool di visceri e tessuto cerebrale. La presenza dell'antigene virale è stata evidenziata tramite ELISA sandwich con l'utilizzo di Ab monoclonali verso le glicoproteine gB e gE. (Brocchi *et al.*, 1990).

PCR

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit RNeasy (Qiagen, GmbH, Germania) seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice. Il DNA estratto è stato eluito in 30 μ l di H_2O nuclease-free e stoccato a -70°C sino ad utilizzo.

L'amplificazione è stata eseguita tramite PCR utilizzando due coppie di primers che amplificano rispettivamente sui geni UL44 e US8, secondo la metodica descritta da Fonseca *et al.* (2010). Di seguito sono riportate le sequenze dei primers e le dimensioni dei frammenti amplificati:

Primer	Sequenza primer (5'-3')	glicoproteina	regione	amplificati (bp)
gC-2U	GTTTCCTGATTACGCCCCACGC	gC	11-32	788
gC-1L	GAAGGGCTCACCGAAGAGGAC		821-841	
gE-nF	CCGCGGGCCGTGTTCTTTGT	gE	592-611	493
gE-nR	CGTGGCCGTTGTGGGTCAT		1066-1084	

Sequenziamento ed analisi filogenetica.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi di PRV è stata eseguita attraverso il sequenziamento parziale dei geni gC e gE. Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle dei ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 4.0 utilizzando il metodo del neighbor-joining (Tamura *et al.*, 2007).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi filogenetica del gene US8 ha suddiviso i ceppi italiani in due gruppi distinti (figura 1). La maggior parte di ceppi provenienti da allevamenti suini (28/29) formano parte del cluster B e presentano una elevata omologia tra loro e con i ceppi di riferimento brasiliano Nova Prata e belga 89V87. All'interno di questo gruppo si posizionano anche la maggior parte di ceppi suini isolati negli ultimi vent'anni in diversi paesi del continente americano ed europeo. Studi di caratterizzazione genomica condotti precedentemente, basati sull'utilizzo degli enzimi di restrizione (RFLP) e successiva comparazione con il sequenziamento (Fonseca *et al.*, 2010), hanno rilevato una correlazione tra il genotipo II evidenziato con la RFLP ed il cluster B. Da sottolineare anche la presenza in questo gruppo di un ceppo isolato da un cane (13814/07) di un allevamento suino venuto a morte con sintomatologia tipica, che presenta il 100% di omologia con la maggior parte dei ceppi suini italiani.

Il secondo gruppo identificato come cluster C, raggruppa tutti i restanti ceppi isolati da cane ed un solo ceppo suino del 2008, isolato da suinetti sottoscrofa di un allevamento di Mantova. Tutti i ceppi di cane appartenenti a questo gruppo sono stati isolati da animali con sintomatologia nervosa specifica utilizzati in attività venatoria e/o alimentati con residui di cinghiale (ad eccezione del numero 101452/10). A questo cluster, identificato recentemente da Fonseca *et al.* (2010), appartengono i ceppi suini di riferimento di origine belga NS374 ed 75V19 isolati negli anni 70 ed il ceppo brasiliano IB341/86 isolato nel 1986.

L'analisi filogenetica del gene UL44 ha evidenziato la presenza di una maggiore eterogeneità tra i ceppi PRV (figura 2). Come descritto per il gene US8, la maggior parte dei ceppi isolati da suino (26) ed il ceppo di cane 13814/07 si posizionano in un unico gruppo (cluster B) e presentano una elevata percentuale di omologia tra loro con il ceppo di riferimento Nova Prata (da 99,7% a 100%). Un altro gruppo omogeneo è rappresentato dai ceppi isolati da cani

da caccia e da un ceppo italiano del 1993 isolato da cinghiale (Capua *et al.*, 1997) a conferma di una probabile trasmissione dei ceppi tipici del cinghiale ai cani utilizzati nelle attività venatorie. Da sottolineare è inoltre la presenza di due ceppi suini isolati nel 2008 (97897/08 e 32501/08) geneticamente distinti dagli altri ed altamente correlati con il ceppo di cane 101452/10 ed il ceppo brasiliano 346/86.

Tra i ceppi studiati un solo ceppo suino (4742/00) isolato in un allevamento della provincia di Brescia è altamente correlato con il ceppo di riferimento nord irlandese NIA3 all'interno del cluster A. Sulla base di un precedente studio, questo cluster corrisponde al genotipo I evidenziato tramite RFLP, al quale sarebbe peraltro attribuiti i ceppi isolati negli anni 70 ed 80 (Capua *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 2010). Altri studi hanno riportato una quasi assente circolazione di ceppi appartenenti a questo genotipo dal 1990 in Europa ed in America (Capua *et al.*, 1997; Piatti *et al.*, 2001; Schaefer *et al.*, 2006) così come una minore virulenza di questi rispetto a quelli del genotipo II (Glorieux *et al.*, 2009). La maggiore virulenza dei ceppi del genotipo II è stata considerata una delle cause della drastica riduzione della circolazione del genotipo I nella popolazione suina. Questo invece non è avvenuto nella popolazione di cinghiale dove circolano soprattutto i ceppi genotipicamente correlati ai ceppi PRV degli anni 70-80. La nostra indagine ha confermato che i ceppi prevalentemente diffusi nella popolazione suina appartengono al genotipo II, ma ha anche rilevato la presenza di stipiti virali altamente correlati con i ceppi degli anni 70.

I risultati ottenuti dal presente studio hanno permesso di distribuire i ceppi di PRV italiani in clusters virali evidenziando una netta distinzione tra i ceppi isolati da cani adibiti ad attività venatoria, e quindi riconducibili al cinghiale, da quelli isolati da suini domestici. Ventisei ceppi isolati da suino appartengono per il gene gC e il gE al cluster B che raggruppa la maggior parte di ceppi PRV recentemente isolati da suini in Europa ed America. Un solo ceppo suino presenta una elevata correlazione con i ceppi PRV isolati negli anni 70-80, attualmente quasi scomparsi nella popolazione suina ma prevalenti nei cinghiali. I due ceppi suini restanti sono correlati ai ceppi PRV storici per quanto riguarda il gene gC mentre per il gene gE sono simili ai ceppi PRV recenti.

Dai 7 ceppi isolati da cane, 5 ceppi provengono da cani da caccia e presentano una elevata percentuale di omologia con i ceppi isolati da cinghiale. Un ceppo isolato da un cane di un allevamento suino è risultato altamente correlato con i ceppi suini recenti. L'ultimo ceppo 101452/10, isolato nel 2010 in provincia di Brescia, possiede il gene gC simile ai due ceppi suini sopra riportati. Non è stato possibile reperire molti dati anamnestici relativi a questo ceppo, tuttavia è stato isolato da un cane di piccola taglia venuto a morte a seguito di sintomatologia nervosa a fine Aprile 2010 dopo chiusura della stagione venatoria per il cinghiale.

Il 97% dei ceppi suini sono stati isolati in allevamenti localizzati nel Nord Italia, tuttavia possiamo considerare la situazione descritta rappresentativa della popolazione suina italiana in quanto in quest'area si concentra il 75% della suinicoltura.

Per approfondire maggiormente le informazioni ottenute da questo studio e allo scopo di meglio caratterizzare soprattutto quei ceppi che vengono classificati in cluster diversi, si ritiene necessario il sequenziamento di una porzione più ampia di genoma virale per confermare i risultati ottenuti.

BIBLIOGRAFIA

- Alborali L., Guadagnini G., Accini A., Zanoni ., Salogni C., Cordioli P. (2007) "Sieroprevalenza della malattia di Aujeszky in suini pesanti macellati in Pianura Padana". XXXIII Meeting annuale SIPAS, Modena 29-30 marzo, 283-287
- Brocchi E., Berlincani A., Callegari S., Gamba D., Civardi A. (1990) "Realizzazione di un test ELISA-competizione per distinguere animali infetti da virus di Aujeszky da animali"

vaccinati con ceppi GI-deleti” . Volume XLIV Atti della Società Italiana e delle Scienze Veterinarie., Stresa 27-29 settembre, 913-918

- Capua I., Casaccia C., Calzetta G., Caporale V. (1997) “Characterisation of Aujeszky’s disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995”. *Vet Microbiol.* 57, 143-149

- Fonseca Jr. A.A., Camargos F.M., Macedo de Oliveira A., Ciacci-Zanella J., Patricio M.A.C., Braga A.C., Cunha E.S., D’Ambros R., Heinemann M.B., Leite R. C., Pimenta dos reis J.K. (2010) “Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates”. *Vet Microbiol* 141, 238-245

- Glorieux S., Favoreel H.M., Meesen G., de Vos W., Van den Broeck W., Nauwynck H.J. (2009) “Different replication characteristic of historical pseudorabies virus strains in porcine respiratory nasal mucosa explants” *Vet. Microbiol.* 136(3-4),341-346

- Ishikawa K., Tsutsui M., Taguchi K., Saitoh A., Muramatsu M. (1996) “Sequence variation of the gC gene among pseudorabies virus strains”. *Vet. Microbiol.* 49, 267–272

- Katayama S., Okada N., Yoshiki K-i, Okab T., Shimizu Y. (1997) “Protective effect of glycoprotein gC-rich antigen pseudorabies virus”. *J Vet Med Sci* 59, 657-663

- Muller T., Klupp B.G., Freuling C., Hoffmann B., Mojcicz M., Capua I., Palfi V., Toma B., Lutz W., Ruiz-fon F., Gortarzar C., Hlinak A., Schaarschmidt U., Zimmer K., Coraths F.J., Hahn E.C., Mettenleiter T.C. (2010) “Characterization of pseudorabies virus of wild boar origin from Europe”. *Epidemiol. Infect.* 138,1590-1600

- Piatti R.M., Ikuno A.A., Cunha E. S., D’Ambros R., Gregori F., Soares R.M., Cortez A., Richtzenhain L.J. (2001) “Characterization of Aujeszky’s disease virus isolates from south and southeast Brazil by RFLP analysis”. *Braz. J. Microbiol.* 32, 144-146

- Schaefer R., Ciacci-Zanella J., Mores N., Kleitton A., Dambros R.M.F., Schiochet M.F., Coldebella M. (2006) “Characterization of Aujeszky’s disease virus isolates from South Brazil in the last twenty years by restriction enzyme analysis”. *Braz. J. Microbiol.* 37, 390-394

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) “MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0”. *Mol. Biol. Evolut.* 24, 1596–1599

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato all’interno del Progetto di Ricerca PRC2007009 “Strategie diagnostiche di controllo della malattia di Aujeszky con particolare riferimento a diversi fattori che influenzano negativamente l’esito del Piano di eradicazione” finanziato dal Ministero della Salute.

Si ringraziano per l’eccellente supporto tecnico le Sig.re Annamaria Tirelli e Sonia Manenti.

Tab.1 *Ceppi di PRV oggetto dello studio suddivisi per anno.***Tab.1** *PRV isolated strains used in this study.*

	Anno	Darwin	Provincia	Specie	Materiale
1	2010	28617	RE	Suino	cervello
2		101452	BS	Cane	cervello
3		325415	BO	Cane	cervello
4		325409	BO	Cane	cervello
5	2009	980	RE	Cane	cervello
6	2008	7145	BS	Suino	cervello
7		29652	MN	Suino	visceri
8		32501	BS	Suino	visceri
9		35155	BS	Suino	visceri
10		97897	MN	Suino	visceri
11		203379	RE	Cane	visceri
12		280666	BS	Suino	visceri
13	2007	13814	CR	Cane	cervello
14	2006	252504	BS	Suino	visceri
15	2004	249465	BO	Cane	visceri
16		261517	BS	Suino	polmoni
17	2003	32754	CR	Suino	feto
18		137181	BS	Suino	feto
19	2002	285	MO	Suino	polmoni
20		1317	LO	Suino	polmoni
21		24939	BG	Suino	feto
22		47586	BS	Suino	polmoni
23	2001	1993	BG	Suino	polmoni
24		2945	BS	Suino	polmoni
25		4028	MI	Suino	polmoni
26		8225	BN	Suino	cuore
27		15142	LO	Suino	feto
28		13038	BS	Suino	feto
29		14082	CN	Suino	polmoni
30		14096	BS	Suino	polmoni
31		14754	BG	Suino	visceri
32		2000	2580	MN	Suino
33	4058		BS	Suino	visceri
34	4742		BS	Suino	visceri
35	11719		FO	Suino	polmoni
36	12022		MO	Suino	polmoni

Figura 1 - Albero filogenetico costruito sulle sequenze del gene gE utilizzando il metodo del neighbor-joining. In grassetto sono evidenziati i ceppi di Prv sequenziati in questo studio. **Figure 1**- Phylogenetic tree based on the sequences of the gE gene using the neighbor-joining method. The PRV strains sequenced in this study are evidenced in bold type.

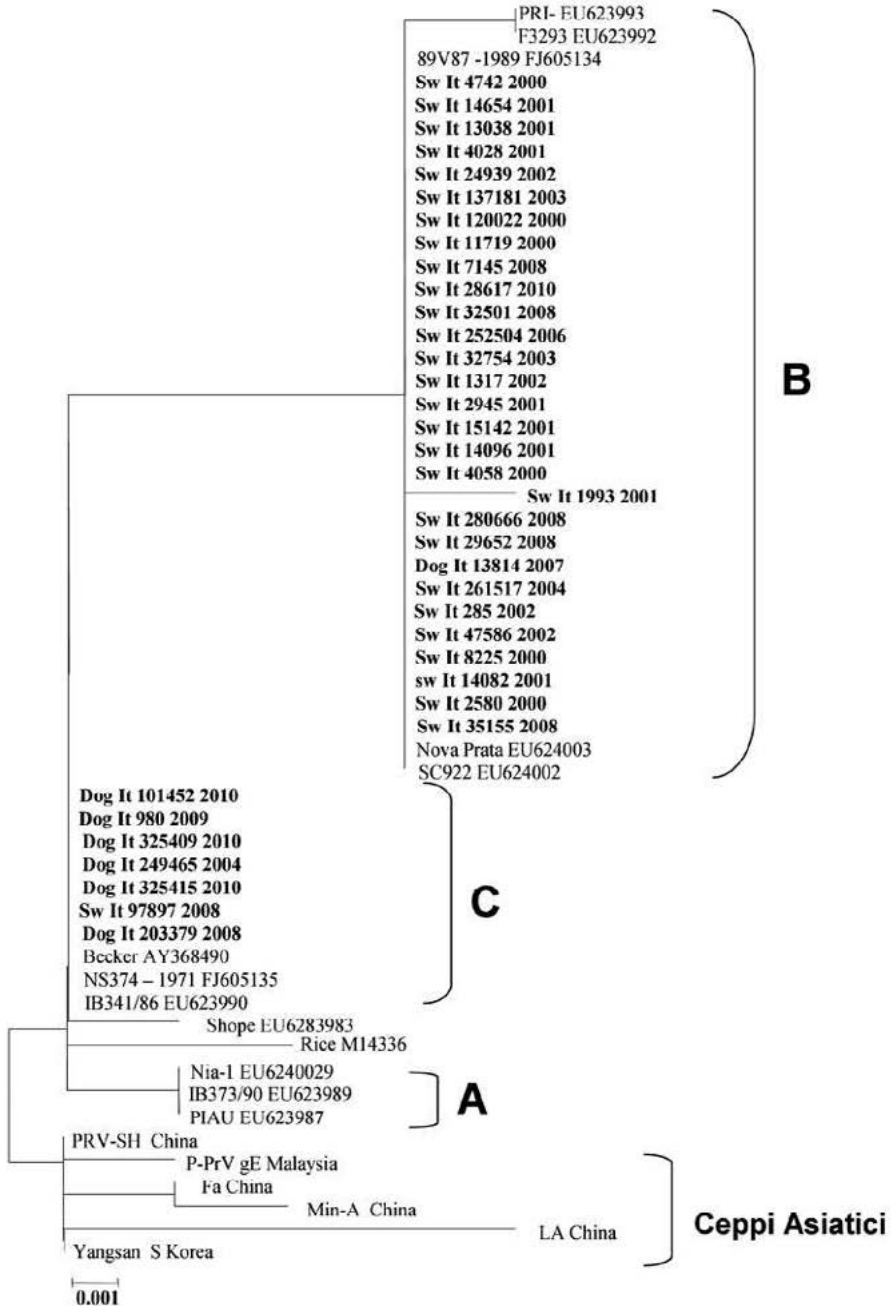


Figura 2. Albero filogenetico costruito sulle sequenze del gene gC utilizzando il metodo del neighbor-joining. In grassetto sono evidenziati i ceppi di Prv sequenziati in questo studio.
Figure 2. Phylogenetic tree based on the sequences of the gC gene using the neighbor-joining method. The PRV strains sequenced in this study are evidenced in bold type.

