

DIFFUSIONE DI ROTAVIRUS A E NON-A IN SUINETTI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA

WIDESPREAD OF ROTAVIRUS A AND NON-A IN PIGLETS WITH ENTERITIS

FERRARI E.¹, BUSI C.¹, SALOGNI C.¹, MARTELLA V.², GIOVANNINI S.¹,
ALBORALI G.L.¹, BONIOTTI MB¹.

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"*; ²*Università degli Studi di Bari*

Parole chiave: Suino, Diarrea, Rotavirus

Key words: Pigs, Diarrhea, Rotavirus

RIASSUNTO: I Rotavirus (RVs) sono considerati una delle principali cause di enterite acuta nei suini. Nel pre- e post-svezzamento, l'infezione è molto severa nei suinetti e causa ingenti perdite economiche. Cinque diversi gruppi (RVA, B, C, E, H) sono stati associati a diarrea nel suino, di cui il gruppo A è quello più diffuso. La prevalenza dei gruppi non-A (RVB, RVC e RVH), è stata riportata in diversi Paesi e sembrerebbe correlata con l'età dei suini. In Italia sono disponibili dati sulla distribuzione dei gruppi A e C in suinetti svezzati, ma non sulle infezioni da RVB e RVH. Considerato l'alto tasso d'incidenza dei gruppi RV non-A in molti Paesi e l'importanza clinica delle enteriti da RV nei suinetti sottoscrofa e svezzati, sarebbe importante conoscerne la distribuzione e l'impatto sul territorio. A tal scopo, abbiamo sviluppato due saggi di Real-Time RT-PCR multiplex per la rilevazione simultanea di RVA/B e RVC/H. Sono stati esaminati 92 suinetti sottoscrofa e 106 svezzati con sintomatologia enterica. La presenza di RV è stata riscontrata in un'elevata percentuale di suinetti sottoscrofa (72%) e svezzati (82%), di cui il gruppo A è predominante (60%). E' stata inoltre rilevata la presenza di RVB e RVH con percentuali rispettivamente pari a 36% e 8.5%. Infezioni miste da RVB, C e H sono risultate più frequenti nei soggetti svezzati, suggerendo un diverso impatto di questi RV nelle due categorie di età. Inoltre, sono state evidenziate chiare associazioni tra RV e altri patogeni intestinali, suggerendo un possibile sinergismo nella patogenesi delle enteriti.

ABSTRACT: Rotaviruses are considered a major cause of acute diarrhea in swine. In suckling and weaned piglets, the infection is severe and causes relevant economic losses. Five different rotavirus groups (A, B, C, E, H) have been associated with diarrhea in swine, with RVA being the most common and studied. The presence of non-A groups (RVB, RVC and RVH) has been reported in several countries and it is supposed to be associated to age. Conversely, in Italy only limited information is available about RVC diffusion in weaned piglets, whilst there is no data about RVB and RVH infection. Therefore, due to the high incidence of the non-A RVs in many countries and to their clinical relevance in piglet enteritis, it would be advisable to collect data about their distribution in swine herds and to evaluate their impact on the swine livestock production. Accordingly, we developed two distinct multiplex Real-Time RT-PCR assays able to detect either RVA/B or RVC/H. Overall, 92 suckling and 106 weaned piglets with clinical disease were examined. RV presence was common in suckling and weaned piglets, with RVA being predominant (60%). RV B and RVH were detected with percentage of 36% and 8.5%, respectively. RVB, C and H mixed infections were more common in weaned piglets, suggesting a

different impact between the two age categories. In addition, the availability of diagnostic data on intestinal pathogens allowed observing a link between RVs and other intestinal pathogens, suggesting possible synergisms in the pathogenesis of enteritis.

INTRODUZIONE

I Rotavirus (RVs) rappresentano una delle cause più comuni di diarrea nell'uomo e negli animali. In particolare, nei suinetti sottoscrofa e negli svezzati le enteriti da RV sono associate a ritardo nella crescita, alta morbilità, mortalità ed elevato consumo di farmaci, aspetti che incidono profondamente sull'economia delle aziende suinicole. I RV (famiglia dei Reoviridae) posseggono un genoma composto da 11 segmenti di RNA a doppio filamento e sono classificati in dieci gruppi (da A a J) sulla base delle proprietà antigeniche e genetiche della proteina capsidica VP6 (1-3). Cinque (RVA-E) dei dieci gruppi sono associati a diarrea nel suino (4-6). Il picco d'incidenza dei diversi gruppi di RV varia con l'età e le condizioni in allevamento. I RVs di gruppo A sono considerati la causa più frequente di enterite nei suinetti in tutto il mondo, e sono stati ampiamente caratterizzati per quanto riguarda la loro diffusione, patogenicità e la diversità genetica (5,7-8). Studi epidemiologici condotti tra il 2009 e il 2011 in USA hanno riportato una prevalenza di RVA di circa il 70% in suini sintomatici. Viceversa, i RV non -A, definiti anche "atipici", sono meno studiati. Solo negli ultimi anni, sono stati raccolti numerosi dati sulla loro diffusione a livello mondiale, ma un monitoraggio completo, a livello nazionale, non è ancora stato effettuato. La presenza del gruppo C è stata documentata in episodi sporadici di diarrea suina in lattanti e svezzati in diversi Paesi e in alcuni allevamenti italiani (9-11). RVE è stato identificato in un caso isolato in UK ma mancano dati attendibili sulla sua distribuzione attuale. Viceversa, infezioni da parte di RV di gruppo B e H sono state riscontrate in USA, Giappone, Brasile, e in alcuni paesi Europei (12-14), ma nessun dato sulla loro presenza è stato raccolto in Italia. Sebbene il ruolo specifico di questi gruppi (RVB, RVC e RVH) nella patogenesi delle enteriti non sia ancora noto, l'elevata incidenza a livello mondiale evidenzia l'importanza di raccogliere informazioni sulla loro distribuzione a livello nazionale. A tal scopo, abbiamo sviluppato saggi di RT-PCR Real time per la rilevazione dei gruppi A, B, C e H ed abbiamo analizzato campioni con sintomatologia clinica. Il nostro studio è stato condotto su suinetti sottoscrofa e svezzati, categorie in cui la malattia è più severa e frequentemente associata a mortalità. Inoltre, per avere un quadro clinico più ampio, è stata valutata l'associazione dell'infezione da RV con altri patogeni enterici (PEDV, *E.Coli* e *Clostridium perfringens*) coinvolti nelle gastroenteriti dei suinetti.

MATERIALI E METODI

Raccolta campioni e processamento

La ricerca di RV è stata effettuata su campioni fecali o intestinali ottenuti da 92 suinetti sottoscrofa e 106 svezzati con sintomatologia enterica. Lo studio della presenza d'infezioni miste da RV e altri patogeni enterici (PEDV, *E.coli* e *Clostridium perfringens*) è stato effettuato su 61 campioni fecali di suinetti sottoscrofa e 37 di suini svezzati con diarrea. Tutti i campioni analizzati sono stati raccolti tra Novembre 2016 e Luglio 2018 ed erano provenienti da allevamenti della Lombardia.

1 g di feci o di contenuto intestinale sono stati diluiti in 10 ml di MEM (10% Peso/Volume) e vortexati fino ad ottenere un'omogeneizzazione completa. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 3000x g a 4°C per favorire la precipitazione del materiale fecale.

Rilevazione RV e PEDV

L'RNA virale è stato estratto da 200 µl di omogenato di tessuto o fecale al 10% peso/volume utilizzando il kit Nucleomag® 96 M-Medical/VET (Macherey-Nagel) in sistema semi-automatico KingFisher seguendo le istruzioni del produttore. Ad ogni campione è stato aggiunto un controllo interno di reazione, costituito da RNA esogeno (IC). L'identificazione di rotavirus di gruppo A, B, C e H è stata effettuata tramite due RT-PCR Real time multiplex per un frammento del gene vp6 gruppo-specifico. La presenza di PEDV è stata rilevata tramite amplificazione, con saggio RT-PCR real time, di una regione del gene S1. L'RNA esogeno è stato amplificato con primers e sonde specifiche al fine di individuare campioni non estratti correttamente o che presentano inibitori della reazione di RT-PCR Real time.

Isolamento e genotipizzazione batterica

L'isolamento di *E.coli* è stato effettuato su piastre agar sangue e agar Gassner a 37°C in condizioni di aerobiosi. Le specie di *E.coli* enterotossici (ETEC) sono state rilevate tramite PCR multiplex per i geni codificanti per le tossine (LT I, STaP, STb, STX2e) e le adesine (F4, F5, F6, F41 e F18). Per l'isolamento di *Clostridium perfringens*, le feci sono state strisciate su piastre di agar sangue e incubate in anaerobiosi a 37°C per 24 o 48 ore.

Analisi statistica

I calcoli di prevalenza e relativo intervallo di confidenza al 95% sono stati eseguiti col software Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co, USA). Il confronto tra le frequenze d'infezione da RV e gli altri patogeni enterici (PEDV, *E.coli* e *Clostridium perfringens*) nelle diverse categorie d'età è stato eseguito col test esatto del chi-quadrato.

RISULTATI

Presenza dei diversi gruppi di RV

In questo studio è emerso che il 73.9% (68/92) delle enteriti nei suinetti sottoscrofa e l'82% (87/106) negli svezzati sono associate a presenza di RVs. Per quanto riguarda i gruppi, RVA è il più diffuso nei suinetti sottoscrofa (60%), presente come infezione singola (32%) o associato agli altri gruppi (28%), seguito da RVB (27%) e RVC (25%). RVH è stato identificato solamente nell'1% dei suinetti sottoscrofa. Tra i suini svezzati, i gruppi A e C sono i più frequenti (61% per RVA e 63% per RVC), seguiti da RVB (42%) e RVH (15%) (Fig. 1). Una maggiore presenza dei gruppi B, C e H è stata rilevata nella categoria degli svezzati rispetto a quella dei sottoscrofa ($p < 0.05$). Infezioni singole dei gruppi A, B, C sono presenti in entrambe le categorie di età. In particolare, la presenza di RVA, come singolo gruppo infettante, è significativamente maggiore nei suinetti sottoscrofa ($p < 0.05$). RVH non è mai presente come singolo gruppo infettante ma solamente in associazione con gli altri gruppi.

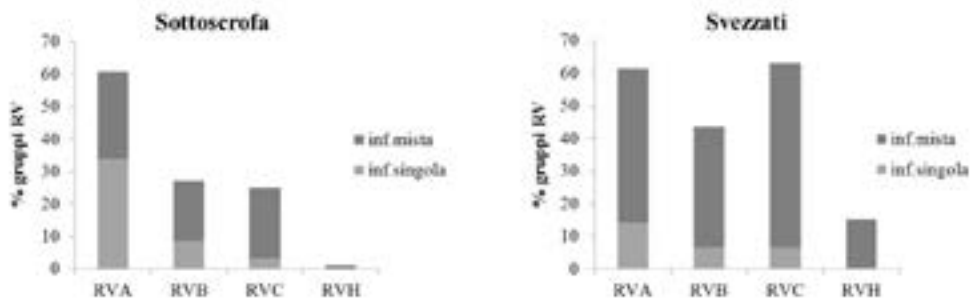


Figura 1. Presenza dei diversi gruppi di RV come infezione singola o combinata in suinetti sottoscrofa (N=92) e svezzati (N=106).

Figure 1. Presence of RV groups as single or mixed infection in suckling (N=92) and weaned piglets (N=106).

Co-infezione da RV e altri patogeni enterici

Un sottogruppo di 61 campioni ottenuti da suinetti sottoscrofa e 37 da svezzati con sintomi enterici, sono stati analizzati per la presenza di altri patogeni intestinali quali il virus della diarrea epidemica suina (PEDV), *E.coli* e *Clostridium perfringens*. I patogeni virali e batterici sono stati rilevati nella quasi totalità dei campioni analizzati (95% di positività nei suinetti sottoscrofa e 97% negli svezzati). I RVs sono presenti come singoli agenti infettanti nel 11.5% dei suinetti sottoscrofa e nel 16% degli svezzati (Fig. 2, A-B). In entrambe le categorie di età, la presenza di RVs è associata ad altri patogeni enterici (65% dei casi), di cui *E.coli* è il patogeno maggiormente presente (35% delle infezioni da RV nei suinetti sottoscrofa e 39% negli svezzati). Dei 43 isolati di *E.coli*, nei suinetti sottoscrofa, 16 sono stati caratterizzati per la presenza di fattori enterotossici (ETEC), di cui 2 sono risultati positivi. Nella categoria degli svezzati, 13 dei 21 isolati di *E.coli* sono stati analizzati per il tipo ETEC, di cui 4 sono risultati positivi. Il PEDV è stato rilevato solamente in 4 dei 61 (6.5%) campioni appartenenti alla categoria sottoscrofa mentre è presente in una maggior casistica negli svezzati (30%, $p < 0.05$), ed è associato a RV nell'11% dei casi. *Clostridium perfringens* è stato isolato da 28 campioni (46%) di suinetti sottoscrofa e da 1 (2%) campione di suinetti svezzati, sempre in associazione con altri patogeni (Fig. 2, A-B).

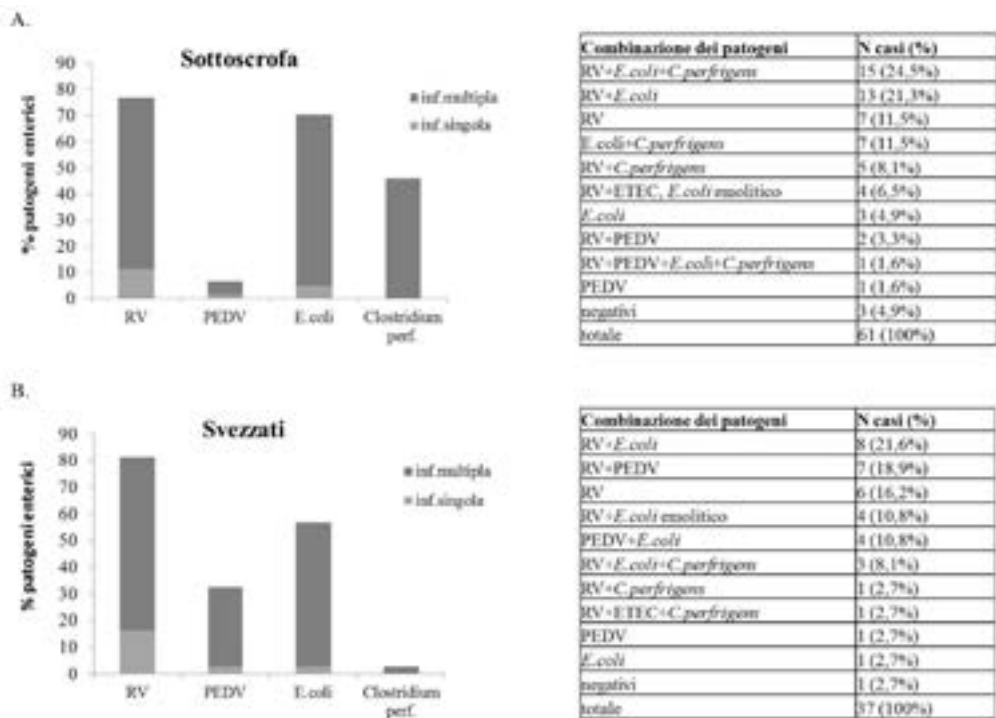


Figura 2. Presenza di RV, PEDV, *E.coli* e *Clostridium perfringens*, come infezione singola o infezione mista, in suinetti sottoscrofa (N=61) (A), e svezzati (N=37), (B). In tabella sono riportate le combinazioni di patogeni rilevate con la relativa frequenza.

Figure 2. Presence of RV, PEDV, *E.coli* and *Clostridium perfringens* as single or mixed infection in suckling (N=61), (A), and weaned piglets (N=37), (B). The table shows the combinations of the detected pathogens with the relative frequency.

Andamento temporale dell'infezione da RV

L'infezione da RV, osservata nel periodo compreso tra Gennaio 2017 e Luglio 2018, mostra delle fluttuazioni temporali comuni per entrambe le categorie di età analizzate. Il maggior numero d'infezioni è stato osservato nei mesi di Gennaio-Marzo per l'anno 2017 e Febbraio-Aprile per il 2018. Qualche picco d'infettività è stato rilevato nei mesi estivi di Giugno, Luglio del 2017 (Fig.3).

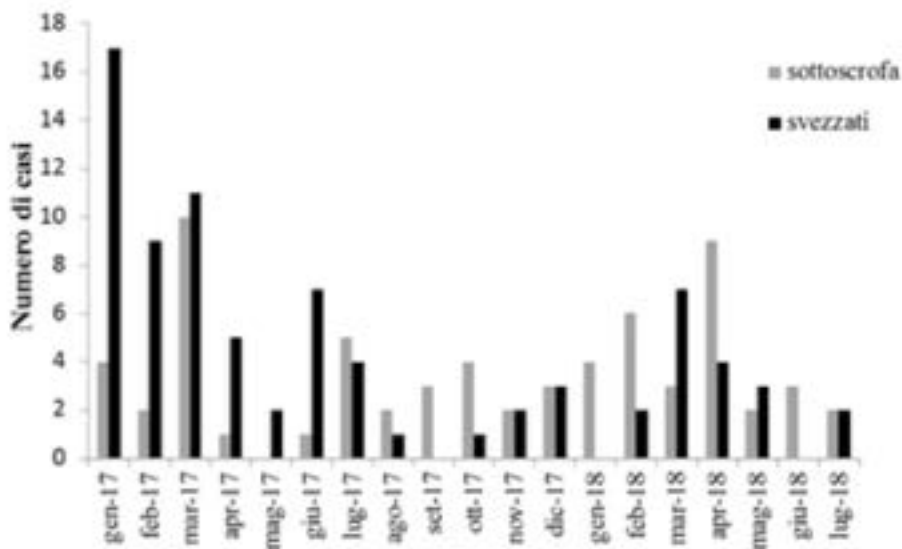


Figura 3. Distribuzione dell'infezione da RV nel periodo compreso tra Gennaio 2017 e Luglio 2018 nei suinetti sottoscrofa e svezzi.

Figure 3. Distribution of RV infection between January 2017 and July 2018 in suckling and weaned piglets.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi diagnostica, effettuata tramite PCR real time specifica per i RV-A, B, C e H, ha permesso di ottenere nuove informazioni sulla diffusione dei diversi gruppi di RV in suinetti sottoscrofa e svezzi in allevamenti della Lombardia. Lo studio è stato effettuato sui suinetti al di sotto dei 2 mesi di età, nei quali le infezioni da Rotavirus causano una sintomatologia più severa con conseguente impatto negativo sulla produzione suinicola. Dal nostro studio è emersa un'elevata prevalenza di RV nei suinetti sottoscrofa (73%) e svezzi (82%), in linea con la diffusione osservata in USA tra il 2009 e il 2012. Considerando la distribuzione dei diversi gruppi, RVA è presente in un elevato numero di casi (60%), spesso come singolo gruppo infettante nei suinetti sottoscrofa (32%). Questo dato suggerisce un ruolo preponderante di RVA nella patogenesi delle enteriti in questa categoria di età. Questo studio ha evidenziato per la prima volta la presenza di RVB e RVH sul territorio italiano con percentuali considerevoli specialmente per RVB (36%). L'elevata frequenza d'infezione da RVB, C e H, riscontrata in fase di svezzamento, suggerisce un probabile ruolo epidemiologico nelle infezioni enteriche, distinto per le diverse categorie di età. In particolare, la maggior incidenza di RV in fase di svezzamento potrebbe essere riconducibile al decremento dell'immunità passiva colostrale. I nostri dati mostrano che RVH non è mai presente come singolo gruppo infettante ma è associato alla presenza dei gruppi A, B e C. Ciò potrebbe essere dovuto a una sua minor virulenza, che verrebbe però incrementata dalla co-presenza di altri gruppi.

Per quanto riguarda l'analisi combinata con altri patogeni enterici, i RVs sono presenti come singolo agente infettante nell'11% delle enteriti dei suinetti sottoscrofa e nel 16% degli svezzi suggerendo un ruolo eziologico primario. Infezioni miste da RV ed *E.Coli* sono state osservate nel 30% circa dei campioni analizzati. *Clostridium perfringens* è stato

rilevato in alta percentuale, nei suinetti sottoscrofa, in associazione con altri patogeni suggerendo un ruolo patogenico importante nelle co-infezioni.

Un'associazione significativa tra RV e PEDV è stata riscontrata nei suinetti svezzati. In questi casi, la presenza di RV sembrerebbe favorire l'infezione da parte del PEDV, che come singolo agente infettante è presente solo nel 2,7% dei casi. Per quanto riguarda la distribuzione stagionale, il maggior numero di casi d'infezione da RV è stato riscontrato nei mesi più freddi (tra Gennaio-Marzo), con dei picchi nei mesi estivi di Giugno-Luglio. Pertanto non si può parlare di una vera e propria stagionalità della malattia ma bensì di fluttuazioni spazio-temporali. Probabilmente, oltre a fattori climatici, quali temperatura e umidità, altre componenti, come la presenza di altri patogeni, influiscono sulla diffusione della malattia. L'utilizzo di strumenti diagnostici specifici per i RV A e non-A ha permesso di avere un quadro più completo sulla presenza di Rotavirus nelle infezioni enteriche ponendo le basi per una comprensione più approfondita ed una gestione più mirata delle enteriti in allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Matthijssens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M., Johne R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177–1182.
2. Mihalov-Kovacs E., Gellert A., Marton S., Farkas S.L., Feher E., Oldal M., Jakab F., Martella V., Banyai K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 660–663.
3. Banyai K., Kemenesi G., Budinski I., Foldes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19–26.
4. Monini M, Zaccaria G, Ianiro G, Lavazza A, Vaccari G, Ruggeri FM. (2014). Full-length genomic analysis of porcine rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in Northern Italy. *Infect Genet Evol.* 25, 4-13.
5. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijssens J, Ciarlet M. (2014). Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods.* 209, 30-4.
6. Martella V, Banyai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 140, 246-55.
7. Rebecca Chandler-Bostock, Laura R. Hancox, Sameena Nawaz, Oliver Watts, Miren Iturriza-Gomara, Kenneth M. Mellits. (2014). Genetic diversity of porcine group A rotavirus strains in the UK. *Vet Microbiol.* 174(3-4), 609.
8. Chandler-Bostock R, Hancox LR, Payne H, Iturriza-Gomara M, Daly JM, Mellits KH. (2015). Diversity of group A rotavirus on a UK pig farm. *Vet Microbiol.* 180(3-4), 205-11.
9. Theuns S, Conceição-Neto N, Zeller M, Heylen E, Roukaerts ID, Desmarests LM, Van Ranst M, Nauwynck HJ, Matthijssens J. (2016). Characterization of a genetically heterogeneous porcine rotavirus C, and other viruses present in the fecal virome of a non-diarrheic Belgian piglet. *Infect Genet Evol.* 43, 135-45.
10. Kim Y, Chang KO, Straw B, Saif LJ. (1999). Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *J Clin Microbiol.* 37(5), 1484-8.
11. Martella V, Banyai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, Bozzo G, Moschidou P, Arista S, Pezzotti G, Lavazza A, Buonavoglia C. (2007). Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet Microbiol.* 123(1-3), 26-33.

12. Marthaler, D.; Suzuki, T.; Rossow, K.; Culhane, M.; Collins, J.; Goyal, S.; Tsunemitsu, H.; Ciarlet, M.; Matthijnssens, J. (2014). VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet. Microbiol.* 172, 359–366.
13. Almeida PR, Lorenzetti E, Cruz RS, Watanabe TT, Zlotowski P, Alfieri AA, Driemeier D. (2018). Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization. *J Vet Diagn Invest.* 30(3), 370-376.
14. Shepherd FK, Murtaugh MP, Chen F, Culhane MR, Marthaler DG. (2017). Longitudinal Surveillance of Porcine Rotavirus B Strains from the United States and Canada and In Silico Identification of Antigenically Important Sites. *Pathogens.* 3, 6(4).