

EPIDEMIOLOGIA DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 IN NORD ITALIA

EPIDEMIOLOGY OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 IN NORTHERN ITALY

LEGNARDI, M.¹, FRANZO, G.¹, CECCHINATO, M.¹, TUCCIARONE, C.M.¹,
SANDRI, G.P.², DRIGO, M.¹

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) - Università di Padova;*

²*Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi.*

Parole chiave: *Porcine circovirus type 3*; direct PCR; epidemiologia.

Key words: *Porcine circovirus type 3*; direct PCR; epidemiology.

Riassunto: La recente scoperta di *Porcine circovirus type 3* (PCV3) ha ravvivato l'interesse nei confronti dei membri del genere *Circovirus* nell'ambito della suinicoltura. Il suo riscontro in diverse regioni del mondo in animali afflitti da diverse condizioni cliniche ha generato una certa preoccupazione, sebbene il reale nesso causale non sia stato dimostrato. Nel presente studio sono state valutate, tramite l'applicazione di metodiche di biologia molecolare, la presenza e la diffusione di PCV3 nel nord Italia. La conoscenza di dati anamnestici, clinici e anatomopatologici, unita all'esecuzione di prove diagnostiche collaterali, ha permesso di valutare l'associazione fra l'infezione e la presenza di sindromi cliniche nonché la presenza di coinfezioni con altri patogeni. Complessivamente, è stato possibile dimostrare la rilevante presenza di PCV3 in Italia (30% dei campioni e 47,2% degli allevamenti testati). Il virus è stato inoltre rilevato in diverse matrici, inclusi il tessuto polmonare (17/39, 43,65%), pool di organi (10/29, 34,5%), sieri (6/33, 18,2%), fluido orale (2/8, 25%) e tamponi nasali (1/3, 33,3%). Tali evidenze lasciano intuire una distribuzione sistemica di PCV3, con una possibile predilezione per il polmone. Al contrario di quanto riportato da altri studi, il virus non è stato ritrovato in tessuti del tratto riproduttivo né in casi di aborto. Inoltre, non sono state riscontrate chiare associazioni con determinate sindromi cliniche né con altri patogeni. Sebbene la natura del campionamento impedisca di trarre delle conclusioni definitive, i risultati di questo progetto suggeriscono una certa cautela nell'inferire il ruolo patogenetico di PCV3 e impongono l'esecuzione di ulteriori studi per confermare o confutare questa ipotesi.

Abstract: The recent discovery of *Porcine circovirus type 3* (PCV3) has renewed the interest towards species belonging to the *Circovirus* genus and affecting the swine. PCV3 has been found in different parts of the world and has been linked to several clinical conditions, although its exact pathogenetic role has yet to be determined. In the present study, PCV3 presence and spread in Northern Italy have been evaluated by molecular biology assays. The knowledge of anamnestic, clinical and anatomopathological data, along with other diagnostic investigations, has allowed to evaluate the link between PCV3 infection and the presence of symptoms, and to highlight coinfections occurrence.

Shortly, it was demonstrated that PCV3 is largely circulating in Italy (30% of samples, as well as 47,2% of sampled farms, tested positive for this virus). PCV3 was detected in different matrices, such as lung tissue (17/39, 43,65%), pools of various organs (10/29, 34,5%), sera (6/33, 18,2%), oral fluids (2/8, 25%) and nasal swabs (1/3, 33,3%). These findings lead to suppose that PCV3 is characterized by a systemic distribution, with the

possibility of a preferential respiratory tropism. Contrary to what has been reported by other studies, PCV3 has not been found in reproductive system tissue nor in case of abortion. Furthermore, no meaningful association has been proven between PCV3 detection and the presence of clinical symptoms nor infection with other pathogens.

Despite the sampling nature has prevented from drawing definite conclusions, the results of this work suggest to proceed cautiously when inferring the pathogenetic role of PCV3 and highlight the necessity of further studies to confirm or reject this hypothesis.

INTRODUZIONE

La recente scoperta di *Porcine circovirus type 3* (PCV3), avvenuta per mezzo di analisi metagenomiche (Palinski et al., 2017), ha alimentato alcune preoccupazioni fra i veterinari di campo e attirato l'attenzione della comunità scientifica. Si tratta della terza specie appartenente al genere *Circovirus* in grado di infettare il suino dopo *Porcine circovirus type 1* (PCV1) e *Porcine circovirus type 2* (PCV2). Mentre l'importanza dell'apato geno PCV1 è marginale (Tombácz et al., 2014) a partire dagli anni '90 PCV2 è emerso come uno dei principali patogeni ad affliggere la produzione suinicola mondiale, causa di ingentissime perdite economiche dovute ad un complesso di malattie descritte collettivamente come *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD) (Alarcon et al., 2013). Per quanto riguarda PCV3, le conoscenze sulla sua epidemiologia sono ancora limitate. Descritto sinora in Cina (Ku et al., 2017) Stati Uniti (Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016) Corea (Kwon et al., 2017) e Polonia (Stadejek et al., 2017) questo virus è già stato associato a diverse manifestazioni cliniche tra cui disordini riproduttivi, miocarditi, infiammazioni multisistemiche, sindromi dermatite-nefrite e respiratorie, anche se non ne è ancora stato chiarito l'esatto ruolo patogenetico, sia esso presente da solo o in coinfezione (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Shen et al., 2017). Per questi motivi, e *in primis* per via dei molti punti di contatto con il ben più noto PCV2, l'importanza epidemiologica di PCV3 è potenzialmente notevole ma ancora tutta da provare.

In questo progetto si è ricercato PCV3 in campioni provenienti dalla routinaria attività diagnostica condotta da un'importante filiera produttiva del Nord Italia, con l'obiettivo di indagarne la presenza sul territorio, il possibile ruolo epidemiologico e i materiali biologici in cui è possibile ritrovarlo.

MATERIALI E METODI

Al fine di studiare l'epidemiologia di PCV3 sono stati selezionati 120 campioni, tutti precedentemente risultati positivi per altri patogeni (respiratori e non). I campioni, conservati a -80°C, risultavano prelevati tra il 2014 e il 2017 tra Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Piemonte e Friuli-Venezia Giulia, in 55 allevamenti appartenenti a diverse fasi di una filiera multisito, ed erano quindi rappresentativi di diverse categorie produttive.

Brevemente, i campioni inclusi nello studio comprendevano: tessuto polmonare, placentare e fetale (in caso di episodi di aborto), *pool* di diversi organi, sangue, fluidi orali, tamponi nasali, raschiati orofaringei e spugnette (utilizzate per il campionamento delle superfici degli automezzi per il trasporto animali).

I campioni si dividevano tra quelli prelevati nell'ambito della regolare attività di autocontrollo, per i quali non erano disponibili dati anamnestici precisi, e altri prelevati in presenza di un sospetto clinico.

Per ciascun campione sono state raccolte, quando disponibili, le seguenti informazioni:

- Anno di campionamento;
- Esito della PCR per la ricerca di PCV3;
- Matrice del campione;

- Posizione dell'allevamento campionato;
- Categoria produttiva ed età dell'animale;
- Motivo del prelievo;
- Presenza o meno di sintomatologia;
- Presenza o meno di reperti necroscopici;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), PCV2, *Swine influenza virus* (SIV), *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), *Mycoplasma hyorhinis* (Mhr), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Cornebacterium pyogenes*, *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) e *Bordetella bronchiseptica*;

Tutti i campioni sono stati successivamente testati per il rilevamento dell'infezione da PCV3, utilizzando una metodica di *direct PCR* precedentemente validata (Franzo et al., 2018).

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha previsto l'impiego dei software *R* (*R Core Team, 2016*) e *Microsoft® Excel®*, fissando il livello di significatività a $p < 0,05$.

RISULTATI

Le indagini diagnostiche hanno permesso di ricavare una buona quantità di informazioni sull'epidemiologia di PCV3, molte delle quali inedite.

Tra i 120 campioni analizzati, 36 (30%) sono risultati positivi per PCV3, dimostrando la presenza di questo virus in 26 dei 55 (47,2%) allevamenti testati (Figura 1).



Figura 1. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di PCV3.

Figure 1. Geographic distribution of PCV3 positivities.

La distribuzione delle positività per PCV3 nelle diverse categorie produttive è illustrata in Figura 2.

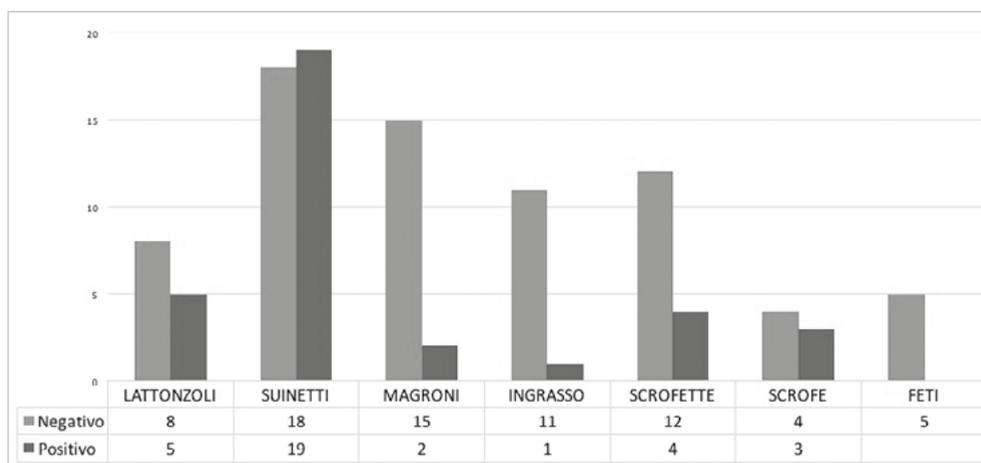


Figura 2. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di PCV3 divisi per categoria produttiva.

Figure 2. PCV3 test results count classified according to the different productive categories.

PCV3 è stato ritrovato in tessuto polmonare (17/39, 43,65%), pool di organi (10/29, 34,5%), sieri (6/33, 18,2%), fluido orale (2/8, 25%) e tamponi nasali (1/3, 33,3%); le 4 spugnette, l'unica placenta e il singolo raschiato orofaringeo testati si sono rivelati tutti negativi.

PCV3 è stato riscontrato in coinfezione con PRRSV, PCV2, SIV, *Streptococcus suis*, Mhyo, Mhr, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Corinebacterium pyogenes* (Figura 3). In nessuno dei campioni positivi per PCV3 erano stati ricercati PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

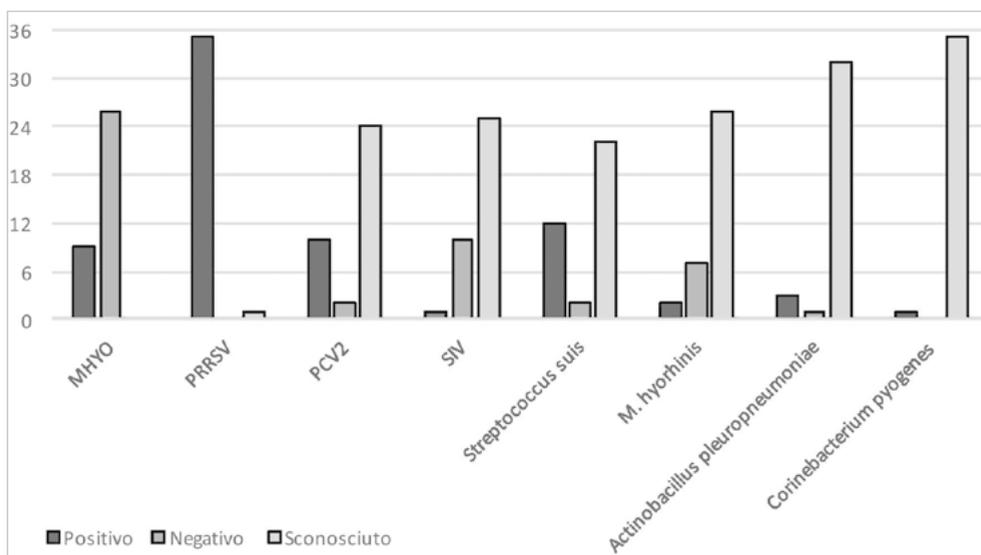


Figura 3. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di PCV3.

Figure 3. Count of test results for different pathogens in PCV3-positive samples.

PCV3 è stato ritrovato in presenza di sintomi respiratori (12/28, 42,8%) e sistemici (3/14, 21,4%), ma non riproduttivi (0/7, 0%), mentre le altre 21 positività sono state attestate in assenza di segni clinici.

In 18 dei 43 casi in cui era segnalata la presenza di lesioni broncopolmonari è stato possibile dimostrare la presenza di PCV3.

DISCUSSIONE

La recente scoperta di PCV3 e la sua identificazione in diversi stati rappresentano sicuramente una rilevante novità nel panorama della suinicoltura. Il ritrovamento di questo virus in animali affetti da sintomatologia e lesioni di vario tipo, seppur non sufficiente a dimostrarne il reale ruolo patogenetico, lo configura come una potenziale minaccia, e, conseguentemente, come un necessario target di approfonditi studi epidemiologici.

Le positività riscontrate nel presente studio non si sono limitate ad un rinvenimento sporadico, ma evidenziano come PCV3 sia ampiamente diffuso nonostante la recentissima scoperta. Sebbene non sia possibile inferire la prevalenza per via della natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza, PCV3 è stato ritrovato nel 30% dei campioni: un dato sorprendente, il quale non fa che corroborare l'ipotesi che questo microrganismo sia epidemiologicamente affine a PCV2, patogeno ubiquitario e nella maggior parte dei casi non associato a sintomatologia clinica (Alarcon et al., 2013).

La distribuzione di PCV3 nelle diverse fasce d'età e nei diversi siti produttivi non risulta trattata negli studi svolti finora su questo microrganismo. I dati raccolti nell'ambito di questo progetto mostrano un picco statisticamente significativo (con un 51% di positività) in corrispondenza del periodo tra la quinta e l'ottava settimana di vita: ciò è probabilmente collegato al rimescolamento e allo stress a cui sono sottoposti i suinetti al momento dello svezzamento, un momento particolarmente critico in termini di pressione infettante e di capacità di risposta dell'animale. Il limitato numero di soggetti infetti durante le primissime settimane di vita e la progressiva decrescita dell'incidenza fino all'8% riscontrato in fase di ingrasso rende plausibile ipotizzare che gli animali acquisiscano, passivamente o attivamente, un'immunità in grado di contrastare efficacemente l'infezione; non è inoltre da escludere che l'organizzazione tipicamente multisito della filiera da cui provenivano i campioni contribuisca a combattere la trasmissione orizzontale. Il fatto che sia nelle scrofe sia nei lattonzoli si sia rinvenuto PCV3 porta a speculare sulla possibilità di una qualche forma di trasmissione verticale, sebbene il mancato rilevamento del virus in tessuti fetali non permetta di stabilire se questa trasmissione avvenga a livello intrauterino, come suggerito da precedenti studi che hanno evidenziato PCV3 in presenza di turbe riproduttive (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS, o se invece interessi il periparto. Le informazioni raccolte delineano un quadro epidemiologico che ancora una volta presenta punti di contatto con PCV2.

Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative fra diverse matrici per quanto concerne il ritrovamento di PCV3. Tuttavia, è stato possibile osservare un eccesso di positivi rispetto alle frequenze attese relativamente al tessuto polmonare. Sebbene il semplice riscontro di positività in PCR non permetta di definire con precisione il reale tropismo del virus, i dati ottenuti lasciano intuire una distribuzione sistemica del virus, con una potenziale predilezione per il polmone. Mentre il rilevamento di PCV3 tramite PCR a partire da siero, polmone e altri organi è già stato riportato (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) la possibilità di amplificarne il DNA a partire da fluidi orali e tamponi nasali rappresenta un dato inedito. È inoltre interessante notare come le PCR condotte a partire da campioni di materiale fetale o sangue materno collegati ad episodi di aborto non abbiano

evidenziato in nessuno dei 7 casi la presenza di PCV3, a differenza di quanto riportato da altri autori (Palinski et al., 2017).

La natura del campionamento si è rivelata un ostacolo nell'elaborazione dei dati relativi alle coinfezioni. Tutti i campioni erano infatti positivi almeno a uno tra PRRSV e PCV2, e l'intensità con cui i vari patogeni erano stati ricercati risultava estremamente variabile. Nella maggior parte dei casi ci si è quindi dovuti limitare a statistiche puramente descrittive. Attualmente non è disponibile alcun dato inerente alle interazioni tra PCV3 e altri patogeni, quindi tutte le informazioni ottenute in merito alle coinfezioni sono da considerarsi inedite. La frequenza di rinvenimento di PCV3 nei campioni positivi per PRRSV si è rivelata maggiore rispetto alle attese, tanto da essere statisticamente significativa (Figura 4). Tuttavia, per quanto sopra menzionato, l'accertamento del significato eziopatogenetico di questa associazione necessita di ulteriori studi sperimentali.

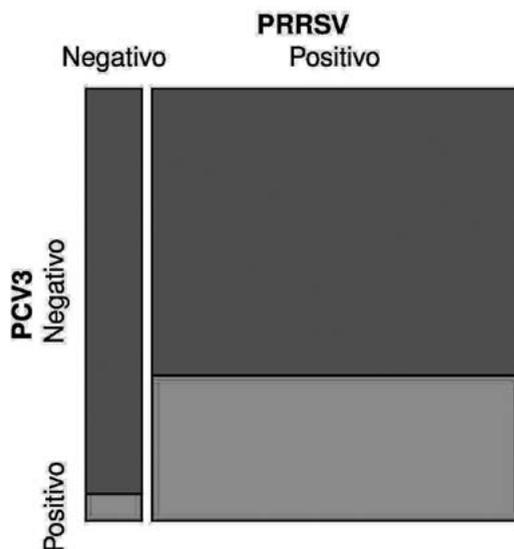


Figura 4. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 e PRRSV.

Figure 4. *Mosaic plot* that shows the relationship between PRRSV and PCV3 test results.

Il ritrovamento di PCV3 è stato più frequente rispetto alle attese in campioni negativi per PCV2, ma ancora una volta si tratta di una differenza non statisticamente significativa. Per quanto suggestiva, l'eventualità che esista una competizione di qualche tipo tra PCV3 e PCV2 è ancora tutta da provare.

La frequenza con cui PCV3 è stato rinvenuto risulta maggiore rispetto alle attese in campioni prelevati in soggetti sintomatologici e in reperti necroscopici patologici. Queste differenze non si sono tuttavia rivelate significative dal punto di vista statistico e, alla luce della natura del campionamento, non è possibile affermare che siano dovute a fondate ragioni eziopatogenetiche; più facile è supporre che le differenze osservate siano dovute almeno in parte all'effetto confondente della matrice, dato che spesso alla presenza di sintomi e lesioni respiratorie corrispondevano campioni prelevati a livello polmonare, in cui PCV3 è stato ritrovato più frequentemente rispetto ad altre matrici.

Parallelamente allo svolgimento dei saggi di PCR, si è deciso di sequenziare il genoma completo di PCV3 a partire da uno dei campioni risultati positivi. Ciò è stato fatto con una doppia finalità: da una parte confermare la specificità del metodo, dall'altra ricavare la sequenza di un isolato di PCV3 circolante sul suolo italiano.

La sequenza ottenuta, seppur chiaramente interna allo stesso *clade* raggruppante gli altri genomi conosciuti di PCV3 (Figura 5), risulta diversa da quelle attualmente note. Particolarmente importante è la distanza genetica dalla sequenza 29160, dalla quale è stato ricavato il controllo positivo utilizzato in questo lavoro, attestante l'assenza di false positività dovute a cross-contaminazioni.

L'evidente diversità genomica tra i diversi isolati, unitamente ad una circolazione attestata in diversi contesti geografici, supporta l'ipotesi che le radici della storia evolutiva di PCV3 antecedano grandemente la sua scoperta, contribuendo ad accomunare una volta di più questo virus emergente con PCV2.

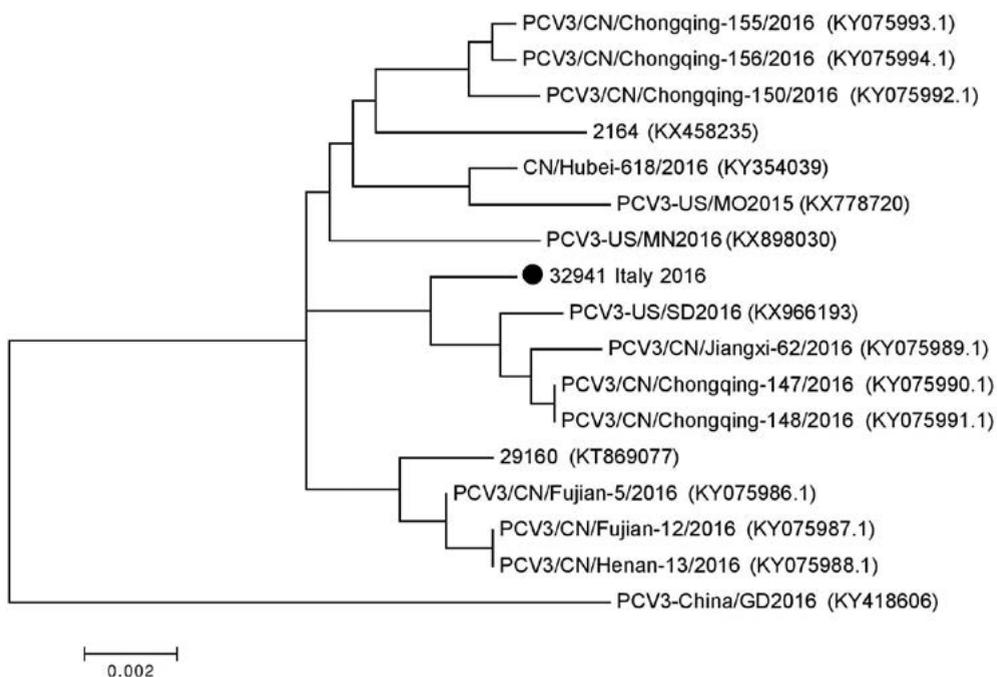


Figura 5. Albero filogenetico raggruppante tutte le sequenze di PCV3 conosciute. La sequenza evidenziata (cerchio nero) è stata ottenuta a partire dal campione 32941. L'albero è stato costruito con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016) applicando il metodo di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei, a sequenze precedentemente allineate con il metodo *MUSCLE*.

Figure 5. Phylogenetic tree including all available PCV3 sequences. The highlighted sequence (full circle) has been obtained by sequencing sample 32941. The tree was built with MEGA7 software (Kumar et al., 2016), by applying the *Maximum Likelihood* approach based on Tamura-Nei model on sequences that were aligned with *MUSCLE*.

CONCLUSIONI

L'applicazione di metodiche di biologia molecolare precedentemente validate ha permesso una significativa, seppur preliminare, analisi dell'epidemiologia di PCV3 nel Nord Italia, la quale si aggiunge al numero in rapida crescita di segnalazioni provenienti da varie parti del mondo (Kwon et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Stadejek et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS).

Le numerose positività riscontrate ne hanno dimostrato l'ampia circolazione nel territorio, la quale rappresenta solo uno dei molti aspetti in comune tra la sua epidemiologia e quella dell'ubiquitario PCV2.

Tra le altre informazioni ricavate si annoverano la presenza di un picco di frequenze di PCV3 in soggetti dall'età compresa tra le 5 e le 8 settimane, il rinvenimento a partire da matrici mai testate sinora e la presenza in coinfezione con vari patogeni sia virali che batterici; è stata inoltre attestata un'associazione statisticamente significativa tra le positività per PCV3 e quelle per PRRSV. Per una piena comprensione del significato di questi risultati, e quindi della reale importanza eziopatogenetica di PCV3, saranno ovviamente necessari ulteriori studi sperimentali, scevri dalle limitazioni che hanno connotato questo progetto, legate essenzialmente alla natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza.

In un simile contesto, degno di nota è anche l'avvenuto sequenziamento, a partire da uno dei campioni rivelatisi positivi, di un genoma completo di PCV3, il quale risulta diverso da tutte le altre sequenze attualmente disponibili. Ciò fa propendere fortemente per l'ipotesi che la storia evolutiva di PCV3 abbia radici molto più antiche rispetto alla sua scoperta: si tratta dell'ennesima somiglianza con PCV2, la cui circolazione è stata dimostrata antecedere di decenni l'improvvisa affermazione di questo virus come patogeno su scala globale (Segalés et al., 2013).

I dati raccolti rappresentano quindi un promettente punto d'inizio per lo studio di questo microorganismo emergente.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B. (2013) "Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model". *Prev. Vet. Med.* 110, 88–102.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q. (2017) "Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 3 Strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, Isolated from China". *Genome Announc.* 5, e00100-17.
- Fournié, G., Kearsley-Fleet, L., Otte, J., Pfeiffer, D.U. (2015) "Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agents". *Vet. Res.* 46, 114.
- Franzo, G., Legnardi, M., Centelleghè, C., Tucciarone C.M., Cecchinato, M., Cortey, M., Segalés, J., Drigo, M. (2018) "Development and validation of direct PCR and real-time quantitative PCR assays for the rapid, sensitive, and economical detection of porcine circovirus 3 (PCV3)". *J. Vet. Diagn. Invest.*, In press.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q. (2017) "Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China". *Transbound. Emerg. Dis.* 64(3), 703-708.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets". *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kwon, T., Yoo, S.J., Park, C.-K., Lyoo, Y.S. (2017) "Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations". *Vet. Microbiol.* 207, 178–180.

- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M. (2017) "A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure". *J. Virol.* 91, e01879-16.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., Delwart, E. (2016) "Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation". *Virol. J.* 13, 184.
- Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013) "The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?" *Vet. Microbiol.* 165, 13–20.
- Shen, H., Liu, X., Zhang, P., Wang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liang, P., Song, C. (2017) "Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China". *Transbound. Emerg. Dis.* 65(1), 264-266.
- Stadejek, T., Woźniak, A., Milek, D., Biernacka, K. (2017) "First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland". *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1350–1353.
- Team, R.C., 2016. R Language Definition.
- Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S., Werling, D. (2014) "Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart". *Genome Announc.* 2(2), e00156-14.