

CARATTERIZZAZIONE DI MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TIPO 3 DURANTE UN FOCOLAIO DI PED NELLA REGIONE VENETO

CHARACTERIZATION OF MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TYPE 3 DURING A PED OUTBREAK IN VENETO REGION

CAVICCHIO L.¹, ZAMPERIN G.¹, TASSONI L.¹, MION M.¹, RIZZO G.¹, MILANI A.¹, SALVIATO A.¹, TONON F.², BEATO M.S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD); ²Suivet, Padova.

Parole chiave: Suini, MRV, PED

Key words: Swine, MRV, PED

Riassunto: I Mammalian Orthoreovirus (MRV) sono virus ad RNA a doppio filamento segmentato, appartenenti alla famiglia *Reoviridae*. Gli MRV sono in grado di infettare diverse specie di mammiferi, incluso uomo, pipistrello e suino, causando infezioni asintomatiche o respiratorie o gastroenteriche. Sono stati identificati tre sierotipi: MRV1, MRV2, MRV3. Tale suddivisione è strettamente legata al gene S1, coinvolto nell'adesione del virus alla cellula ospite e nel tropismo tissutale. MRV3 è stato rilevato in suini con sintomi gastroenterici e diarrea in Cina e Corea del Sud e nel 2014 negli USA, durante focolai di diarrea epidemica suina (PED). La prima segnalazione di MRV3 in suini in Europa (2015) avviene durante un focolaio di PED in Italia (Lombardia). Nel presente studio riportiamo l'isolamento e la caratterizzazione genetica, mediante approccio metagenomico, di MRV3, durante un focolaio di PED in Veneto, nel 2016. La sequenza del gene S1 mostra una correlazione con MRV isolati da suino in Lombardia nel 2015, da uomo in Slovenia nel 2013 e in Svizzera nel 2018, da pipistrelli in Italia nel 2012. Per tutti gli altri segmenti, l'MRV3 identificato in Veneto mostra una maggiore omologia con i ceppi di origine suina ed umana. Data l'importanza della PED per il settore suino, è necessario approfondirne l'associazione con MRV. Inoltre, l'identificazione di MRV correlati a ceppi umani e di pipistrello evidenzia la necessità di condurre studi sul potenziale zoonotico di tale virus.

Abstract: Mammalian Orthoreoviruses (MRV) are segmented dsRNA viruses belonging to the *Reoviridae*. MRVs can infect a variety of mammalian species, including humans, bats and swine, causing asymptomatic, respiratory, or gastroenteric infections. Three MRV serotypes have been identified, MRV1, MRV2 and MRV3. This distinction is strictly related to the S1 gene segment, responsible for virus attachment and tissue tropism. MVR3 was detected in swine showing gastro-enteric signs and diarrhea in China and South Korea, and, in 2014, in USA, during Porcine Epidemic Diarrhea (PED) outbreaks. The first detection of swine MRV3 in Europe was in 2015 during severe PED outbreaks in Italy (Lombardia region). Here we report the isolation and genome characterization, by metagenomics approach, of MRV3 detected during a PED outbreak in Veneto region, in 2016. The obtained S1 sequence showed correlation with MRV3 isolated in 2015 in Lombardia, with strains from Italian bats detected in 2012, with MRV3 from a child with acute gastroenteritis detected in Slovenia in 2013 and a MRV3 from an immunocompromised child from Switzerland (2018). For all the other genes, the 2016 MRV isolate shows a higher genetic similarity with other swine and human MRV strains. Given the importance of PED for the pig industry, it would be crucial to investigate the association with MRV. Moreover, the detection of an MRV3 with high homology to human and bat isolates warrants further studies on the zoonotic potential of such virus.

INTRODUZIONE

I Mammalian Orthoreovirus (MRV) sono virus ad RNA a doppio filamento appartenenti alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orthoreovirus*. Il nome *Reovirus* deriva dall'acronimo inglese "Respiratory Enteric Orphan Virus" utilizzato per la prima volta negli '50 per definire un gruppo di virus che occasionalmente si isolavano dal tratto respiratorio ed enterico di pazienti con lievi sintomi respiratori o gastrointestinali (1). I virus appartenenti al genere *Orthoreovirus* sono suddivisi in 5 specie in base al tipo di ospite che sono in grado di infettare: Reptalian *Orthoreovirus*, Avian *Orthoreovirus*, Pteropine *Orthoreovirus*, Baboon *Orthoreovirus* e Mammalian *Orthoreovirus*. Questi virus infatti si riscontrano in rettili, uccelli, piante, funghi, protozoi, mammiferi incluso l'uomo (2). Privi di envelope, a simmetria icosaedrica, hanno dimensioni attorno agli 80 nm e sono quindi ben visibili al microscopio elettronico. Sono suddivisi in fusogenici e non fusogenici in base al tipo di effetto citopatico che sono in grado di causare: i ceppi fusogenici sono in grado di portare alla formazione di grandi sincizi plurinucleati (1). Il genoma, degli MRV, di circa 23000bp, è costituito da 10 segmenti genici suddivisi in base alle dimensioni: 3 segmenti Large (L) da circa 3800bp, 3 Medium da circa 2200 bp (M), 4 Small (S) da circa 1100bp ciascuno. A causa del genoma segmentato, all'interno degli MRV si riscontrano frequentemente genotipi ricombinanti o riassortanti (1). Gli MRV, in base all'attività neutralizzante degli antisieri e all'attività di inibizione dell'emoagglutinazione, sono classificati in tre differenti sierotipi: MRV1, MRV2, MRV3, (4). Tali capacità sembrano essere connesse al gene S1, codificante una proteina capsidica (σ 1), responsabile dell'adesione del virus ai recettori cellulari e legata quindi al tropismo tissutale. In relazione alla classificazione filogenetica basata sul segmento S1, sono stati individuati dei ceppi prototipo: Tipo 1 Lang – T1L, Tipo 2 Jones – T2J, Tipo 3 Dearing – T3D e Tipo 3 Abney – T3A, recentemente è stato proposto un ulteriore sierotipo, Tipo 4 Ndelle – T4N (5). Gli MRV hanno una vastissima distribuzione geografica e sono teoricamente in grado di infettare tutti i tipi di mammiferi, in particolare sono stati riscontrati nel suino, nel pipistrello e nell'uomo dove sono stati associati ad infezioni sia asintomatiche che sintomatiche (1, 6, 7, 8, 9). Tuttavia, negli ultimi anni, gli MRV sono stati spesso descritti come l'unico agente patogeno in ospiti affetti da gravi enteriti emorragiche, acute infezioni respiratorie ed encefaliti. La trasmissione degli MRV avviene non solo attraverso un contatto diretto ma anche per via indiretta, ad esempio tramite il consumo di acqua o cibo contaminati; inoltre l'elevata capacità del virus di persistere al di fuori dell'ospite e la presenza ubiquitaria nell'ambiente, rendono gli MRV importanti virus a potenziale zoonosico (9). Recentemente, sono stati segnalati casi di diarrea neonatale e sintomatologia nervosa in bambini, associati ad MRV di tipo 2 e 3 in Europa, Asia e Nord America (1, 6, 10). In uno studio condotto nel 2011, si ipotizza che un nuovo ceppo di MRV2 umano isolato in America sia originato da fenomeni di riassortimento tra ceppi umani e suini (1). Nel 2013, in Slovenia, un MRV1 avente un'elevata omologia per il gene S1 con gli MRV isolati da pipistrelli europei, è stato rilevato come unico agente eziologico di gastroenterite in un bambino di 17 mesi (9). Le prime sequenze disponibili per MRV isolato da suino risalgono al 1998 (Austria). Successivamente è stato riscontrato in Cina, Corea del Sud, USA, Italia (8, 11, 12, 13,14). Nella maggioranza dei casi si tratta di ritrovamenti di MRV3 in suini con problemi respiratori, gastroenterici e diarrea associati ad altri patogeni intestinali. Nel 2014, MRV3 è stato rilevato in Nord America in concomitanza di focolai di PED (Porcine Epidemic Diarrhea) (13). Il ceppo americano presenta un'elevata omologia con MRV3 identificati in pipistrelli europei ed è stato dimostrato essere in grado di causare patologia gastroenterica a seguito di infezione sperimentale di suinetti. In Italia, MRV3 è stato identificato in feci di suino durante focolai di PED in Lombardia nel 2015 (8). L'analisi di sequenza del ceppo italiano ha rilevato un'elevata similarità del gene S1 con quello di ceppi MRV3 identificati in pipistrelli in Italia

e in casi di gastroenterite acuta infantile segnalati in Slovenia nel 2013 e in Svizzera nel 2018 (9, 11). Il presente lavoro descrive l'identificazione e la caratterizzazione di un ceppo di MRV3 riscontrato nel 2016 in un allevamento di suini in Veneto, nella provincia di Treviso, durante un focolaio di PED.

MATERIALI E METODI

Nel Febbraio 2016 in provincia di Treviso, nella regione Veneto, sono stati riscontrati dei casi di gastroenterite in un allevamento a ciclo chiuso di circa 180 capi. Gli episodi di diarrea sono stati osservati in suini da ingrasso per 5-6 giorni senza che vi fosse alcuna mortalità; sono quindi stati prelevati 6 campioni di feci da 6 animali diversi. Tutti i campioni sono stati testati mediante Real time RT-PCR per la ricerca del virus PED (RealPCR PEDV/PDCoV Multiplex RNA Test (IDEXX)). Un grammo di ciascun campione di feci è stato diluito ed omogenizzato in 9ml di Phosphate Buffered Saline (PBS) contenente antibiotici (10000 UI/ml di penicillina G, 100mg/ml di streptomycin, 50000 UI/ml nistatina, 2,5 mg/ml gentamicina solfato), e chiarificato mediante centrifugazione a 400xg per 10 minuti. Gli omogenati sono quindi stati utilizzati per inoculare monostrati confluenti di cellule VERO (African green monkey kidney). Le cellule vero sono state coltivate in terreno di crescita costituito da Minimal Essential Medium (MEM) con l'aggiunta di 0,25µg/ml di amfotericina e 0,05µg/ml gentamicina. I monostrati, dopo l'eliminazione del terreno di crescita, sono stati inoculati per adsorbimento con i campioni in esame e terreno di post-inoculazione ovvero MEM addizionato con brodo di triptosio fosfato (0,3%), estratto di lievito (0,02%), e tripsina 5µg/ml. I monostrati sono stati incubati a 37°C a 5% di CO₂ per due ore e successivamente osservati, quotidianamente per 6 giorni, in modo da rilevare l'eventuale insorgenza di effetto citopatico. In assenza di effetto citopatico sono stati effettuati due passaggi ciechi per confermarne la negatività. Il surnatante delle colture con effetto citopatico è stato sottoposto ad osservazione mediante microscopio elettronico. L'RNA delle medesime colture è stato estratto mediante il kit Cador Pathogen mini kit (QIAGEN) seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso. L'RNA estratto dalle colture cellulari e l'RNA estratto dai campioni di feci sono stati analizzati mediante RT-PCR avente come target una regione conservata del gene L1 dei MRV (7). I campioni positivi per L1 sono stati testati mediante un RT-PCR specifica per MRV3 avente come target una regione del gene S1 (7). In entrambi i casi è stato utilizzato il kit One step RT-PCR (QIAGEN) secondo le istruzioni d'uso e una concentrazione dei primers pari a 0,4 µM. Una delle colture avente effetto citopatico è stata scelta per l'analisi con approccio metagenomico, mediante Illumina MiSeq. L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA a singolo filamento usando esameri random e l'enzima SuperScript III RT kit (Invitrogen) seguendo le indicazioni suggerite dalla ditta produttrice; il cDNA a doppio filamento è stato ottenuto utilizzando il kit Second strand cDNA synthesis (NewEnglandBiolabs). Le read sono state qualitativamente filtrate e, tramite analisi metagenomica, e sono state selezionate solamente quelle riconducibili alla famiglia dei Reoviridae. Poiché gli orthoreovirus hanno un genoma formato da 10 segmenti, le read selezionate sono state allineate tramite BLAST contro il database NT. Gli allineamenti sono stati controllati manualmente in modo da assegnare le read a 10 gruppi diversi, ognuno dei quali rappresenta uno dei 10 segmenti genici. Le read di ogni gruppo sono state indipendentemente assemblate con approccio de novo tramite IDBA-UD e GapFiller per produrre il segmento corrispondente. Infine le read selezionate sono state allineate tramite BWA contro i 10 segmenti prodotti e il risultato è stato manualmente controllato con Tablet. Gli allineamenti sono stati generati mediante Clustal W, mentre gli alberi filogenetici sono stati costruiti mediante Neighbor-joining utilizzando il software MEGA5.2, con un'analisi di bootstrap da 1000 repliche e Maximum Likelihood come modello di sostituzione nucleotidica.

RISULTATI

Tutti i campioni di feci sono risultati positivi per PED e negativi mediante RT-PCR avente come target il segmento L1 di MRV. E' stato possibile osservare un effetto citopatico, al secondo passaggio in cellule VERO per 2 dei 6 campioni di feci, al terzo passaggio per 2 campioni, al quarto passaggio per 1 campione e solo 1 campione di feci è risultato negativo all'isolamento virale. Nel caso di positività è stato possibile osservare la completa distruzione del monostrato cellulare senza la formazione di strutture sinciziali. La microscopia elettronica, effettuata sul surnatante delle cellule infettate mostranti effetto citopatico, ha rilevato la presenza di numerose particelle virali con simmetria icosaedrica e prive di envelope, compatibili quindi con la struttura morfologica di *Reoviridae*. Le colture cellulari sono risultate positive mediante RT-PCR avente sia target L1 che S1 tipo 3. Di tutti i segmenti genici è stato possibile ottenere la sequenza completa di un campione di coltura cellulare rappresentativo. Il segmento S1 presenta inoltre un grado di similarità con le sequenze di ceppi isolati da pipistrelli italiani e da casi umani in Slovenia e Svizzera del 98%, mentre i restanti segmenti genici presentano una maggiore similarità con virus suini e umani con percentuali dal 90 al 94%. Le sequenze ottenute mostrano una correlazione non elevata del ceppo isolato in Veneto (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016) con quello isolato in Lombardia nel 2015 (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015), i segmenti più simili S1, L1 ed L3 hanno percentuali di similarità rispettivamente del 96,7 %, 94,8%, 94,6% (Figura 1). Per la costruzione degli alberi filogenetici sono state utilizzate tutte le sequenze di MRV presenti in Genbank, ad eccezione degli alberi relativi al gene S1 per cui ci si è limitati alle sole sequenze di MRV3. L'analisi filogenetica suggerisce per il segmento S1 la presenza di 3 gruppi monofiletici all'interno di MRV3: un primo gruppo costituito dai ceppi Asiatici, prevalentemente di origine suina, un secondo gruppo costituito dai ceppi Americani e Canadesi, e un terzo gruppo che comprende tutti i ceppi europei isolati da pipistrello (Figura 2). Entrambi i ceppi italiani e il ceppo Americano isolati da suino appartengono a quest'ultimo gruppo. L'analisi effettuata sul segmento L2, sembra invece correlare il virus caratterizzato con i virus isolati da suini in Cina nel 2011.

DISCUSSIONE

Il presente studio conferma la presenza di MRV3 in associazione a PED nel territorio italiano. Simile associazione era già stata riscontrata negli USA nel 2014. MRV è inoltre spesso associato con altri virus enterici in suini che presentano diarrea (15). I meccanismi alla base dell'associazione di MRV e PED risultano incompresi e di difficile definizione. L'evidenza che MRV3 sia in grado sperimentalmente di causare sintomatologia gastroenterica (13), potrebbe far ipotizzare che la sintomatologia osservata durante focolai di PED possa essere esacerbata da MRV, quando presente. Tutti i ceppi MRV fino ad ora riscontrati in associazione con PED, il ceppo americano del 2014 e i due italiani del 2015 e 2016, mostrano una correlazione del gene S1, con ceppi di MRV isolati da pipistrelli europei. L'omologia genetica del gene S1 di MRV3 di suino identificati in Italia con virus circolanti nella popolazione di chiroterri italiana, suggerisce un possibile meccanismo di trasmissione inter-specie suino-pipistrello, come ad esempio già osservato per i Nipah virus. I due ceppi italiani ad eccezione del gene S1, risultano diversi tra loro. Tuttavia l'analisi filogenetica evidenzia come i due ceppi clusterizzino insieme per i geni S1, S2, S4, M1, L1, L3 suggerendo che per questi segmenti possano condividere un progenitore comune. L'assenza di dati sulla distribuzione di MRV nella popolazione suina, e la carenza di informazioni sulla diversità genetica di MRV isolati da suino e da pipistrello in Italia e in Europa, non permettono di avanzare ipotesi in merito ai meccanismi di trasmissione inter-specie suino-pipistrello.

CONCLUSIONE

Il ruolo di MRV (1, 2 e 3) nella patologia dei disturbi gastroenterici nei suini necessita ulteriori approfondimenti. In particolare la co-circolazione di MRV3 e PED andrebbe studiata maggiormente per comprendere il meccanismo alla base di tale co-infezione. A tal fine, la presenza di MRV3 dovrebbe essere indagata durante i focolai di PED.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC 17/16).

BIBLIOGRAFIA

1. Ouattara L.A., Barin F., Barthez M.A., Bonnaud B., Roingeard P., Goudeau A., Castelnau P., Vernet G., Paranhos-Baccalà G., Komurian-Pradel F. (2011) "Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy." *Emerg Infect Dis.* 17, 1436-1444.
2. Duncan R. (1999) "Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreovirus: a species proposal." *Virology.* 260, 316-328.
3. Day J.M. (2009) "The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides." *Infect Genet Evol.* 9, 390-400.
4. Rosen L. (1960) "Serologic grouping of reoviruses by hemagglutination-inhibition." *Am J Hyg.* 71, 242-9.
5. Attoui H., Biagini P., Stirling J., Mertens P.P., Cantaloube J.F., Meyer A., de Micco P., de Lamballerie X. (2001) "Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae." *Biochem Biophys Res Commun.* 287, 583-8.
6. Tyler K.L., Barton E.S., Ibach M.L., Robinson C., Campbell J.A., O'Donnell S.M., Valyi-Nagy T., Clarke P., Wetzel J.D., Dermody T.S. (2004) "Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis." *J Infect Dis.* 189, 1664-75.
7. Lelli D., Moreno A., Lavazza A., Bresaola E., Canelli E., Boniotti M. B., Cordioli P. (2012) "Identification of Mammalian orthoreovirus type 3 in Italian bats." *Zoonoses Public Health.* 60, 84-92.
8. Lelli D., Beato M.S., Cavicchio L., Lavazza A., Chiapponi C., Leopardi S., Baioni L., De Benedictis P., Moreno A., (2016) "First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe" *Virology.* 13, 139.
9. Steyer A., Gutiérrez-Aguire I., Kolenc M., Koren S., Kutnjak D., Pokorn M., Poljšak-Prijatelj M., Racki N., Ravnikar M., Sagadin M., Fratnik Steyer A., Toplak N. (2013) "Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis." *J Infect Dis.* 51, 3818-3825.
10. Chua K.B., Voon K., Crameri G., Tan H.S., Rosli J., McEachern J.A., Suluraju S., Yu M., Wang L.F. (2001) "Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections." *PLoS One.* 3, e3803.
11. Lewandowska D., Capaul R., Prader S., Zagordi O., Geissberger F.D., Kügler M., Knorr M., Berger C., Güngör T., Reichenbach J., Shah C., Böni J., Zbinden A., Trkola A., Pachlopnik Schmid J., Huber M. (2018) "Persistent mammalian orthoreovirus, coxsackievirus and adenovirus co-infection in a child with a primary immunodeficiency detected by metagenomic sequencing: a case report." *BMC Infect Dis.* 18, 33.
12. Nayaranappa A. T., Sooryanarain H., Deventhiran J., Cao D., Ammayappan Venkatachalam B., Kambiranda D., LeRoith T., Heffron CL., Lindstrom N., Hall K.,

- Jobst P., Sexton C., Meng XJ., Elankumaran S. (2015) “A novel pathogenic Mammalian orthoreovirus from diarrhetic pigs and Swine blood meal in the United States” *MBio.* 6, e00593-15.
13. Zhang C., Liu L., Wang P., Liu S., Lin W., Hu F., Wu W., Chen W., Cui S. (2011) “A potentially novel reovirus isolated from swine in northeastern China in 2007.” *Virus Genes.* 43, 342-9.
14. Dai Y., Zhou Q., Zhang C., Song Y., Tian X., Zhang X., Xue C., Xu S., Bi Y., Cao Y. (2012) “Complete Genome Sequence of a Porcine Orthoreovirus from Southern China.” *J Virol.* 86, 12456.
15. Know H.J., Kim H.H., Kim H.J., Park J.G., Son K.Y., Jung J., Lee W.S., Cho K.O., Park S.J., Kang M.I. (2012) “Detection and molecular characterization of porcine type 3 orthoreoviruses circulating in South Korea.” *Vet Microbiol.* 157, 456-63.

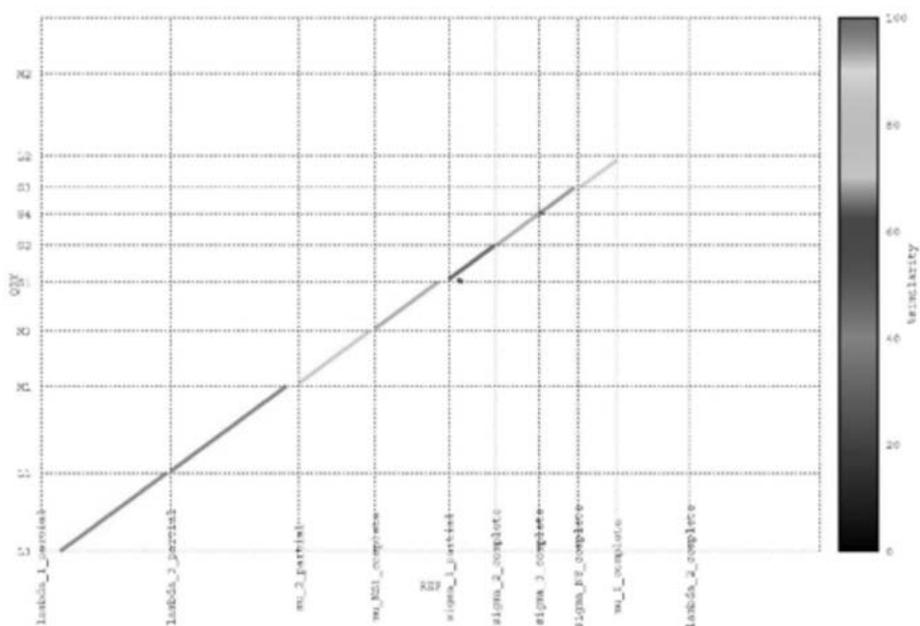


Figura 1. Confronto similarità tra MRV3 isolati in Italia da suino.

La figura riporta l’allineamento nucleotidico tra i diversi segmenti genici del genoma completo del ceppo lombardo (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016, in ascissa) e quello del ceppo veneto (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015, in ordinata). I colori indicano la percentuale di similarità di sequenza tra le diverse porzioni allineate in accordo alla scala cromatica a destra. L’allineamento nucleotidico è stato eseguito con MUMmer.

Figure 1. Comparison of similarity between MRV3 isolated in Italy from swine.

The figure shows the nucleotide alignment between the different genes of the complete genome of the strain from Lombardia region (MRV3 / swine / Italy / 16DIAPD52154 / 2016, on abscissa) and from strain from Veneto region (MRV3 / swine / Italy / 224660-4 / 2015, in the ordinate). The colors indicate the percentage of sequence similarity between the different portions aligned according to the chromatic scale on the right. The nucleotide alignment is done with MUMmer.

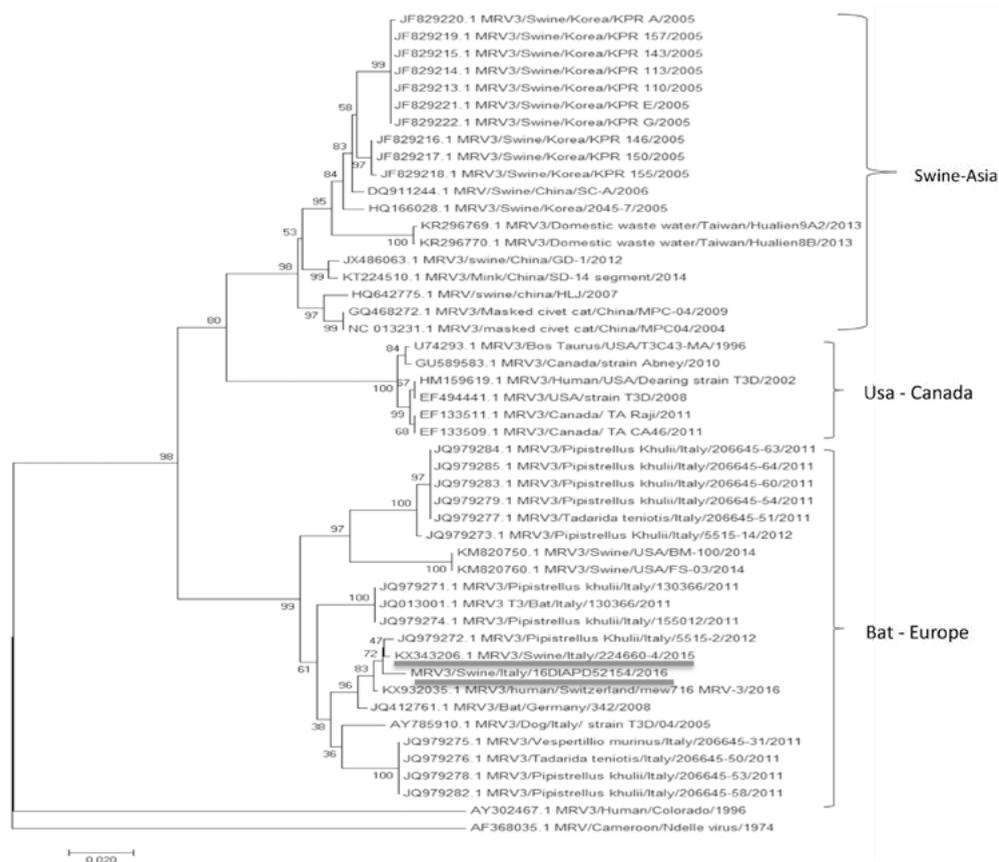


Figura 2. Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del gene S1 dei ceppi MRV3. Albero filogenetico del segmento genico S1 costruito mediante Neighbor-joining, analisi di bootstrap da 1000 repliche e Maximum Likelihood come modello di sostituzione nucleotidica. Per la costruzione dell'albero sono state utilizzate solo sequenze di MRV di tipo 3. In rosso sono evidenziati i due ceppi italiani, quello Veneto (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016) e quello Lombardo (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015).

Figure 2. Phylogenetic tree of nucleotide sequences of MRV3 S1 gene. Phylogenetic tree of the S1 gene segment built by Neighbor-join method, bootstrap analysis of 1000 replicates and Maximum Likelihood as a nucleotide substitution model. For tree construction were used only sequences of MRV type 3. The two Italian strains are highlighted in red, the one from Veneto region (MRV3 / swine / Italy / 16DIAPD52154 / 2016) and the one from Lombardia region (MRV3 / swine / Italy / 224660 -4 / 2015).