

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS (APPV) IN SUINI E CINGHIALI NEL NORD ITALIA

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS (APPV) IN SWINE AND WILD BOAR IN NORTH ITALY

SOZZI E., PARISIO G., FACCIN F., LELLI D., SALOGNI C., BARBIERI I.,
ALBORALI G.L., MORENO A., LAVAZZA A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Suino; APPV; caratterizzazione molecolare

Key words: Pig; APPV; molecular characterization

RIASSUNTO

Atypical porcine pestivirus (APPV) è stato recentemente riconosciuto nel genere *Pestivirus* all'interno della famiglia *Flaviviridae*. Questo nuovo pestivirus suino è stato descritto per la prima volta negli Stati Uniti nel 2015 dove è stato associato al tremore congenito (CT) di tipo A-II nei suinetti appena nati. Ricerche successive hanno dimostrato che APPV è ampiamente diffuso nei suini domestici in Europa e in Asia.

In questo studio, è stata condotta un'indagine virologica nel Nord Italia per rilevare la presenza di APPV mediante metodi biomolecolari. L'esame di 330 feti suini e 179 campioni di sangue di cinghiali ha consentito di identificare due ceppi di APPV in suini della regione Lombardia e tre ceppi in cinghiali selvatici delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna. Il sequenziamento nucleotidico di una parte della regione codificante NS3 ha mostrato un'elevata similarità con ceppi di APPV europei (Spagna, Germania e Italia) precedentemente identificati.

ABSTRACT

Atypical porcine pestivirus (APPV) is a newly recognized member of the *Flaviviridae* family. This novel porcine pestivirus was first described in the U.S. in 2015 where it has been associated with congenital tremor (CT) type A-II in new-born piglets. Subsequent studies have pointed that APPV is widely distributed in domestic pigs in Europe and Asia. In this study, a virological survey was performed in North Italy to investigate the presence of APPV by molecular methods. By testing 330 pig fetuses and 179 wild boar blood samples, two APPV strains were detected in pig herds from Lombardy region and three strains in wild boars in Lombardy and Emilia Romagna regions. The nucleotide sequencing of a part of the NS3 coding region showed high similarity to APPV European strains (Spanish, Germany and Italy) previously detected.

INTRODUZIONE

I Pestivirus sono virus a genoma ssRNA altamente variabile, appartenenti alla famiglia *Flaviviridae*. Recentemente, sulla base delle evidenze molecolari ed epidemiologiche, è stata proposta una revisione della tassonomia del genere *Pestivirus*, con l'aggiunta di sette specie, oltre alle quattro già esistenti, non più suddivise sulla base della specie bersaglio, ma indicandole con un una lettera progressiva. Pertanto, come riportato da Smith et al. (2017), in aggiunta alle quattro specie riconosciute, rinominate come *Pestivirus A* (virus della Diarrea Virale Bovina tipo 1, BVDV-1), *B* (virus della Diarrea Virale Bovina tipo 2, BVDV-2), *C* (virus della Peste Suina Classica, CSF) e *D* (virus della Border Disease, BDV), sono individuate ora altre sette

specie putative, che includono: Pestivirus E (Pronghorn pestivirus), Pestivirus F (Bungowannah virus), Pestivirus G (giraffe pestivirus), Pestivirus H (Hobi-like pestivirus), Pestivirus I (Aydin-like pestivirus), Pestivirus J (rat pestivirus) e Pestivirus K (atypical porcine pestivirus). Inoltre, sono stati descritti recentemente altri differenti pestivirus, identificati rispettivamente in pipistrelli (bat-derived pestivirus), pecore e capre (Tunisian sheep pestiviruses) e suini (Linda pestivirus), che potrebbero rappresentare tre ulteriori specie.

Limitatamente alla specie suina, oltre a CSFV (pestivirus C), sono ad oggi identificati altri tre pestivirus: il Bungowannah virus (BV - pestivirus F), scoperto in Australia nel 2003, il Linda virus scoperto recentemente in Austria ed i pestivirus suini atipici (APPV o pestivirus K).

Il Pestivirus F ha inizialmente causato disordini riproduttivi, morte fetale e morte improvvisa nei suinetti, con gravi danni e perdite economiche, ma in seguito non è più stato rilevato in altri luoghi (Kirkland et al., 2007). Il Linda virus, è stato descritto nel 2015 in Austria, anch'esso in associazione alla TC in suinetti. Tale identificazione è da ritenersi occasionale visto che non è più stato riportato in altri studi, lasciando del tutto indefinita la sua diffusione geografica e la rilevanza clinica nei suini (Lamp et al., 2017).

Sicuramente più rilevante per frequenza di identificazione, riscontri clinici ed importanza economica è l'APPV. Virus appartenente al gruppo dei pestivirus K, identificato più volte in Nord America (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016) e in Europa (Postel et al., 2016; Beer et al., 2016; de Groof et al., 2016). Sebbene APPV sia stato più volte identificato in animali asintomatici, vi è una chiara evidenza che sia associato con la sindrome da tremore congenito di tipo A-II (TCA-II) dei suinetti (Arruda et al., 2016). Inoltre, i dati ad oggi disponibili porterebbero a considerare APPV come diffuso in tutto il mondo e presente in modo stabile da lungo tempo in popolazioni di suini domestici e selvatici (Hause et al., 2015; Mosenza et al., 2017; Postel et al., 2017; Munoz-Gonzalez et al., 2017). Un importante ruolo epidemiologico come veicolo dell'infezione sembra possa essere svolto da suini clinicamente sani e dai cinghiali, anche se le segnalazioni in quest'ultimi sono limitate a Germania, Serbia e Spagna (Cagatay et al., 2018; Colom-Cadena et al., 2019). Rimangono da approfondire le conseguenze economiche derivanti da focolai di APPV, infatti, uno studio descrive perdite economiche dovute a un calo del 10% del numero di suinetti svezzati per scrofa (Schwarz et al., 2017).

In questo studio, viene descritta la presenza del genoma di APPV in feti suini e in cinghiali delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna e la caratterizzazione genetica dei ceppi identificati.

MATERIALI E METODI

Suini

Nel periodo 2016-2018 sono stati esaminati n.330 feti suini conferiti presso la sezione diagnostica di Brescia dell'IZSLER e provenienti dalle aziende presenti sul territorio di competenza. In corso di necropsia, sono stati prelevati da ciascun feto abortito campioni di organi (cervello, polmone, milza, fegato e rene), poi riuniti in un unico pool e omogeneizzati. Il surnatante di centrifugazione è stato analizzato per identificare eventuali cause infettive di aborto.

Le analisi batteriologiche e parassitologiche sono state condotte seguendo procedure di *routine* attualmente in uso presso la Sezione Diagnostica di Brescia.

Le analisi virologiche sono state condotte sia con metodiche *real-time* RT-PCR per ricerca di PRRSV, PCV-2, PPV, PCV-3 e pan-pestivirus (Hoffman et al., 2006), sia tramite inoculazione in colture cellulari sensibili per l'isolamento di virus suini (SKI, Marc e Mas). I monostrati cellulari inoculati sono stati osservati quotidianamente per 5-7 giorni al microscopio ottico rovesciato per la eventuale comparsa di effetto citopatico (ECP). Le colture cellulari sono state sub-coltivate fino al 2° passaggio quando venivano testate in ELISA sandwich per la presenza di Pestivirus e PRRS.

Limitatamente a quei campioni che all'esame diretto in *real-time* RT-PCR avevano fornito segnale di positività per APPV, la subcultura proseguiva fino al 5° passaggio, quando, anche in assenza di ECP venivano testate con *real-time* RT-PCR specifica per APPV.

Cinghiali

In totale sono stati esaminati n. 179 campioni di sangue di cinghiali abbattuti nel corso del 2017-2018 per prelievo venatorio ed esaminati nell'ambito del piano di monitoraggio della fauna selvatica della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni di siero sono stati esaminati per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus della Malattia Vescicolare del suino (MVS), dell'Encefalomiocardite da Cardiovirus (EMCV), della glicoproteina E (gE) del virus della Malattia di Aujeszky (ADV), di pestivirus (BVD, BDV, PSC), del virus dell'Influenza suina tipo A sottotipi H1N1, H1N2, H3N2 e, infine, di *Brucella* spp. Le analisi sierologiche sono state condotte impiegando le metodiche attualmente in uso presso l'IZSLER.

Identificazione e caratterizzazione genomica di APPV

Per la ricerca del genoma virale di APPV, tutti i campioni, sia gli omogenati da pool di organi fetali sia i sieri di cinghiale, sono stati sottoposti a *screening* tramite tecnica *real-time* RT-PCR gene-NS5B (Schwarz *et al.*, 2017).

I campioni risultati positivi a tale esame sono stati caratterizzati mediante sequenziamento Sanger, utilizzando una RT-PCR mirata all'amplificazione di un frammento della regione NS3. Le sequenze nucleotidiche sono state allineate utilizzando il metodo ClustalW e comparate con le sequenze presenti in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizzando il software Lasergene v 10.0 (DNASar, Madison, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizzando il metodo di Neighbor-Joining (NJ).

RISULTATI

Suini

Le analisi *real-time* RT-PCR gene-NS5B sui campioni di omogenati da pool di organi dei feti suini hanno identificato due (0,6%) campioni positivi, uno da un pool di tre feti suini provenienti da un'azienda situata nella provincia di Brescia e l'altro da un pool di due feti di un allevamento della provincia di Mantova (Fig.1). Ciò in assenza di altri rilievi in questi due pool di campioni sia all'esame autoptico, che non evidenziava lesioni macroscopiche interne in alcuno di questi feti, sia a seguito di indagini batteriologiche e parassitologiche. Inoltre, le indagini biomolecolari per PRRSV, PCV-2, PPV e pan-pestivirus avevano fornito tutti risultati negativi e solo la ricerca di PCV-3 tramite metodica *real-time* PCR era risultata positiva per il pool di feti dell'azienda ubicata nella provincia di Brescia.

Le sequenze ottenute, APPV-BS/341729/2017 e APPV-MN/212160/2016, clusterizzano con APPV precedentemente identificati in Europa. In particolare, l'albero filogenetico costruito sulla regione NS3 (Fig. 2) mostra che i ceppi identificati formano due gruppi distinti: il ceppo MN/212160/2016 risulta correlato con il ceppo 98/Sp06 identificato in Spagna nel 2006 con una omologia del 99.2% e con il ceppo tedesco Bavaria S5/9 identificato nel 2015 con una omologia del 96.8%, mentre la sequenza BS/341729/2017 forma un clade separato e strettamente correlato con due sequenze identificate in Italia in suini nel 2015, Italy-164 e Italy-181, con un range di similarità nucleotidica rispettivamente del 95.5% – 99.2%. Le sequenze ottenute, APPV-BS/341729/2017 e APPV-MN/212160/2016 mostrano una similarità nucleotidica del 92.5%.

Nonostante la positività al test di *real-time* RT-PCR, l'esame virologico degli organi di feti suini tramite inoculazione in colture cellulari, fino al 5° passaggio, ha sempre fornito esito negativo.

Cinghiali

Tutti i cinghiali esaminati in questo studio, inclusi quelli APPV-positivi, provenivano da prelievo venatorio ed erano da considerarsi sani sulla base del loro comportamento prima dell'abbattimento e della mancanza di lesioni all'esame ispettivo della carcassa. Dei 179 campioni di sangue di cinghiali esaminati, n.3 (1,67%), provenienti da diverse località, in Lombardia (n.1) e in Emilia Romagna (n.2) (Fig. 1), sono risultati positivi allo screening per APPV.

Analogamente ai ceppi identificati nei suini, anche i ceppi sequenziati dai cinghiali, APPV-WB-RN/262773/2018, APPV-WB-CR/264058/2018 e APPV-WB-FC/132781/2018, sono risultati suddivisi in due cluster distinti: il primo comprende i ceppi WB-RN/262773/2018 e WB-FC/132781/2018, la sequenza identificata nell'allevamento suino di Mantova (MN/212160/2016) con omologia del 95.6% - 96%, e, ovviamente, i ceppi precedentemente indicati e appartenenti allo stesso cluster (Bavaria S5/9 e Spain 98/Sp06), con i quali mostrano un range di omologia nucleotidica del 98% - 99.2%. Il secondo cluster comprende: i) il ceppo WB-CR/264058/2018 abbattuto a Cremona, ii) il APPV identificato nei suini a Brescia (BS/341729/2017) con omologia del 96,4%, iii) i ceppi suini italiani, Italy-164 e Italy-181, con una correlazione del 96,4% - 96%; iv) i ceppi identificati recentemente in Germania, nella Bassa Sassonia, nel 2016 con una similarità del 94,3%.

Per quanto riguarda le analisi sierologiche collaterali eseguite, per le patologie previste nell'ambito del piano di monitoraggio della fauna selvatica, sui campioni di sangue risultati positivi per APPV si segnala: esito negativo per APPV-WB-RN/262773/2018, positività per anticorpi anti-*Brucella* spp per APPV-WB-CR/264058/2018 e, positività anticorpale per anticorpi gE del virus della Malattia di Aujeszky per APPV-WB-FC/132781/2018.

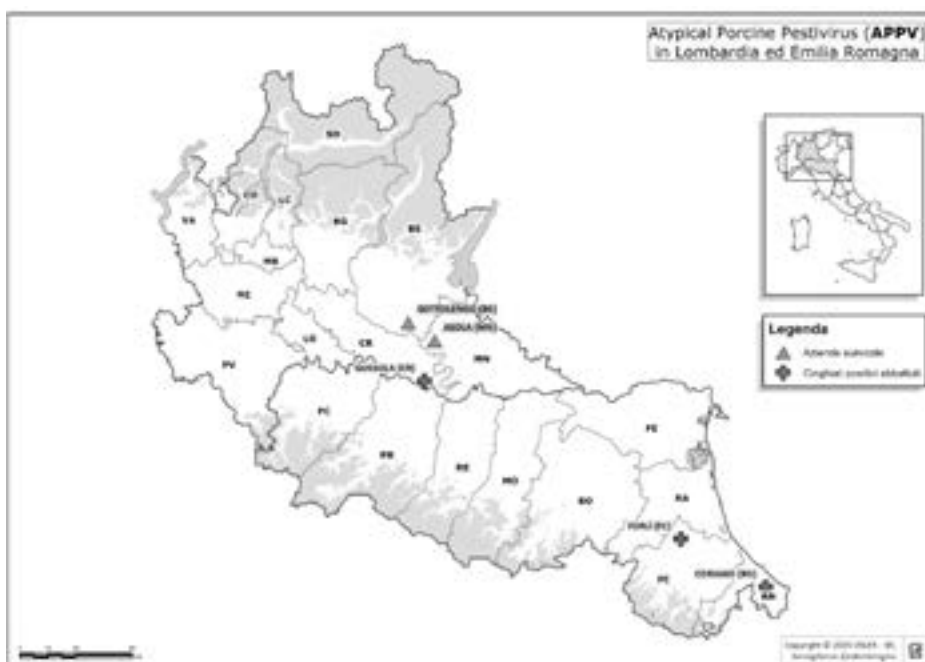


Figura 1: Distribuzione geografica delle aziende suinicole e dei luoghi di abbattimento dei cinghiali con dimostrata identificazione di APPV.

Figure 1: Geographical distribution of pig farms and wild boars hunting sites with APPV identification.



Figura 2: Albero filogenetico costruito su una porzione di 645nt della regione NS3 di genomi APPV depositati in GenBank, mediante metodo Neighbor-Joining (NJ) utilizzando il software MEGA v.6.0. Sono mostrati valori di bootstrap > al 60% (in % su 1.000 replicati). In grassetto sono riportati i ceppi oggetto del presente lavoro.

Figure 2: Phylogenetic tree based on a 645-nt fragment in the nonstructural protein 3 encoding region of APPV genome present in GenBank. Phylogenetic analysis by the neighbor-joining method including 1.000 iterations for bootstrap analysis was performed. Only bootstrap values ≥ 60 are indicated. Bold indicates sequences generated in this study.

DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati ottenuti esaminando 330 feti suini e 179 campioni di sangue di cinghiali, abbattuti durante la stagione venatoria, ha permesso di identificare APPV nel territorio di competenza, rispettivamente due ceppi da feti suini e tre ceppi da sangue di cinghiali.

Sulla base dei risultati dell'analisi filogenetica eseguita, i ceppi sia di suini che di cinghiali sono correlati con ceppi precedentemente identificati in Spagna ed in Germania. Sebbene tutte le sequenze ottenute possano essere raggruppate nel putativo cluster I descritto da Muñoz-González et al. (2017), che comprenderebbe virus che avrebbero un'origine comune, i ceppi da noi identificati tendevano a disporsi in due sotto cluster distinti.

In apparenza, l'assenza di lesioni sia nei feti che nei cinghiali porterebbe ad escludere un ruolo patogenetico definito di APPV in questi casi specifici. Rimane tuttavia da chiarire se la co-infezione del virus PCV-3 con APPV, presente nel pool di feti dell'allevamento della provincia di Brescia, possa avere avuto un effetto sinergico nei suinetti infetti tale da determinare una forma clinica, caratterizzata da aborto, natimortalità od anche tremore congenito.

Come precedentemente segnalato, i cinghiali sono suscettibili all'infezione con APPV, ma il loro ruolo nell'epidemiologia del virus rimane sconosciuta. La bassa prevalenza di APPV nella popolazione di cinghiali da noi riscontrata ben si correla con quanto riportato da Colom-Cadena et al. (2019) in Spagna, ma è in contrasto con l'elevata prevalenza riportata nei cinghiali nel nord della Germania (Cagatay et al., 2018), dove APPV risulterebbe endemico nel cinghiale in molte regioni in Germania, e negli allevamenti di suini domestici (Hause et al., 2015; Postel et al., 2016; Beer et al., 2017; Muñoz-González et al., 2017).

La scarsa numerosità di ceppi isolati su un territorio geografico molto ampio, seppur tenendo conto delle omologie riscontrate fra alcuni ceppi che clusterizzano fra loro, non consente interpretazioni epidemiologiche sulle modalità di diffusione di APPV e sull'eventuale trasmissione tra il suino domestico e il cinghiale.

CONCLUSIONI

APPV appare ben stabilito nella popolazione suina domestica di differenti paesi in Europa, America ed Asia, dove studi retrospettivi hanno indicato il suo rilievo già da qualche decennio, sebbene sia stato possibile identificarlo solo negli ultimi anni con il progressivo affinamento delle tecniche diagnostiche.

Sulla scorta dei dati disponibili in letteratura di caratterizzazione genomica e di prevalenza nei suini domestici, APPV è quindi da considerare un virus ad elevata variabilità e molto diffuso. Questo studio sembrerebbe confermare la presenza e distribuzione di APPV anche nella popolazione di suini domestici e selvatici presenti nel territorio di competenza dell'IZSLER.

La maggior correlazione con ceppi identificati in Germania ed in Spagna rafforza l'ipotesi che i ceppi da noi identificati siano di origine europea, a conferma del probabile ruolo determinante correlato al commercio di suini tra diversi Paesi nella diffusione dell'infezione. Il rilevamento di nuovi Pestivirus sottolinea la necessità di caratterizzare costantemente i ceppi circolanti per poter aggiornare i test diagnostici e avere una migliore comprensione dell'evoluzione di APPV, dell'epidemiologia e della prevalenza del virus.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Sig.ra Campagna Debora e la Sig. Zingarello Loredana per il prezioso contributo tecnico.

NOTE

Lavoro parzialmente finanziato dal Progetto di Ricerca Ministeriale 2015/019.

BIBLIOGRAFIA:

1. Arruda BL, Arruda PH, Magstadt DR, Schwartz KJ, Dohlman T, Schleining JA, Patterson AR, Visek CA, Victoria JG. Identification of a Divergent Lineage Porcine Pestivirus in Nursing Piglets with Congenital Tremors and Reproduction of Disease following Experimental Inoculation. *PLoS One*. 2016 Feb 24;11(2):e0150104.
2. Beer M, Wernike K, Dräger C, Höper D, Pohlmann A, Bergermann C, Schröder C, Klinkhammer S, Blome S, Hoffmann B. High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Oct;64(5):e22-e26.
3. Cagatay GN, Antos A, Meyer D, Maistrelli C, Keuling O, Becher P, Postel A. Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). *Transbound Emerg Dis*. 2018 Aug;65(4):1087-1093.
4. Colom-Cadena Andreu, Llilianne Ganges, Sara Muñoz-González, Raquel Castillo-Contreras, José Alejandro Bohórquez, Rosa Rosell, Joaquim Segalés, Ignasi Marco and Oscar Cabezon. Atypical porcine pestivirus in wild boar (*Sus scrofa*), Spain. 2019 *Vet Record* in press de Groof A, Deijs M, Guelen L, van Grinsven L, van Os-Galdos L, Vogels W, Derks C, Cruijssen T, Geurts V, Vrijenhoek M, Suijskens J, van Doorn P, van Leengoed L, Schrier C, van der Hoek L. Atypical Porcine Pestivirus: A Possible Cause of Congenital Tremor Type A-II in Newborn Piglets. *Viruses*. 2016 Oct 4;8(10).
5. Hause BM, Collin EA, Peddireddi L, Yuan F, Chen Z, Hesse RA, Gauger PC, Clement T, Fang Y, Anderson G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J Gen Virol*. 2015 Oct;96(10):2994-8.
6. Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *Journal of Virological Methods*. 2006;136:200–209
7. Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res*. 2007 Oct;129(1):26-34.
8. Lamp B, Schwarz L, Högler S, Riedel C, Sinn L, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rumenapf T. Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jul;23(7):1176-1179.
9. Mósena ACS, Weber MN, da Cruz RAS, Cibulski SP, da Silva MS, Puhl DE, Hammerschmitt ME, Takeuti KL, Driemeier D, de Barcellos DESN, Canal CW. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound Emerg Dis*. 2018 Feb;65(1):22-26.
10. Muñoz-González S, Canturri A, Pérez-Simó M, Bohórquez JA, Rosell R, Cabezon O, Segalés J, Domingo M, Ganges L. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Dec;64(6):1645-1649.
11. Postel A, Hansmann F, Baechlein C, Fischer N, Alawi M, Grundhoff A, Derking S, Tenhündfeld J, Pfankuche VM, Herder V, Baumgärtner W, Wendt M, Becher P. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep*. 2016 Jun 13;6:27735.
12. Postel A, Meyer D, Cagatay GN, Feliziani F, De Mia GM, Fischer N, Grundhoff A, Miličević V, Deng MC, Chang CY, Qiu HJ, Sun Y, Wendt M, Becher P. High

- Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. *Emerg Infect Dis.* 2017 Dec;23(12):2104-2107.
13. Schwarz L, Riedel C, Högl S, Sinn LJ, Voglmayr T, Wöchtel B, Dinhopf N, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rumenapf T, Lamp B. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet Res.* 2017 Jan 6;48(1):1.
 14. Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P. 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 98(8):2106-2112
 15. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.