UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

Relatore: Dott. Michele Drigo

Correlatore: Dott. Giovanni Franzo

Laureanda: Claudia Maria Tucciarone
Matricola n. 575385/MV

ANNO ACCADEMICO: 2013/2014

RIASSUNTO

In assenza di dati italiani relativi alla prevalenza dei diversi genotipi noti di PCV2, è stato condotto uno studio approfondito delle caratteristiche genetiche del virus, stabilendo una classificazione delle sequenze ritrovate sul territorio italiano, indagandone la variabilità inter- e intra-genotipica, la distribuzione geografica e temporale e, infine, la tipologia delle forze e delle pressioni selettive che modulano l'evoluzione di PCV2. La presenza dei diversi genotipi è in accordo con quanto riscontrato a livello mondiale, ponendo l'accento sull'influenza delle dinamiche di mercato in relazione alla diffusione del virus. Emerge inoltre con forza, anche nella situazione italiana, la problematica della ricombinazione tra stipiti e genotipi differenti. Infine, l'indagine della complessa interazione delle forze evolutive che agiscono lungo i vari tratti del genoma di PCV2, ha svelato aspetti contrapposti di pressioni purificanti e diversificanti, inattesi, ma funzionali alla biologia del virus.

ABSTRACT

Aim of this study is to investigate the genetic aspects of PCV2 to fulfill the lack of knowledge about its molecular epidemiology in Italy. Firstly a classification of PCV2 Italian sequences has been established as well as the evaluation of inter- and intra-genotype variability. Spatial and temporal distribution has been also considered to analyze the nature of the evolutionary pressure acting on PCV2. The number of different genotypes and the proportion among them are similar to what described in literature from other countries; this finding demonstrates how global trading and pathogen spread are related. Inter- and intra-genotype recombination appears to be a significant feature also in the Italian epidemiological context. The most intriguing and unexpected outcome of the study is the complex interaction of evolutionary pressures along the complete PCV2 genome and the coexistence of purifying and diversifying pressures on the same genomic region might be explained by the different biological purposes of each ORF.

INDICE

RIASSUNTO 3

ABSTRACT 3

1. INTRODUZIONE 7

1.1 ASPETTI EZIOLOGICI 15

2. MATERIALI E METODI 25

2.1 CAMPIONI 25

2.2 DATABASE 26

2.3 DISEGNO DEI PRIMER 26

2.4 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE 28

2.5 ELETTROFORESI 29

2.6 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR 29

2.7 REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE PER IL SEQUENZIAMENTO 29

2.8 ANALISI DELLE SEQUENZE 30

2.9 ANALISI BIOINFORMATICHE 31

3. RISULTATI E DISCUSSIONE 35

3.1 VALIDAZIONE PROTOCOLLO PCR ED ELETTROFORESI 35

3.2 ANALISI BIOINFORMATICHE DELLE SEQUENZE 36

3.2.1 Classificazione 36

3.2.2 Distribuzione 40

3.2.3 Variabilità 42

3.2.4 Entropia e Pressione Selettiva 45

4. CONCLUSIONI 53

5. BIBLIOGRAFIA 57

6. SITOGRAFIA 65

7. RINGRAZIAMENTI 67

1. INTRODUZIONE

Nell'ambito dell'allevamento e della produzione di carne, il settore suinicolo è il più attivo ed esteso a livello mondiale e il consumo e la produzione di carne suina mostrano una crescita annua del 2% (Drew, 2011). L'analisi delle rotte commerciali, in un sistema globalizzato che connette regioni con diversi standard produttivi e sanitari, ha permesso di rilevare un legame inscindibile tra disseminazione e diversità degli agenti eziologici e i movimenti del bestiame. Emblemi delle relazioni tra commercio e diffusione di patogeni sono la comparsa e la rapida espansione delle problematiche associate al *Porcine circovirus* (PCV).

PCV era già noto come contaminante persistente di colture cellulari della linea PK-15 (Tischer et al., 1974, Tischer et al., 1982), quando comparve nel 1991 in Canada una nuova forma clinica caratterizzata da deperimento cronico, tachipnea, dispnea, pallore, linfoadenomegalia e ittero, chiamata, sulla base della sintomatologia e della categoria di animali colpiti, *Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome* (Harding et al., 1998). Dopo un primo accostamento di PCV alla sindrome, analisi sierologiche e di caratterizzazione genomica permisero di distinguere il nuovo virus denominandolo *Porcine circovirus type 2* (Meehan et al., 1998) data l'identità pari all'80% (Meehan et al., 1998, Olvera et al., 2007) che lo accomunava al primo, rinominato *Porcine circovirus type 1* (PCV1). L'identificazione di PCV2 permise di rivalutare i risultati sull'elevata prevalenza sierologica inizialmente attribuita a PCV1, ritenuto da quel momento non patogeno. Negli anni seguenti le segnalazioni di PMWS diventarono più frequenti, si verificarono episodi in Europa (1997-2002), negli Stati Uniti (1998), in Asia (1999) e in Sud America (2002) (Chae, 2004) configurando PCV2 come un patogeno emergente a livello mondiale. Progressivamente fu possibile inoltre associare a PCV2 altre sindromi, quali *Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, Porcine respiratory disease complex, Proliferative and necrotizing pneumonia*, disordini riproduttivi, enterite (Gillespie et al., 2009, Opriessnig et al., 2007). Data la grande diffusione del virus e l'elevata prevalenza, è ancora incerto il nesso patogenetico per altre manifestazioni, quali epidermite essudativa (Chae, 2005) e *Congenital tremors* (Segalés, 2012, Stevenson et al., 2001), messe in relazione con PCV2 in quanto probabile fattore predisponente, mentre recentemente è stata imputata a PCV2 una sindrome respiratoria

iperacuta (Acute pulmonary edema, APE) identificata per la prima volta negli Stati Uniti (Cino-Ozuna et al., 2011). Tutte le varie manifestazioni cliniche legate a PCV2 sono state riunite sotto la denominazione di Porcine Circovirus Associated Disease (PCVAD), utilizzata in Nord America (Opriessnig et al., 2007) e Porcine Circovirus Disease (PCVD) in Europa (Segales et al., 2005)

La diffusione di PCV2 attraverso il commercio globale è perciò una delle ipotesi che permettono di spiegare l'emergenza quasi contemporanea di PCVD in Nord America e in Europa (Firth et al., 2009) ed è possibile mettere in correlazione le rotte commerciali con la dispersione inter- e intra-continentale di PCV2 attraverso analisi filogeografiche (Fig. 1).

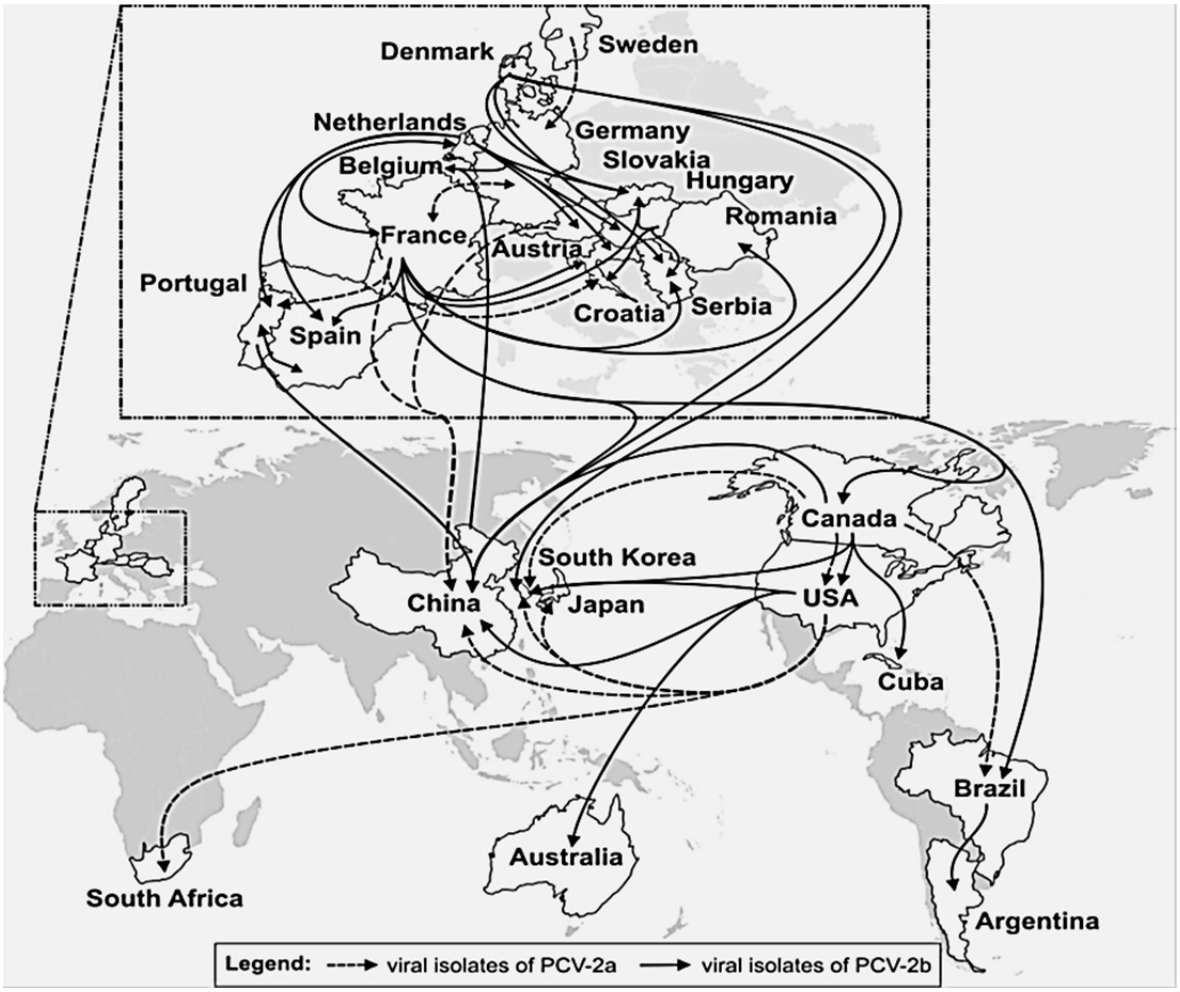

Figura 1: Stima delle principali vie di disseminazione di PCV2 attraverso il commercio internazionale di animali vivi (Vidigal, 2012)**. Le rotte più significative avrebbero luogo tra Sud America ed Europa, tra Asia e Nord America e tra Europa e Asia, mentre all'interno dei continenti gli scambi più rilevanti avverrebbero tra Francia Spagna e Ungheria, Canada e Stati Uniti, Francia e Olanda. Dal '97 i maggiori esportatori di suini sono Canada, Cina, Danimarca e Olanda, verso i mercati di Francia, Germania, Spagna e Stati Uniti** (Firth et al., 2009)**.**

L'infezione da PCV2 è quindi ubiquitaria e diagnosi di PMWS sono state effettuate in ogni continente: in tutta Europa, in Cina e Sud-est Asiatico, in Nord e Sud America e in Sudafrica (Grau-Roma et al., 2011); anche in Australia, ritenuta esente da PMWS e con casi sporadici di PDNS, negli anni 2007-2008 sono comparse le prime manifestazioni di PCVD associata a salmonellosi (O'Dea et al., 2011).

La peculiarità di PCV2 è però la massiva presenza di animali asintomatici, anch'essa causa di ingenti perdite economiche: l'animale infetto ma subclinico presenta infatti un calo dell'accrescimento giornaliero, un peso inferiore a fine ciclo produttivo e un'elevata predisposizione allo sviluppo di infezioni secondarie. È stato proposto che l'infezione subclinica causi una perdita media di 2,5 kg di peso vivo per capo al macello, con un ulteriore calo di 0,5 kg ogni punto percentuale di mortalità nell'allevamento (Alarcon, 2013). Questo dato assume particolare rilevanza se si considerano i valori di prevalenza dell'infezione, fino al 40-60%, con picchi del 100% (Firth et al., 2009). La ragione di una diffusione così estesa risiede nelle caratteristiche dell'ospite, dell'agente eziologico e nelle modalità di trasmissione. PCV2 colpisce principalmente animali giovani in fasi produttive delicate, in cui la suscettibilità all'infezione è correlata al calo dell'immunità materna; il virus è poi riconosciuto come estremamente stabile nell'ambiente, resistente al calore e all'azione di molti disinfettanti (Rose et al., 2012), proprietà che ne facilitano la persistenza per lunghi periodi negli allevamenti, senza renderne necessaria la reintroduzione (Meng, 2012, Rose et al., 2012). L'escrezione del virus che si protrae per lunghi periodi di tempo, anche fino a 97 giorni dallo svezzamento in infezioni naturali (Patterson et al., 2011), si verifica principalmente attraverso le secrezioni nasali, orali, bronchiali e oculari ed è riscontrabile in feci, urina, saliva, latte e materiale seminale (Grau-Roma et al., 2011). La trasmissione di PCV2 per via orizzontale avviene tramite il contatto diretto tra animale infetto e *naïve* e il contatto indiretto con strumenti e personale (Rose et al., 2012); inoltre, in uno studio sperimentale, è stata ottenuta la sintomatologia clinica di PMWS riproducendo la trasmissione aerea di PCV2 attraverso l'impianto di ventilazione (Kristensen et al., 2013). La trasmissione verticale è alla base di una delle problematiche più importanti legate a PCV2. Studi sul campo hanno evidenziato il legame tra replicazione del virus nei feti e disordini riproduttivi (Rose et al., 2012), caratterizzati da mancato impianto, riassorbimento

embrionale precoce, ritorno in estro irregolare, aborto, natimortalità, mummificazione fetale, nascite premature, decessi nel periodo post-parto e debolezza neonatale (Madson et al., 2009). Mediante l'utilizzo di seme addizionato artificialmente con titoli di PCV2 superiori a quelli escreti naturalmente nel materiale seminale, è stato possibile provocare l'infezione della femmina (Madson et al., 2009, Sarli et al., 2012) ma non l'infezione primaria dell'embrione, inizialmente protetto dalla zona pellucida. L'infezione fetale è quindi conseguente alla viremia materna e può insorgere in momenti diversi della gestazione, precedenti o successivi alla comparsa di immunocompetenza fetale, determinando la possibile nascita di suinetti infetti sia sieropositivi, sia sieronegativi e immunotolleranti (Rose et al., 2012).

La diffusione, la trasmissione e la persistenza di PCV2 sono inoltre facilitate da alcune condizioni strutturali e funzionali, come la vicinanza ad altri stabilimenti e i legami commerciali o produttivi, e da elementi manageriali, quali grandi raggruppamenti di animali, scarse condizioni igieniche, ridotti periodi di vuoto sanitario, pareggiamento delle nidiate e rimescolamento dei gruppi (Rose et al., 2012). Tutto ciò introduce all'esame dei fattori di rischio che contribuiscono a rendere la PCVD una patologia così complessa, infatti, per assistere all'instaurarsi della sintomatologia clinica (Tab. 1), la presenza di PCV2 è necessaria ma non sufficiente. Oltre a viremia elevata e diffusione sistemica del virus, altri elementi partecipano alla natura multifattoriale della patologia, quali le caratteristiche del virus, dell'ospite, le condizioni del sistema immunitario e le infezioni concomitanti. Riguardo all'ospite, PCV2 è estremamente ospite-specifico e le razze suine, sia domestiche sia selvatiche, sono tutte suscettibili, anche se non in egual modo. In seguito a studi comparativi tra razze diverse è emersa una maggior suscettibilità all'infezione da parte della razza Landrace e di alcune linee genetiche con linea paterna Large White-Duroc (Lopez-Soria, 2005, Opriessnig et al., 2006). L'interazione con il sistema immunitario può influire sull'esito dell'infezione in due modi apparentemente contrapposti: l'immunostimolazione, in stretta relazione temporale con l'infezione da PCV2 e ottenibile anche attraverso la somministrazione di vaccini o di particolari adiuvanti, causa aumento dei titoli virali ematici e tissutali, della durata della viremia e delle lesioni; l'immunosoppressione, conseguente ad esempio all'uso di ciclosporine o cortisonici, favorisce l'aumento dei titoli virali e lo sviluppo di lesioni più gravi (Gillespie et al., 2009).

SINDROME	SEGNI CLINICI	REPERTI MACROSCOPICI	REPERTI MICROSCOPICI
Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (60-80 giorni)	deperimento, dispnea, linfoadenopatia, diarrea, pallore delle mucose, ittero e anemia	linfoadenomegalia, polmoni con aree brunastre e di consolidamento che non collassano, reni con foci o striature biancastre, lesioni granulomatose diffuse	infiammazione granulomatosa, infiltrazione istiocitatria, cellule giganti multinucleate e corpi inclusi citoplasmatici in fegato, milza, tonsille, timo e placche di Peyer, necrosi coagulativa dei centri follicolari linfonodali, deplezione linfocitaria, DNA e antigeni virali nei tessuti
Porcine Dermatitis And Nephropathy Syndrome (nursery, grow-finish pigs)		macule e papule rotonde o irregolari, da multifocali a coalescenti, su arti e tronco, reni aumentati di volume, pallidi e con petecchie	vasculite necrotizzante da immunocomplessi a carico di cute e reni, necrosi dermica ed epidermica e glomerulonefrite fibrinosa necrotizzante, DNA e antigeni virali nei tessuti
Porcine Respiratory Disease Complex (16-22 settimane)	riduzione dell'incremento ponderale, letargia, febbre, tosse e dispnea	polmoni non collassano, consolidamento e aree più chiare nelle porzioni cranioventrali	polmonite broncointerstiziale, fibrosi peribronchiale e peribronchiolare, ispessimento setti alveolari, infiltrazione macrofagica e linfoplasmacellulare, DNA e antigeni virali nei tessuti
Reproductive failure	aborto, riassorbimento embrionale, estri irregolari, natimortalità, mummificazione fetale, neonati prematuri e deboli		miocardite fetale da nonsuppurativa a necrotizzante o fibrosante, DNA e antigeni virali nei tessuti
Enterite (40-70 giorni)	diarrea, da giallastra a più scura, ritardo nell'accrescimento	intestino necrotico con pareti ispessite	infiltrazione macrofagica, atrofia dei villi, DNA e antigeni virali in cripte e macrofagi, infiammazione granulomatosa nelle placche di Peyer e deplezione linfocitaria
Proliferative And Necrotizing Pneumonia	sintomatologia respiratoria sovrapponibile a PMWS	polmoni, scuri non collassati e con aree di consolidamento	polmonite da linfoistiocitaria a granulomatosa interstiziale o broncointerstiziale, bronchiolite ulcerativa necrotizzante, polmonite necrotizzante proliferativa, assenza di lesioni ai tessuti linfoidi, DNA e antigeni virali nei tessuti
Linfadenite necrotizzante	aspecifici, febbre ridotto accrescimento	linfadenite necrotizzante	necrosi follicolare nei centri linfoidi, abbondante presenza di DNA e antigeni virali nelle cellule necrotiche
Acute Pulmonary Edema	sintomi respiratori dall'insorgenza rapida e morti improvvise	fluido chiaro in cavità toracica, polmoni edematosi, setti interlobulari dilatati, aree emorragiche dorsali e di consolidamento cranioventrali	distensione dei setti intralobulari da edema, infiltrato macrofagico e linfocitario diffuso, necrosi fibrinoide delle pareti vascolari e deplezione linfocitaria diffusa, presenza di DNA e antigeni virali nei tessuti

Tabella 1: Caratteristiche principali delle varie sindromi (Chae, 2004, Chae, 2005, Cino-Ozuna et al., 2011, Galindo-Cardiel et al., 2011, Gillespie et al., 2009, Hansen et al., 2010, Opriessnig et al., 2007, Opriessnig et al., 2011, Segalés, 2012)**. La deplezione linfocitaria, lesione comune alle varie sindromi, è imputabile a meccanismi come calo della proliferazione dovuto all'assenza di fattori di crescita, distruzione dei precursori, alterazione del normale equilibrio di produzione e distruzione linfocitaria, esito della combinazione di processi apoptotici, di lisi indotta dal virus, di alterazione del funzionamento dei tessuti linfoidi** (Kiupel et al., 2005, Mandrioli, 2004, Resendes et al., 2004, Shibahara, 2000)**.**

Alla luce di ciò si può comprendere come l'immunosoppressione causata da PCV2 possa predisporre al subentro di altre patologie e come queste ultime, a loro volta, contribuiscano ad aggravare l'infezione sostenuta da PCV2, promuovendo la mitosi cellulare nell'ospite per offrire le condizioni ideali alla replicazione virale, alterando la risposta infiammatoria e il rilascio di citochine, interferendo con la clearance virale per facilitarne la persistenza (Opriessnig and Halbur, 2012). La presenza di coinfezioni è considerata quindi un fattore propulsivo per la progressione della PCVD, ne aumenta la carica virale, l'incidenza e la gravità delle manifestazioni cliniche e gli agenti eziologici riscontrati più frequentemente in concomitanza a PCV2 sono *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Parvovirus, Swine Influenza Virus, Transmissible Gastroenteritis e Porcine Respiratory Coronavirus, enterovirus, herpesvirus, retrovirus, M. hyopneumoniae, L. intracellularis, Salmonella spp, Pneumocystis carinii, Cryptosporidium parvum* (Opriessnig and Halbur, 2012).

Durante la fase epidemica di PMWS in Europa dal '96 al 2004, i valori di morbilità e mortalità raggiunsero il 50-60% e 4-20% rispettivamente (Alarcon, 2013) e l'impatto economico di PCVD fu senza dubbio importante. Nacque quindi la necessità di predisporre degli strumenti in grado di prevenire l'instaurarsi dell'infezione, per quanto possibile, ma soprattutto di controllare la risposta clinica all'ingresso del patogeno. In considerazione dei vari aspetti che regolano la dinamica della patologia, le prime contromisure essenziali riguardarono le scelte manageriali e le buone prassi igienico-sanitarie dell'allevamento, volte alla riduzione dello stress negli animali, evitando quindi sovraffollamento, stabulazione in grandi gruppi eterogenei, prossimità tra animali di fasi produttive differenti, sistematiche procedure di pareggiamento delle nidiate, cross-fostering e svezzamento precoce (Grau-Roma et al., 2011). L'insieme delle misure gestionali e del controllo dei patogeni concomitanti, per quanto sopra riportato, si mostrarono provvedimenti palliativi e insufficienti; data quindi l'inadeguatezza degli strumenti unicamente manageriali applicati alla gestione della patologia, una significativa svolta si ebbe con l'introduzione dei primi vaccini. La profilassi vaccinale mirata contro PCV2 si è dimostrata infatti un'arma imprescindibile per il controllo delle varie manifestazioni di PCVD, nonostante il primo vaccino introdotto in commercio nel 2006 (*Circovac®*) fosse nato dall'esigenza di combattere primariamente il fenomeno della

PMWS (Chae, 2012). Sono in commercio quattro tipologie di vaccini, basati su PCV2a ma efficaci nel garantire cross-protezione tra i diversi genotipi: *Circovac®*, costituito da virus inattivato in veicolo oleoso, somministrabile in monodose a suinetti oltre le 3 settimane di vita o a scrofe gravide, almeno 2 settimane prima del parto in due dosi intramuscolari a distanza di 3-4 settimane e con richiamo a ogni gravidanza; *CircoFLEX®*, composto da proteine capsidiche espresse in baculovirus inattivato, da somministrare in unica dose intramuscolare a suinetti oltre le 2-3 settimane; *Circumvent PCV®* (USA e Canada)/*Porcilis PCV®* (Europa e Asia), anch'esso con subunità capsidiche, per suinetti di almeno 3 settimane in due dosi intramuscolari; il vaccino *Suvaxyn®* è invece il prodotto chimerico dell'inserzione del gene del capside immunogenico di PCV2 nella struttura del non patogeno PCV1, è un vaccino attenuato, previene la viremia ed è somministrabile in dose singola a suinetti di 4 settimane (Chae, 2012, Gillespie et al., 2009, Grau-Roma et al., 2011, Grau-Roma et al., 2011, Opriessnig et al., 2007). Le strategie vaccinali più diffuse sono volte quindi all'immunizzazione dei suinetti dopo il calo dell'immunità materna o delle scrofe nell'ultimo periodo di gestazione: la scelta del protocollo comprende valutazioni di tipo gestionale ed economico, come la minor manodopera richiesta per la vaccinazione delle scrofe, ma è soprattutto condizionata dal rischio aziendale (Chae, 2012). Qualora i nuovi nati fossero precocemente esposti a PCV2, l'immunizzazione materna e lo sfruttamento degli anticorpi assunti attraverso il colostro garantirebbero maggiore protezione; nel caso in cui l'esposizione avesse invece luogo in fasi produttive avanzate, l'immunizzazione attiva dei suinetti sarebbe più vantaggiosa poiché sopperirebbe al fisiologico calo dell'immunità materna, solitamente protettiva nelle prime settimane di vita, grazie all'elevata sieroprevalenza degli animali adulti (Chae, 2012). Inoltre la profilassi vaccinale contro PCV2 si è dimostrata efficace nel diminuire la viremia e l'escrezione virale, nel migliorare accrescimento e produttività anche negli animali subclinici (King et al., 2008), nel ridurre il periodo di escrezione nel seme di verri viremici e nel migliorare le performance riproduttive di scrofe e scrofette (Chae, 2012).

Il massivo uso di vaccini ha posto la necessità di distinguere gli animali infetti dai vaccinati e in questo senso è stato approntato un metodo ELISA, specifico contro baculovirus-marker presenti negli animali vaccinati con il vaccino *Porcilis PCV®*, che permette di distinguere gli

animali naturalmente sieropositivi da quelli immunizzati artificialmente (Beach and Meng, 2012). In ambito diagnostico insorgono altre complicazioni dovute sia all'inadeguatezza dei rilievi clinici ai fini dell'individuazione della patologia, sia alla sieropositività diffusa, ma soprattutto alla presenza di un elevato numero di animali subclinici che falsano la diagnosi di PCVD. La conferma di PCVD clinica può essere accertata solo in presenza di tre criteri allo stesso tempo: l'osservazione di sintomi come perdita di peso, segni respiratori o aumento della mortalità, la presenza di lesioni istologiche caratteristiche a carico del tessuto linfoide e infine l'individuazione di antigeni di PCV2 o di DNA virale a livello delle lesioni (Beach and Meng, 2012). L'aspetto clinico aspecifico dev'essere quindi sempre associato a esami di laboratorio, come immunoistochimica (IHC), ibridazione *in situ* (ISH) e *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ritenuti i metodi gold standard. L'immunoistochimica permette un esame delle lesioni e della presenza antigenica, per quanto la sensibilità diagnostica per la sola infezione sia ridotta, essendo necessaria un'ingente quantità virale affinché la colorazione sia visibile (Brunborg, 2004). L'ibridazione *in situ* è considerata più specifica, permettendo però allo stesso tempo la ricerca di più agenti eziologici (Opriessnig et al., 2007). L'uso della PCR classica è diffuso, ma l'elevata sensibilità della metodica e la grande diffusione di PCV2 complicano la valutazione dell'esito, positivo anche nel caso di animali subclinici con quantità di DNA virale poco consistenti. L'approccio quantitativo della *real-time* PCR può essere quindi particolarmente utile, poiché è stata riconosciuta una correlazione fra i titoli virali e l'andamento della patologia. Sono stati individuati in animali clinicamente sani valori inferiori al *cut-off* di 10^6 copie di DNA per ml di siero o per 500 ng di tessuto, mentre gli individui ammalati possiedono una carica virale superiore a 10^7 copie di DNA per ml o per 500 ng di tessuto (Brunborg, 2004), permettendo di discriminare l'infezione dalla PMWS. La sierologia, data l'elevata prevalenza, fornisce invece strumenti più adatti a uno screening di allevamento piuttosto che individuale. I saggi più usati sono l'immunofluorescenza indiretta, l'immunoperossidasi, l'ELISA, la siero e virus neutralizzazione; questi ultimi richiedono comunque l'impiego di anticorpi marcati a fluorescenza o colorazione immunoperossidasica per visualizzare l'esito, dato che il virus non causa effetto citopatico (Opriessnig et al., 2007). L'ELISA permette una comparazione tra IgG e IgM per determinare la stadiazione dell'infezione: qualora i valori di IgM superino quelli di IgG l'infezione è recente,

approssimativamente entro i 21 giorni dall'ingresso del virus, se le IgG superano le IgM il prelievo è stato effettuato nel pieno dell'infezione (tra i 20 e 50 giorni), se invece le IgM sono negative e restano alti i valori di IgG, l'infezione che può risalire a due mesi prima, è in fase di remissione (Opriessnig et al., 2007). Per acquisire invece informazioni specifiche sulle caratteristiche genetiche dei virus circolanti si ricorre alla caratterizzazione di PCV2, eseguita tramite sequenziamento e *restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP); quest'ultima metodica rileva sostituzioni che interessino siti di restrizione enzimatica non consentendo l'azione di taglio di particolari enzimi. Il sequenziamento permette invece di analizzare il genoma virale, consentendone la classificazione, lo studio delle relazioni filogenetiche e la distribuzione geografica, ottenendo inoltre indicazioni sulla storia evolutiva, sulla variabilità di regioni specifiche, sul tasso di sostituzione e sulla pressione selettiva.

Per agevolare la contestualizzazione degli elementi finora descritti e per introdurre lo studio di questa tesi, è necessario un breve approfondimento degli aspetti più strettamente eziologici, delle principali caratteristiche strutturali e genetiche del virus e dell'aspetto tassonomico.

1.1 ASPETTI EZIOLOGICI

PCV1 e PCV2 sono i virus più piccoli (17 nm di diametro circa) autonomamente replicanti in cellule di mammifero (http://www.ictvonline.org/), hanno simmetria icosaedrica e sono privi di *envelope*, con genoma circolare ambisenso a singolo filamento di DNA (Allan and Ellis, 2000), rispettivamente di 1759 e 1766-1768 nucleotidi (Guo et al., 2010).

L'organizzazione genomica circolare è caratterizzata, in corrispondenza dell'origine di replicazione *Ori*, da una struttura a forcina (*stem-loop*), responsabile della terminazione del processo di replicazione del DNA virale (Cheung, 2007), che avviene mediante *rolling-circle replication*. Lo stelo della forcina è costituito da una sequenza palindroma di 11 basi appaiate (bp), mentre la porzione ad anello è formata da 10-12 nucleotidi (12 in PCV1, 10 in PCV2) con una sequenza conservata di 8 nucleotidi (Oc8) che comprende il sito di clivaggio o *nick* a cui si lega il complesso *Rep* per la replicazione (Cheung, 2012). Il genoma di PCV2 possiede undici possibili *open reading frames* (ORF) (Hamel et al., 1998), di cui solo tre con

funzioni note: ORF1 origina in senso orario da *Ori* ed è la regione del gene *rep* codificante le due proteine di replicazione *Rep* e *Rep'*, ORF2 è divergente rispetto a *Ori* e ORF1 e codifica la proteina capsidica *Cap* (Cheung, 2012), ORF3 è sovrapposta a ORF1 e codifica, in direzione antisenso, proteine implicate probabilmente nella patogenicità del virus e associate ad apoptosi (Chaiyakul et al., 2010). ORF1, la più lunga del genoma, è indispensabile per la replicazione del virus che, nonostante sfrutti il complesso enzimatico cellulare dell'ospite per effettuare la replicazione, necessita del complesso *Rep* di proteine virali per iniziare il processo. L'identità nucleotidica elevata (79.5-85%) (Mankertz and Hillenbrand, 2001, Mankertz et al., 2004) tra ORF1 di PCV1 e PCV2 indica l'alto grado di conservazione di questo segmento.

Il gene *rep* codifica quindi due proteine: *Rep*, costituita da 312 residui aminoacidici e trascritta dall'intera ORF1 e *Rep'*, (178 residui aminoacidici) ottenuta da *splicing* alternativo di una parte di ORF1 e costituita dai primi 122 aminoacidi di *Rep*, ma con 56 aminoacidi all'estremità C-terminali diversi in funzione del differente *frame* di lettura introdotto (Cheung, 2003). Le proteine *Rep* appartengono a una famiglia di enzimi promotori della replicazione *rolling-circle* e ne possiedono i domini aminoacidici caratteristici: RC-I, RC-II deputato alla coordinazione di ioni divalenti, RC-III dotato di un residuo tirosinico per effettuare il *nick* a livello di *Ori* e per legare covalentemente l'estremità 5' del DNA, *P-loop* con attività di elicasi e ATPasica (Cheung, 2012, Steinfeldt et al., 2007). *Rep'* contiene i primi tre domini ma non *P-loop*, non essenziale per il clivaggio dell'origine di replicazione *in vitro*, ma indispensabile per la replicazione in colture cellulari. Il processo replicativo avviene per opera degli enzimi della cellula durante la fase S, il DNA monofilamento è convertito in un intermedio a doppio filamento e superavvolto, probabilmente a partire da un *minus genome initiation primer* virale, riscontrato in *Geminivirus* e *Nanovirus* ma non ancora dimostrato in PCV. Il complesso *Rep* svolge il ds-DNA all'origine di replicazione, taglia il c-DNA in corrispondenza del *loop* per legarsi covalentemente all'estremità 5' e per esporre l'estremità 3'OH, usata come *primer*, all'azione della DNA polimerasi cellulare che sintetizza un filamento complementare fino alla struttura a forcina, determinante la terminazione della replicazione. Completata la replicazione e raggiunta la *stem-loop*, il complesso *Rep* richiude covalentemente il *loop*; dal processo replicativo si ottengono una molecola parentale di ss-

DNA circolare positivo e una molecola di ds-DNA circolare composta dal filamento parentale negativo e dal filamento di nuova sintesi (Faurez et al., 2009). La molecola a singolo filamento può essere riutilizzata nella replicazione oppure incapsidata, accumulata nel citoplasma, in attesa del rilascio delle particelle virali dalla cellula tramite esocitosi.

La seconda ORF per dimensioni, ORF2, è separata da ORF1 all'estremità 5' da *Ori* e all'estremità 3' da un'altra regione intergenica (Mankertz et al., 2004). ORF2 costituisce il gene *cap*, il cui trascritto permette la sintesi nelle cellule dell'ospite della proteina capsidica virale *Cap* (Nawagitgul et al., 2000). La proteina *Cap* è costituita da 233-234 aminoacidi (Trible et al., 2012) e presenta una massa molecolare di circa 30kDa, costituisce il capside omopolimerico a simmetria icosaedrica e partecipa al *packaging* del materiale genetico, all'adesione del virus alla cellula, all'ingresso e al trasporto del DNA virale nel nucleo cellulare (Trible et al., 2012), attraverso un segnale di localizzazione nucleare (NLS) nella porzione N-terminale. Il capside di PCV2 è inoltre responsabile della risposta immunitaria dell'ospite ed è fornito di numerosi epitopi di cui tre neutralizzanti conformazionali (47-63, 165-200, 230-233) e quattro immunodominanti lineari (residui 65-87, 117-131, 157-183, 193-207, questi ultimi due comuni a PCV1) (Ge, 2013). La ricerca degli epitopi mediante l'utilizzo di metodiche differenti (*PEPSCAN*, anticorpi monoclonali) ha portato ad alcune leggere discrepanze nell'estensione attribuita alle regioni che però risultano essenzialmente sovrapponibili. Uno degli epitopi lineari immunodominanti, CP (169-180) (Trible et al., 2012), esposto nella forma monomerica della proteina capsidica, è ritenuto un *decoy epitope*, un sito antigenico che distoglie la risposta immunitaria dagli epitopi protettivi, diminuendo l'efficacia della risposta anticorpale neutralizzante contro altri siti.

ORF3 invece non è ritenuta fondamentale per l'infezione virale o per la replicazione, ma alcuni studi hanno rilevato il ruolo di partner della proteina codificata da ORF3 nei confronti di una E3 ubiquitina ligasi, implicata nella *downregulation* di p53. L'interazione tra le due proteine determinerebbe il blocco, da parte della ligasi, della degradazione di p53, aumentandone i livelli e inducendo l'apoptosi della cellula infetta (Liu et al., 2006). Per quanto l'apoptosi non sia considerata in modo unanime uno dei meccanismi patogenetici dell'infezione da PCV2 si ritiene che, mediante l'induzione della morte cellulare, il virus sia

rilasciato favorendo l'infezione di altre cellule, l'accumulo nei macrofagi e il trasporto del materiale infettante ai linfonodi, facilitandone così la diffusione nell'organismo (Karuppannan, 2011). A ulteriore conferma, studi sperimentali *in vivo* basati sull'inoculazione di topi con stipiti di PCV2 *wild type* e PCV2 ORF3-deleto sembrano sostenere il ruolo patogenetico dell'ORF3 (Liu et al., 2006). Infine, anche la differenza di lunghezza di ORF3 (che codifica una proteina di 206 aa in PCV1 e 104 aa in PCV2) e l'identità aminoacidica (limitata al 62%) (Hamel et al., 1998) tra le regioni corrispondenti di PCV1 e PCV2, suggeriscono un possibile contributo di ORF3 alla patogenicità virale.

Recentemente è stato riportato come anche una proteina codificata da ORF4, compresa a sua volta in ORF1, sembri avere un ruolo correlato all'apoptosi, apparentemente però contrapposto al ruolo di ORF3. Prove di ibridazione hanno permesso di individuarne il trascritto durante la replicazione virale *in vitro* mentre, analisi comparative sull'attività delle caspasi 3 e 8 in cellule PK-15 infettate con PCV2 *wild type* e PCV2 ORF4-deleto, hanno riscontrato una minore attività di questi enzimi nell'infezione da *wild type*, legando quindi la presenza di una proteina codificata da ORF4 alla soppressione dello stimolo apoptotico caspasi-dipendente, presumibilmente in favore della replicazione virale (He Jialing et al., 2013). Tra le altre ORF, ORF5, 7 e 10 sono localizzate sul filamento positivo e trascritte in senso orario, mentre ORF4, 6, 8, 9 e 11 sono codificate dal DNA complementare e trascritte in direzione antisenso come ORF2 (He Jialing et al., 2013).

Sulla base di queste caratteristiche, lo studio filogenetico di PCV2 ha permesso di inserirlo, assieme a PCV1, nella famiglia *Circoviridae*, il cui nome deriva dalla natura circolare del genoma dei virus in essa raggruppati. La famiglia *Circoviridae* si divide in tre generi sulla base di differenze nell'organizzazione genomica e nella morfologia del capside: il genere *Cyclovirus* (Delwart and Li, 2012), proposto recentemente; il genere *Gyrovirus*, con il solo *Chicken anemia virus* (CAV) e il genere *Circovirus*. Tra i *Circovirus* figurano *Porcine circovirus type 1* e *Porcine circovirus type 2*, gli unici infettanti i mammiferi e *Psittacine beak and feather disease virus*, *Pigeon circovirus*, *Canary circovirus* e *Goose circovirus* (Mankertz, 2008) che colpiscono gli uccelli. *Duck circovirus* (DuCV), *Finch circovirus* (FiCV), e *Gull circovirus* (GuCV) sono ritenute specie provvisorie (http://www.ictvonline.org/) da inserire

nel genere *Circovirus*, mentre le recenti scoperte di *Raven circovirus* (RaCV) (Stewart, 2006) e *Starling circovirus* (StCV) (Johne, 2006) non ha ancora permesso di includerli definitivamente nella classificazione tassonomica (Mankertz, 2008).

Analisi filogenetiche all'interno della famiglia *Circoviridae* hanno indicato come tra *Gyrovirus* e *Circovirus* non ci siano relazioni strette (Mankertz, 2008) e come gli aspetti che distinguono il genere *Circovirus* siano le dimensioni inferiori, il genoma ambisenso, la trascrizione divergente e lo *splicing*. Mentre CAV mostra omologia con virus umani a DNA monofilamento come *Torque teno virus* (TTV) e *Torque teno mini virus* (TTMV), individuati recentemente e appartenenti alla famiglia *Anelloviridae*, si ritiene che il genere *Circovirus* sia il prodotto evolutivo di un salto di ospite (*host switching*) e di ricombinazione. Le similitudini a livello dell'origine di replicazione tra i *Circovirus* e il genere *Nanovirus*, virus delle piante, inducono a considerare quest'ultimo un progenitore dei *Circovirus* che abbia effettuato un cambio di ospite, infettando i vertebrati e predisponendosi a una ricombinazione con un virus a RNA singolo filamento, un *Calicivirus*, con cui i *Circovirus* condividono omologie nella regione C-terminale della proteina promotrice la replicazione *Rep* (Gibbs, 1999). Si esclude poi che la speciazione tra *Circovirus* suini e aviari sia avvenuta con la separazione delle classi *Aves* e *Mammalia* attraverso una coevoluzione con gli ospiti, poiché si ritiene che i *Circovirus* siano presenti da 500 anni e che quindi il salto di ospite sia avvenuto in seguito da uccelli a suini con un eventuale ospite intermedio selvatico (Firth et al., 2009, Trible and Rowland, 2012).

Il confronto delle sequenze pubblicate e le ricostruzioni filogenetiche hanno inizialmente permesso la definizione di tre diversi genotipi: 2a, 2b (Cortey et al., 2011, Segalés et al., 2008) e 2c, quest'ultimo identificato solamente in campioni danesi risalenti agli anni '80 (Dupont, 2008) La distanza genetica evidenziata fra i diversi genotipi è maggiore se si considera solo ORF2, codificante la proteina capsidica, mentre risulta inferiore in ORF1, codificante le proteine di replicazione. Firth (Firth et al., 2009) suggerisce che i due genotipi 2a e 2b derivino da un progenitore comune, piuttosto che il genotipo 2b derivi da 2a e che abbiano avuto un percorso evolutivo indipendente negli ultimi 100 anni, nonostante la condivisione di ospite e distribuzione geografica. Inoltre il tasso di mutazione di PCV2 è

considerato il più alto per un virus a ssDNA (1.2×10^{-3}), simile a quello dei virus a ssRNA, sebbene sfrutti le polimerasi della cellula ospite, dotate di attività *proofreading* per la replicazione. Quest'ultimo aspetto mantiene aperta la discussione sulla variabilità caratteristica di PCV2 e sull'esistenza di genotipi distinti. Le sequenze finora depositate e le analisi effettuate hanno dato luogo a classificazioni diverse. La più utilizzata è la classificazione proposta da Grau-Roma (Grau-Roma et al., 2008), effettuata su ORF2 in base al metodo PASC, *pairwise sequence comparisons*, che riprende la classificazione di Olvera (Olvera et al., 2007) in due genotipi 1 e 2, ma introducendo come valore di *cut-off* per la distinzione dei genotipi una *p-distance* di 0,035. Nel 2008 è stato aggiunto un nuovo genotipo, il 3 (Dupont, 2008), in seguito a uno studio condotto in Danimarca su isolati precedenti i primi episodi di PMWS; è stato quindi necessario modificare la nomenclatura attribuendo il nome PCV2a al genotipo 2, PCV2b al genotipo 1 e PCV2c al terzo genotipo (Cortey et al., 2011, Segalés et al., 2008). Erano stati proposti altri due genotipi, 2d e 2e, per i quali però non sono stati giudicati rispettati i criteri di classificazione (Cortey et al., 2011, Trible and Rowland, 2012, Wang et al., 2009). Come accennato, in uno studio condotto da Olvera (Olvera et al., 2007), è stata proposta l'esistenza di un progenitore comune a PCV1 e 2, dividendo poi PCV2 in due genotipi principali, 1 e 2, con una *p-distance* media di 0,0444 e a loro volta suddivisi rispettivamente in tre (1A-C) e cinque (2A-D) *cluster*. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti sul genoma completo, sui geni *rep* e *cap* evidenziando, tramite il confronto, la possibile sovrapposizione degli alberi ottenuti dall'intero genoma e da *cap*: la somiglianza dei risultati potrebbe essere dovuta alla variabilità di *cap* e all'esclusione dei fenomeni di ricombinazione, che coinvolgono prevalentemente la regione codificante *rep*. Nell'ambito dello stesso studio, è stata identificata la posizione di un'*indel* che distingue il genotipo 1 (1767 nucleotidi) dal 2 (1768 nucleotidi), all'inizio della regione intergenica dopo il codone stop di *cap* e, anche all'interno del cluster 1C, è stata individuata un'inserzione nell'ultimo codone di *cap*, determinante un'alterazione del *frame* di lettura e l'aggiunta di un solo residuo di lisina alla proteina (Olvera et al., 2007). Tale elemento appare condiviso da un nuovo genotipo cinese, PCV2d, anch'esso caratterizzato da un'ORF2 codificante una proteina capsidica di 234 residui aminoacidici (Guo et al., 2010).

La necessità di classificare i genotipi emergenti si è inoltre resa più chiara quando si è evidenziata la possibilità di una differente virulenza legata al genotipo e, il riscontro di un aumento della prevalenza del genotipo 2b associato a manifestazioni cliniche più intense, ha sollevato la questione di un'eventuale differenza nella patogenicità. Lo *shift* genotipico a favore di PCV2b viene fatto risalire all'inizio degli anni 2000, in concomitanza con i nuovi e più gravi episodi di PCVD sia in America sia in Europa (Cortey, 2011). Anche tramite un esame dei genotipi delle sequenze depositate provenienti da tutto il mondo, è stato possibile evidenziare un marcato aumento delle sequenze di PCV2b (Dupont, 2008). Per quanto invece le evidenze epidemiologiche indichino una maggiore virulenza di PCV2b (Allan, 2012), studi sperimentali comparativi tra i genotipi 2a e 2b non rilevano particolari differenze né la presenza di marker di virulenza, proponendo però l'esistenza di isolati con diversa virulenza all'interno dello stesso *cluster* (Opriessnig, 2008). L'immunità naturale e vaccinale promossa da PCV2a sembra essere efficace verso PCV2b (Cortey, 2011, Opriessnig, 2008), ma il confronto di test con anticorpi monoclonali sui due genotipi ha mostrato come alcuni anticorpi prodotti contro *Cap* di PCV2a non reagiscano contro PCV2b, suggerendo l'eventualità che PCV2b possa sfuggire parzialmente alla risposta immunitaria di animali già sensibilizzati contro PCV2a (Cortey, 2011).

Riguardo la virulenza, la bassa omologia (circa 60%) tra le sequenze ORF2 di PCV1 e 2, rispettivamente non patogeno e PCVD associato, induce a considerare la presenza di fattori intrinseci determinanti la virulenza, oltre alle variabili esterne, a loro volta coinvolte nella progressione della patologia (Krakowka et al., 2012). Per cercare di spiegare la tarda comparsa della patologia clinica nonostante la circolazione precedente del virus, sono state confrontate sequenze di PCV2 ricavate da campioni degli anni '70 con sequenze contemporanee, mettendo in luce come gli isolati contemporanei possiedano all'interno dell'epitopo compreso dai residui 113-139 un dominio assente nei campioni archiviati (Krakowka et al., 2012). Sono stati condotti studi per chiarire la correlazione tra l'eventuale presenza di varianti genotipiche e la patogenicità o le manifestazioni cliniche: alcuni hanno confrontato sequenze di stipiti provenienti da allevamenti affetti e non affetti da PMWS, senza riscontrare differenze che potessero mettere in relazione il ceppo all'andamento della patologia (de Boisséson et al., 2004); invece, le infezioni sperimentali di animali SPF con un

ceppo derivante da casi con lesioni da PCV2 e uno da animali senza lesioni, hanno mostrato minori viremia, presenza antigenica e lesioni negli animali inoculati con il secondo isolato, oltre a 11 differenze nucleotidiche non silenti tra i due ceppi, perlopiù in regioni immunogeniche del capside (Opriessnig et al., 2006).

Un'altra problematica rilevante nello studio molecolare di PCV2 è il fenomeno della ricombinazione, che garantisce diversità genetica e la comparsa di nuovi ceppi. Prerequisito indispensabile e riscontro comune negli animali infetti da PCV2, è la coinfezione con genotipi diversi (Khaiseb, 2011) o con ceppi differenti dello stesso genotipo (Cadar et al., 2012), così da permettere una ricombinazione inter- o intra-genotipica. Oltre al nodo delle eventuali differenze di patogenicità o proprietà antigeniche, l'isolamento di un ricombinante costituito da ORF1 di PCV1 e ORF2 di PCV2a in Canada (Gagnon, 2010), ha sollevato la questione della sicurezza del vaccino chimerico *Suvaxyn®,* ritirato dal mercato, riformulato e poi reintrodotto, con un nome commerciale diverso (*Fostera®*) (Chae, 2012).

Gli elementi finora presentati sono frutto di molteplici studi, volti all'approfondimento di un fenomeno emergente e in continua evoluzione, sia per la natura intrinseca del virus sia per lo sviluppo di strumenti diagnostici e di ricerca più accurati. La necessità di far fronte al problema pratico ha stimolato l'analisi della patologia sotto ogni aspetto, fornendo una vastissima mole di informazioni, a volte anche incongruenti, ma indispensabili per la ricostruzione di un quadro utile alla comprensione di una materia altrimenti molto complessa. Per quanto sia disponibile una nutrita bibliografia in merito a studi filogenetici di PCV2 e di caratterizzazione virale svolti in tutto il mondo, riguardo alla situazione italiana sono presenti pochi dati. Il settore suinicolo italiano concentra la propria produttività prevalentemente in Nord Italia, dove è localizzata la quasi totalità degli allevamenti. La vicinanza geografica e la stretta connessione dei processi produttivi influenzano, come accennato, l'epidemiologia dei patogeni circolanti e la loro diffusione. È forte pertanto l'esigenza di acquisire anche dati epidemiologici italiani, relativi a PCV2, che forniscano una conoscenza più approfondita degli aspetti molecolari del virus, della prevalenza, della circolazione e della provenienza dei vari genotipi. Questo studio propone, quindi, una prima valutazione dell'epidemiologia molecolare di PCV2 in Italia, descrivendo la classificazione dei

genotipi identificati, le relazioni filogenetiche presenti, gli eventi di ricombinazione, la variabilità dei ceppi e la pressione selettiva che la può determinare. Tali informazioni possono aggiungere nuovi dati fruibili nell'ambito della ricerca, ma potrebbero anche incidere sull'approccio gestionale di allevamento piuttosto che sul controllo e la profilassi, portando a una maggior consapevolezza della situazione epidemiologica nel nostro paese e dei legami tra gli scambi commerciali, la movimentazione degli animali e la circolazione del virus.

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI

Grazie alla collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e con altri laboratori privati operanti nel Nord Italia, è stato possibile ottenere 97 aliquote di campioni risultati positivi per PCV2 nell'ambito della routinaria attività diagnostica. Alcuni di questi campioni erano già stati testati anche nell'ambito di progetti di tesi precedenti. I campioni utilizzati sono stati acquisiti in un periodo dal 2007 al 2013, da trentanove aziende del Nord-Est e da cinque cinghiali (Tab. 2), prelevati durante le stagioni di abbattimento nel Parco dei Colli Euganei.

PROVINCIA	NUMERO AZIENDE PER PROVINCIA	NUMERO CAMPIONI PER PROVINCIA
Brescia	2	2
Cremona	2	3
Mantova	4	5
Padova	7	8
Pordenone	2	2
Rovigo	1	1
Treviso	13	35
Udine	3	3
Venezia	2	8
Verona	1	1
Vicenza	2	7
Colli Euganei	-	5 (cinghiali)
11 province	39 aziende	80 campioni

Tabella 2: Riepilogo provenienza dei campioni.

A ogni azienda è stato attribuito un numero progressivo per l'identificazione, mentre dei campioni è stato mantenuto l'identificativo conferito al momento del prelievo con l'aggiunta della provincia dell'azienda, del numero assegnato e della data di raccolta.

I campioni consistevano in tessuti o siero, dai quali sono state prelevate aliquote rispettivamente di 25±5 mg o 200 µL, per l'estrazione del DNA. La procedura di estrazione è stata effettuata mediante *DNeasy®Blood & Tissue Kit* (Qiagen), secondo le istruzioni fornite dal produttore. Dopo la raccolta, tra le fasi di aliquotazione ed estrazione e successivamente a quest'ultima, i campioni sono stati conservati a -20° C.

2.2 DATABASE

Per catalogare i campioni, l'avanzamento delle analisi e i risultati ottenuti è stato organizzato un archivio, regolarmente aggiornato, in Microsoft© Excel® 2010 con le seguenti voci:

- Identificativo del campione
- Data di raccolta
- Azienda di provenienza
- Numero progressivo associato all'azienda
- Località e provincia
- Risultato della PCR per ogni segmento A, B, C, D amplificato (intensità della banda: buona/debole/con aspecifico/negativo)
- Data in cui è stata eseguita la PCR
- Purificazione dell'amplificato da prodotto di PCR o da gel
- Quantità di purificato utilizzata per il sequenziamento
- Qualità della sequenza ottenuta (buona/corta/non leggibile)
- Sequenza completa

2.3 DISEGNO DEI PRIMER

Al fine di amplificare e successivamente sequenziare l'intero genoma virale, sono state disegnate diverse coppie di *primer* utilizzando il programma *Primer3Plus* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi).

Particolare attenzione è stata riservata alla scelta della dimensione degli amplificati, per poter garantire contestualmente un'elevata efficienza di reazione di PCR e la sequenziabilità con il metodo *Sanger*. Per ciascun segmento è stata inoltre prevista una sovrapposizione con quelli adiacenti di almeno 100 bp, che permettesse un'agevole concatenazione degli stessi.

Sono state quindi disegnate delle coppie di *primer* che consentissero di amplificare il genoma virale suddividendolo in quattro segmenti di lunghezza compresa fra 542 e 675 bp. Per uniformare, per quanto possibile, i successivi protocolli di PCR, si è cercato di ottenere oligonucleotidi che presentassero analoghe caratteristiche chimiche e termodinamiche. La presenza di omo- ed etero-dimeri nelle diverse coppie di *primer* è stata valutata *in silico* utilizzando il programma *OligoAnalyzer 3.1*. Le successive prove sperimentali hanno permesso di selezionare, sulla base del confronto fra la concentrazione e la specificità dell'amplificato ottenuto, quattro coppie di *primer* che sono state utilizzate nello svolgimento della tesi (Tab. 3).

Ulteriori quattro *primer forward*, interni rispetto ai *primer* utilizzati per la PCR, sono stati progettati con caratteristiche adeguate ai protocolli previsti per il sequenziamento, con l'obiettivo di garantirne la maggior efficienza e qualità del cromatogramma.

SEGMENTO	PRIMER	LUNGHEZZA PRODOTTO	POSIZIONE[1]
A Fw	5'-CACCTCAGCAGCAACATGCC-3'	544	36-55
A Rv	5'-CAGGTGGCCCCACAATGACGTGTAC-3'	544	555-579
B Fw	5'-AGTACCTTGTTGGAGAGCGGGAGTC-3'	542	420-444
B Rv	5'-GGGGGGGAAAGGGTGACGAACTGG-3'	542	939-961
C Fw	5'-TCTACTGAGACTGTGTGATCG-3'	746	725-745
C Rv	5'-CTCTGTRCCCTTTGAATACT-3'	746	1449-1468
D Fw	5'-GGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGTC-3'	675	1293-1320
D Rv	5'-ATTACCCTCCTCGCCAACAA-3'	675	181-200
A seq Fw	5'-CAGCAAGAAGAATGGAAGAA-3'	523	56-75
B seq Fw	5'-AGTCTGGTGACCGTTGC-3'	520	441-457
C seq Fw	5'-TGATCGATATCCATTGACTG-3'	728	740-759
D seq Fw	5'-ACATAGGGGTCATAGGTGAG-3'	658	1310-1329

Tabella 3: *Primer* utilizzati per l'amplificazione del genoma (Fw: primer forward; Rv: primer reverse).
[1]Posizione nucleotidica relativa al genoma di PCV2 (Accesion Number AY484412).

2.4 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE

La prima fase dell'analisi dei campioni mediante PCR è stata finalizzata alla validazione del protocollo da utilizzare. Per ottimizzare la specificità e la quantità dell'amplificato ottenibile e per valutare le migliori condizioni di reazione per ogni segmento, sono state effettuate alcune prove variando sia le concentrazioni dei reagenti sia il protocollo termico, fino a ottenere un protocollo ottimale unico per i segmenti A, C, D e uno distinto per il segmento B. Sono stati utilizzati quindi due profili di amplificazione: il primo, per i segmenti A, C e D, con una prima fase di incubazione a 94° C per 2 minuti per ottenere la denaturazione del templato e l'attivazione dell'enzima, poi 45 cicli composti da denaturazione a 94° C per 30 secondi, *annealing* a 60° C per 30 secondi, estensione a 72° C per 50 secondi, seguiti da una fase di estensione finale a 72° C per 5 minuti; il protocollo per il segmento B differiva per numero di cicli (i.e. 40 cicli), nelle impostazioni delle fasi di *annealing* (65° C per 30 secondi) ed estensione (72° C per 45 secondi).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con il termociclatore *2720 Thermal Cycler®* (Applied Biosystems®) in un volume di reazione finale di 35 µL. Il kit utilizzato per l'amplificazione è *Platinum® Taq DNA polymerase* (Life Technologies Corporation), con mix di reazione costituita da *1X PCR Buffer Minus Mg,* 0.2 mM di ciascun *nucleotide trifosfato,* 1,5 mM di $MgCl_2$, 0,5 µM di ciascun *primer,* 1U di *Platinum® Taq DNA polymerase* e 100 ng di DNA estratto. Essendo già nota la positività dei campioni, a ogni reazione è stato aggiunto solo il bianco per il controllo.

Data la disponibilità per ogni segmento di *primer* appositi per il sequenziamento, disegnati internamente ai *primer forward,* sono state eseguite anche reazioni di *eminested* PCR sugli amplificati primari, utilizzando la coppia costituita da *primer* da sequenziamento e *reverse*, lo stesso kit e i medesimi protocolli termici per i singoli segmenti. Questa ulteriore procedura è stata applicata solamente ai campioni che mostrassero bande di debole intensità dopo l'elettroforesi, in modo da massimizzare l'amplificazione del solo DNA di interesse.

2.5 ELETTROFORESI

I prodotti di PCR sono stati caricati con addensante *6X DNA Loading Dye®* (Thermo Fisher Scientific), su gel di agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution®* (EuroClone S.p.A.) e sottoposti a una differenza di potenziale costante di 100V per 40 minuti, in *buffer TBE 1X*. Dopo la corsa elettroforetica le bande sono state visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc XR System®* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette). La lunghezza e la specificità di ogni amplificato sono state valutate tramite comparazione con uno standard a peso molecolare e concentrazione noti, *GeneRuler 100bp DNA Ladder®* (Thermo Fisher Scientific), caricato su gel assieme ai campioni. Il confronto con il marcatore di peso molecolare ha permesso inoltre di stimare la concentrazione di DNA presente in ogni banda, per poterne utilizzare un quantitativo adeguato nella reazione di sequenziamento. Qualora fossero ancora presenti aspecifici, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica prolungata per distanziare maggiormente le bande e permettere la purificazione del campione da gel, prelevando solo la banda di interesse.

2.6 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

La purificazione degli amplificati ottenuti si è resa necessaria per agevolare il sequenziamento, eliminando *primer*, sali, nucleotidi ed enzimi, residui dalla reazione di PCR che avrebbero potuto inibire i passaggi successivi. A tal fine è stato utilizzato il kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG), secondo le specifiche fornite dalla Ditta produttrice, che ha permesso di processare i campioni sia da prodotto di PCR sia tagliati da gel. I purificati sono stati raggruppati per segmento e conservati a -20° C.

2.7 REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE PER IL SEQUENZIAMENTO

L'allestimento delle piastre per il sequenziamento è stato preceduto da una fase di organizzazione della disposizione dei campioni e di stima delle quantità di purificato da sottoporre alla reazione. Ogni campione è stato sequenziato, in ogni segmento, utilizzando sia i *primer forward*, disegnati appositamente per il sequenziamento, sia i *primer forward* e *reverse* sfruttati nelle reazioni di PCR, al fine di incrementare la confidenza nella correttezza della sequenza ottenuta.

La reazione di sequenziamento è stata eseguita con il kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1®* (Life Technologies Corporation), secondo le indicazioni dei fornitori, in un volume finale di 10 µL. Per ciascun amplicone è stato quindi analizzato un quantitativo di DNA pari a 1-2 ng ogni 100 bp di lunghezza dell'amplificato. Essendo stati utilizzanti molteplici *primer* e volumi variabili di purificato a seconda della concentrazione del DNA, in ciascun pozzetto sono stati aliquotate 1,6 pM di *primer* specifico e un volume adeguato di purificato. La piastra è stata quindi essiccata per 30 minuti a 65° C in modo da non dover adeguare il volume e la composizione della mix di reazione a ogni singolo pozzetto. Il protocollo termico, ottimizzato per massimizzare l'efficienza di sequenziamento, prevedeva 30 ripetizioni del ciclo 95°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi e 55°C per 4 minuti. Alla reazione di sequenziamento è seguita una fase di precipitazione dal DNA; a ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µL di isopropanolo al 75%, le piastre sono state incubate 15 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugate per 45 minuti a 3000 rpm, per far sedimentare il DNA flocculato. L'isopropanolo surnatante è stato eliminato capovolgendo su carta assorbente e centrifugando a 600 rpm per 1 minuto le piastre e lasciandolo evaporare a temperatura ambiente per 15 min. I *pellet* ottenuti sono stati risospesi in 15 µL di acqua, qualora sia stata effettuata subito la lettura, oppure le piastre sono state conservate a -20° C.
La lettura delle piastre è stata effettuata mediante elettroforesi capillare con lo strumento *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer®* (Life Technologies Corporation), cortesemente messo a disposizione dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

2.8 ANALISI DELLE SEQUENZE

Ogni elettroferogramma ottenuto è stato inizialmente analizzato con il software *FinchTV* (http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml) per valutarne la qualità del segnale, la definizione dei picchi, l'eventuale presenza di rumore di fondo e per eliminare il tratto iniziale di sovrapposizione con i *primer*, cercando così di evitare l'inclusione di artefatti nei dati raccolti. Tutti i cromatogrammi di ogni segmento, ottenuti in *forward* e *reverse,* sono stati assemblati e sovrapposti ai segmenti adiacenti con il software *ChromasPro v1.45* (Technelysium Pty Ltd.), per ottenere sequenze consenso della lunghezza totale del genoma di PCV2. L'utilizzo e il confronto di più cromatogrammi di uno stesso tratto ha permesso di

conferire un grado maggiore di confidenza alle sequenze acquisite, verificate poi con una ricerca in *BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Le sequenze complete sono state allineate dapprima singolarmente a due sequenze depositate di PCV2a e 2b, con il software *MEGA6 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0* (Tamura, 2013) sono state quindi controllate e ripulite dei tratti che si ripetevano, a causa della natura circolare del genoma virale e della parziale sovrapposizione dei diversi segmenti. Le sequenze definitive sono state copiate progressivamente in un file Microsoft© Word® 2010 temporaneo.

2.9 ANALISI BIOINFORMATICHE

Le sequenze del genoma completo ottenute in questo studio sono state allineate alle sequenze di riferimento proposte da Olvera (Olvera et al., 2007) utilizzando il metodo MUSCLE, implementato in MEGA6 (Tamura, 2013). Similmente le sequenze del tratto corrispondente a ORF2 sono state allineate al medesimo database di riferimento. In quest'ultimo caso, al fine di rispettare la natura codificante della regione, le sequenze sono state allineate fra loro a livello amminoacidico e successivamente è stata sovraimposta la corrispondente sequenza nucleotidica. L'analisi della ricombinazione è stata eseguita utilizzando i metodi RDP, GENECONV, *MaxChi*, *Bootscan* and *3Seq* presenti nel programma RDP3 (Martin, 2010). I parametri di analisi di ciascun metodo sono stati configurati in funzione delle caratteristiche del database, secondo quanto suggerito del manuale del software stesso. Al fine di ottenere una stima conservativa degli eventi di ricombinazione, questi sono stati accettati qualora fossero rilevati, da più di 2 metodi, con un livello di significatività statistica di $p < 0.01$, assumendo la correzione di Bonferroni per confronti multipli.

Gli alberi filogenetici sono stati ricostruiti a partire da questi allineamenti utilizzando un approccio di *Maximum Likelihood* avvalendosi del software PHYML (Guindon et al., 2010). La robustezza della topologia ottenuta è stata valutata utilizzando il *Shimodaira–Hasegawa approximate likelihood ratio test* (SH-aLRT) (Anisimova et al., 2011). Il modello di sostituzione nucleotidica più adeguato al database utilizzato è stato selezionato considerando i risultati del *Akaike's information criterion* (AIC) calcolato utilizzando *Jmodeltest* 2.1.2 (Darriba et al., 2012). Per facilitare la rappresentazione grafica e la

comprensione, le sequenze italiane sono state allineate con una sola sequenza di referenza per ciascuna delle *clades* proposte da Olvera (Olvera et al., 2007) e gli alberi filogenentici sono stati ricostruiti utilizzando il metodo *Neighbour Joining* implementato in MEGA6 (Tamura, 2013), calcolando la distanza genetica in termini di *p-distance*. Sulla base dei risultati della classificazione è stato possibile calcolare le distanze nucleotidiche e amminoacidiche medie e il *range* caratteristico del genoma completo e di ciascuna ORF. Per il genoma completo e per la sola ORF2, questi valori, sono stati valutati anche all'intero di ciascun genotipo. Infine è stata calcolata la distanza genetica media fra i genotipi identificati.

Sul database costituito dalle sole sequenze italiane, sono stati calcolati con *BioEdit* (Hall, 1999) i valori di Entropia di *Shannon* E(H) per ciascuna posizione nucleotidica e amminoacidica di ciascuna proteina (*Rep, Rep', Cap,* ORF3 e ORF4). Brevemente, i valori di entropia danno un'indicazione della variabilità caratteristica di ciascuna posizione dell'allineamento relativamente ad altre. In questo modo è stato possibile valutare le regioni maggiormente variabili di ciascun gene e confrontare la variabilità nucleotidica con quella amminoacidica, fornendo una prima panoramica sia sull'interazione fra geni diversi condividenti la stessa regione genomica sia sulla possibile azione delle forze evolutive nel condizionare l'evoluzione virale. L'azione delle pressione selettiva nei diversi siti è stato studiata utilizzando un più robusto approccio matematico stimando, con dei metodi di *Maximum Likelihood* e di inferenza bayesiana il rapporto fra il tasso di sostituzione non-sinonimo (dN) e il tasso di sostituzione sinonimo (dS).

Se si assume che la selezione agisca in modo meno intenso nei confronti delle mutazioni silenti, l'analisi del tasso di sostituzione sinonimo e non-sinonimo dovrebbe riflettere l'azione della selezione stessa. Un dN/dS > 1 (o similmente un dN-DS > 0) suggerisce la presenza di una pressione selettiva diversificante, favorente la variabilità amminoacidica in quel sito. Analogamente valori di dN/dS inferiori a 1 sono indicativi di una pressione selettiva purificante, indicativa dell'effetto svantaggioso sulla fitness virale di mutazioni amminoacidiche (comportanti diverse caratteristiche fisico chimiche) in un particolare sito.

Per massimizzare le informazioni ottenibili sono stati utilizzati diversi metodi, inclusi nel programma HYPHY (Pond, 2005), per la stima dei siti sottoposti a pressione selettiva diversificante/purificante di tipo pervasivo (SLAC, FEL, FUBAR) o episodico (MEME). L'ipotesi

di un'evoluzione neutrale (i.e.dN/dS=1) è stata rifiutata per valori di significatività statistica $p < 0.05$ (SLAC, FEL e MEME) o per valori di probabilità a posteriori > 0.9 (FUBAR). In particolare si è scelto di considerare un sito come sottoposto a pressione selettiva non neutrale quando tutti i metodi concordassero nel attribuire un valore dN/dS > 1 (pressione selettiva diversificante) o dN/dS < 1 (pressione selettiva purificante) e almeno uno di questi fosse statisticamente significativo. I siti identificati da MEME sono stati direttamente accettati come significativi, indipendentemente dai risultati degli altri test, data la capacità di MEME di identificare siti sottoposti a pressione selettiva diversificante di tipo episodico.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 VALIDAZIONE PROTOCOLLO PCR ED ELETTROFORESI

Le prove effettuate sui vari segmenti hanno dato origine a due protocolli termici distinti che garantissero elevata specificità ed efficienza di reazione (Tab. 4).

	SEGMENTO A	SEGMENTO B	SEGMENTO C	SEGMENTO D
INCUBAZIONE	94°C, 2’	94°C, 2’	94°C, 2’	94°C, 2’
DENATURAZIONE	94°C, 30’‘	94°C, 30’‘	94°C, 30’‘	94°C, 30’‘
ANNEALING	60°C, 30’‘	65°C, 30’‘	60°C, 30’‘	60°C, 30’‘
ESTENSIONE	72°C, 50’‘	72°C, 45’‘	72°C, 50’‘	72°C, 50’‘
CICLI	45	40	45	45
ESTENSIONE FINALE	72°C, 5’	72°C, 5’	72°C, 5’	72°C, 5’

Tabella 4: Protocolli definitivi utilizzati per la reazione di PCR.

Dal punto di vista pratico, l’utilizzo di due soli protocolli ha permesso di analizzare parallelamente segmenti diversi per lo stesso campione, in modo da fornire anche la possibilità di un confronto della qualità del singolo segmento amplificato rispetto agli altri, per valutare l’andamento della reazione. Il ricorso a reazioni *eminested* PCR è stato deciso quindi per ottimizzare il risultato delle prove meno soddisfacenti su alcuni segmenti. Durante la fase di validazione, le prime corse elettroforetiche (Fig. 2-3) hanno facilitato l’individuazione delle problematiche causate da tempi o temperature di reazione non adeguati. La presenza di bande aspecifiche o poco significative è stata risolta con l’adozione dei protocolli definitivi.

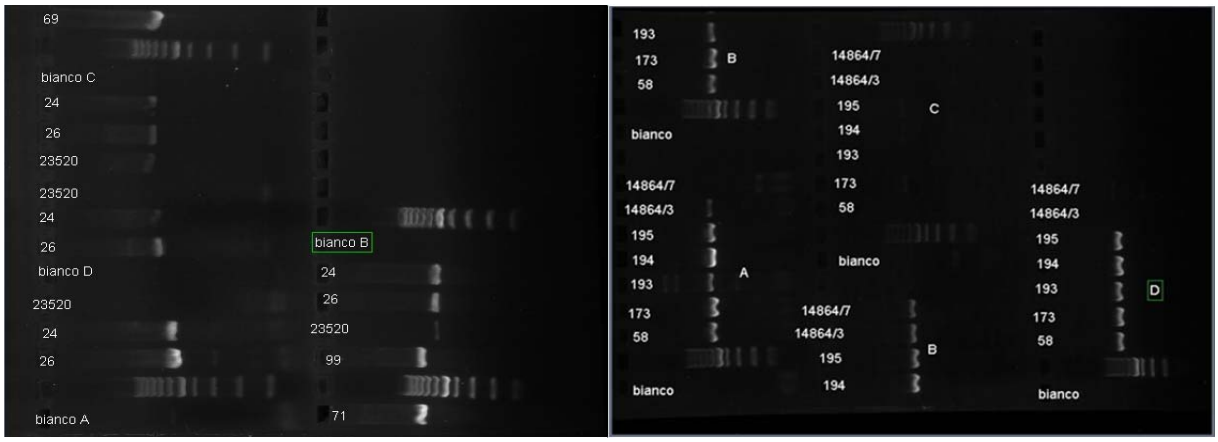

Figura 2 (a-b): Prime prove nella fase di valutazione dei protocolli di PCR, comparazione dei segmenti A B C D.

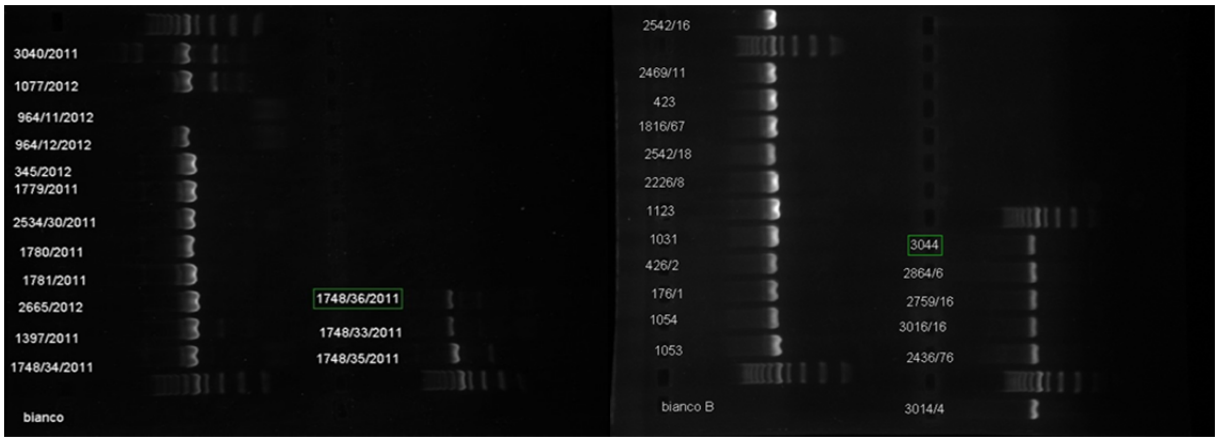

Figura 3 (a-b): Segmento A e segmento B; risultati ottenuti con i protocolli definitivi, gli aspecifici (3a) presenti sono stati eliminati estraendo le bande di interesse da gel.

3.2 ANALISI BIOINFORMATICHE DELLE SEQUENZE

3.2.1 CLASSIFICAZIONE

La caratterizzazione delle sequenze ottenute è stata effettuata tramite il confronto con sequenze di riferimento depositate, in base alla distinzione tra i genotipi 2a, 2b, 2c e 2d proposta da Segalés, Grau-Roma, Dupont e Guo (Dupont, 2008, Grau-Roma et al., 2008, Guo et al., 2010, Segalés et al., 2008); sono state ulteriormente suddivise nei vari *cluster* (tre per PCV2b, cinque per PCV2a) proposti da Olvera (Olvera et al., 2007). Le sequenze esaminate sono rientrate per il genotipo 2b nei *cluster* 1A/B e per il genotipo 2a nei *cluster* 2D ed E.

La classificazione è stata impostata utilizzando sia il genoma completo sia il solo tratto ORF2, i due alberi sono stati confrontati e si sono rivelati in sostanziale accordo (Fig. 4-5). Gli alberi qui riportati sono stati allestiti con una sola referenza per *cluster* (Olvera et al., 2007), per renderne più semplice rappresentazione e visualizzazione, senza però alterarne il significato. Gli alberi utilizzati per stabilire la classificazione comprendono invece un numero maggiore di sequenze di riferimento, agevolando una clusterizzazione più stringente delle sequenze studiate. Le sequenze sono state così distribuite: 3 sequenze appartengono al genotipo 2a, 56 sequenze al genotipo 2b e 6 sequenze al genotipo 2d. Nel confronto tra gli alberi ottenuti a partire dal genoma completo e dalla sola ORF2, sono state tuttavia riscontrate delle leggere differenze nella topologia, riconducibili alla presenza di stipiti ricombinanti (Fig. 4-5).

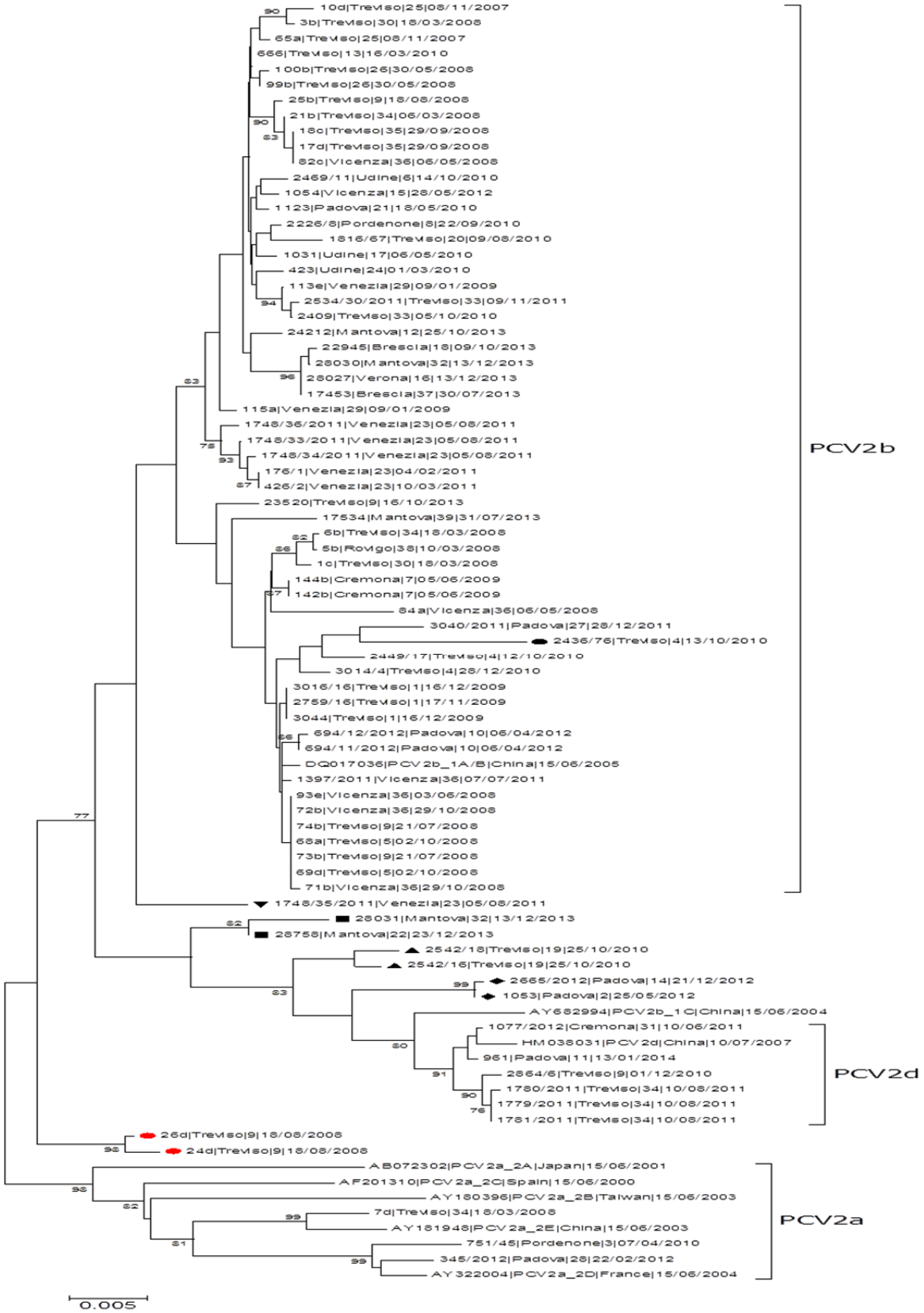

Figura 4: Albero costruito su genoma completo utilizzando il metodo *Neighbor Joining* (NJ) con 1000 replicati di *bootstrap*. La lunghezza dei rami è espressa in termini di *p-distance*. Le sequenze ricombinanti sono evidenziate da differenti simboli che rappresentano diversi eventi.

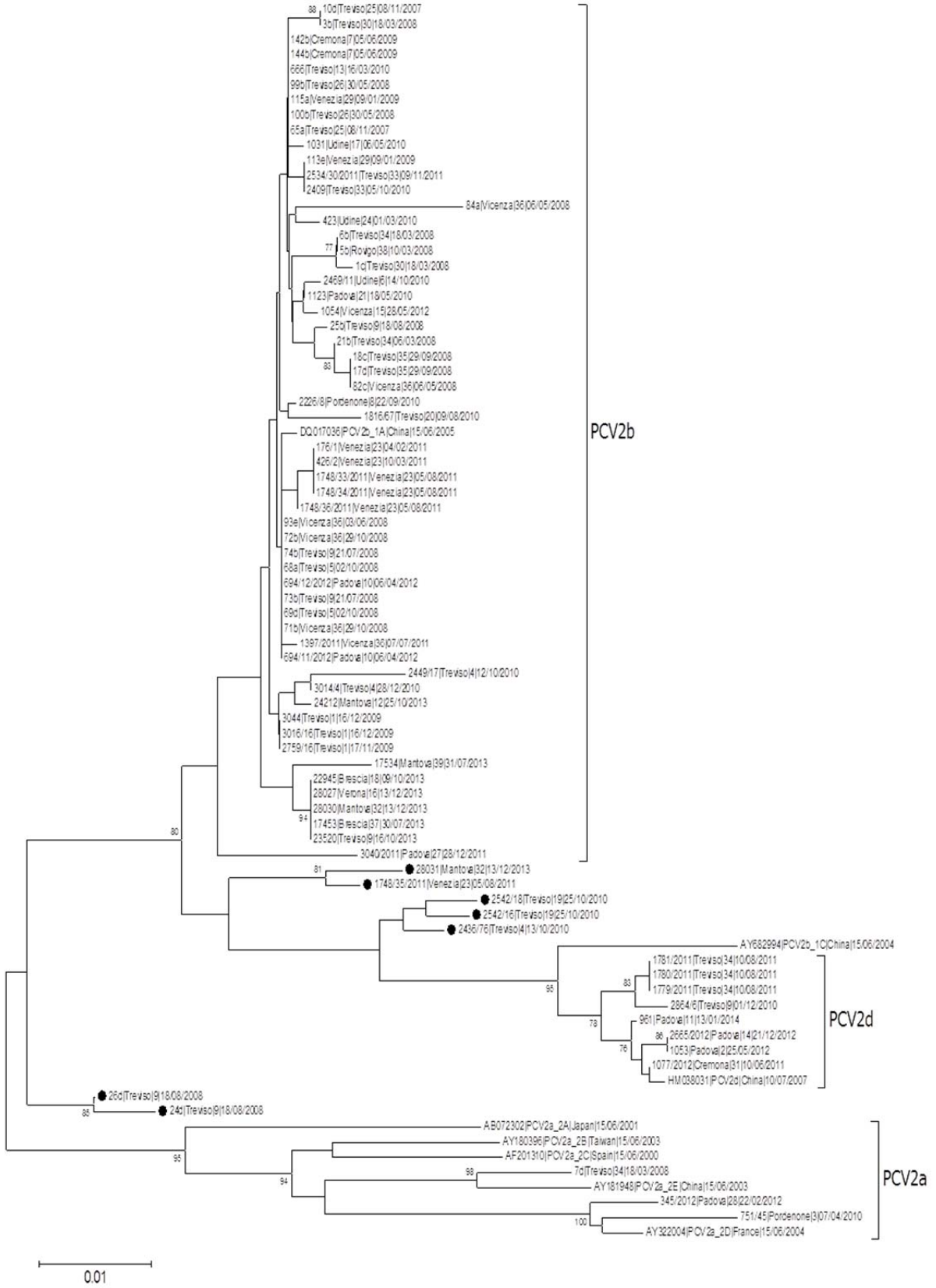

Figura 5: Albero costruito sulla base del ORF2 utilizzando il metodo *Neighbor Joining* (NJ) con 1000 replicati di *bootstrap*. La lunghezza dei rami è espressa in termini di *p-distance*.

Mentre in entrambi gli alberi emerge la presenza di 2 sequenze ricombinanti che si collocano tra i genotipi 2a e 2b, grazie a successive analisi sono stati identificati complessivamente 10 ricombinanti riconducibili a 6 distinti eventi di ricombinazione (Tab. 5). Uno di questi racchiude stipiti appartenenti ai genotipi PCV2a e PCV2b, quattro eventi hanno rilevato stipiti parentali appartenenti al genotipo Pcv2d e Pcv2b, mentre in un caso sono risultati coinvolti i genotipi PCV2d e PCV2a. La maggior parte dei *breakpoint* sono stati predetti all'interno dell'ORF1 (10) e dell'ORF2 (6), i restanti 4 coinvolgono in egual misura le regioni intergeniche. È interessante notare come non sempre la ricombinazione possa determinare un'alterazione nella classificazione dei diversi stipiti, ma questa si manifesti in funzione dell'estensione e dalle caratteristiche del segmento interessato. A dimostrazione di questa valutazione si può considerare come dalla sola osservazione dell'albero costruito sul genoma completo siano ipotizzabili, in funzione della posizione intermedia rispetto ai genotipi riconosciuti, almeno 9 ricombinanti, mentre nell'albero impostato sul gene *cap* siano evidenti solo 7 dei ricombinanti individuati, probabilmente per la posizione esterna a ORF2 dei *breakpoint* di ricombinazione nelle altre sequenze.

Oltre a quelli sopraccitati sono stati stimati altri eventi di ricombinazione che tuttavia, coinvolgendo anche molte altre sequenze originate da stipiti campionati in diversi continenti, non sono stati elencati nel presente studio, in quanto riconducibili alla variabilità mondiale del virus caratterizzata dalla circolazione su vasta scala di virus ricombinanti. Nell'insieme queste evidenze esemplificano la difficoltà di definire una classificazione stabile e rigorosa, dovendosi confrontare con stipiti ricombinanti la cui identificazione è spesso funzione del database a disposizione e delle metodiche utilizzate.

EVENTO	GENOMA COMPLETO	ORF2	RICOMBINAZIONE	INIZIO	FINE
1 (2 seq)	PCV2d	PCV2d	2a(cluster 2B)-2d	40	897
2 (2 seq)	PCV2d	PCV2d	2b(cluster 1A)-2d	1389	795
3 (2 seq)	PCV2a/PCV2b	PCV2a/PCV2b	2a(cluster2E/D)-2b(1A)	1437	1722
4 (2 seq)	PCV2d	PCV2b (cluster 1A/B)	2b(cluster 1B)-2d	817	1459
5 (1 seq)	PCV2d	PCV2b (cluster 1A/B)	2b(cluster 1A)-2d	1354	1641
6 (1 seq)	PCV2d	PCV2d	2b(cluster 1A)-2d	817	1369

Tabella 5: Descrizione degli eventi di ricombinazione e della collocazione delle sequenze nella classificazione effettuata analizzando sia l'intero genoma sia ORF2.

Nella rappresentazione grafica allegata non sono inserite le sequenze provenienti dai cinghiali (Fig. 4-5). Le sequenze ottenute, infatti, sono incomplete e l'informazione parziale in esse contenuta, altera la topologia dell'albero, rendendone meno intuitivo il significato. Ne è stata comunque effettuata la classificazione, attribuendo al genotipo 2b due campioni che si collocano in stretta relazione con altre sequenze acquisite in questo studio e presenti negli allevamenti, assegnando invece al genotipo 2a le rimanenti tre sequenze. La particolarità di queste ultime risiede nell'appartenenza al *cluster* 2C del genotipo 2a, non rilevato tra le sequenze di allevamento analizzate. Per quanto i limiti del database possano aver determinato una sottostima della prevalenza del genotipo 2a e, le informazioni ottenute da animali selvatici non siano assolutamente significative ai fini di una valutazione approfondita in merito, si potrebbe speculare come il genotipo 2a, in decremento in ambito produttivo, possa essere invece mantenuto in una popolazione *reservoir* più chiusa come quella selvatica.

3.2.2 DISTRIBUZIONE

Associando a ogni identificativo dei campioni la data del prelievo e l'indirizzo dell'azienda, è stato possibile ricostruire con *Google© Maps* una mappa della distribuzione geografica e temporale dei vari genotipi. L'area su cui si distribuiscono i campioni è di circa 28000 km^2, ripartita tra le regioni Friuli-Venezia Giulia, Veneto e Lombardia. La mappa (Fig. 6) mostra la provenienza di tutte le sequenze, distinte per genotipo con i ricombinanti inclusi ed evidenziati. Si denota così graficamente la predominanza del genotipo 2b, maggiormente rappresentato e diffuso sul territorio, seguito dai genotipi 2d e 2a.

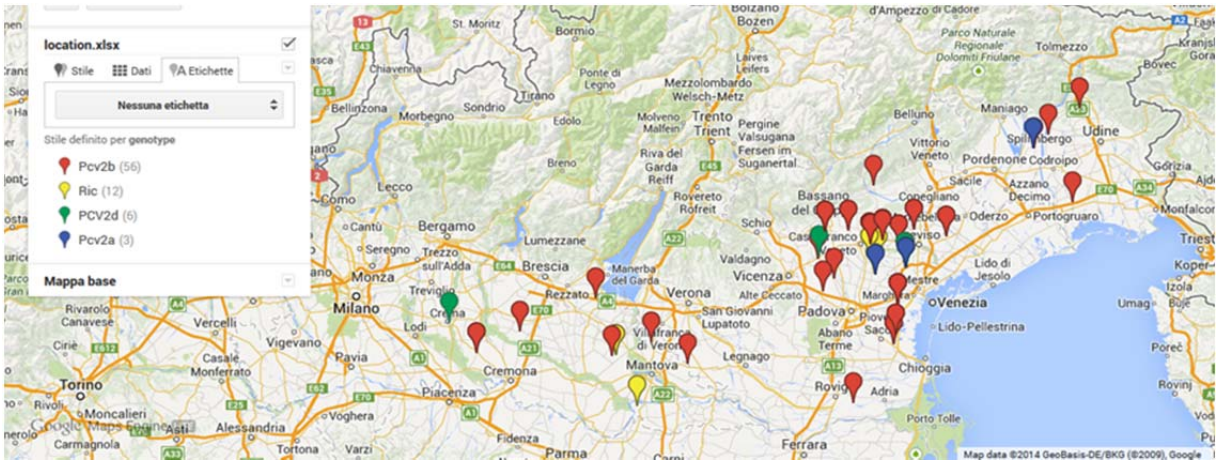

Figura 6: Distribuzione dei genotipi nel Nord Est.

La prevalenza del genotipo 2b, con sequenze databili fin dall'inizio del campionamento (2007), risulta quindi in linea con i dati provenienti dal resto del mondo riguardanti lo *shift* genotipico, il genotipo 2a appare poco rappresentato. Questo studio ha altresì permesso di identificare, per la prima volta in Italia a partire dal 2010, il genotipo 2d, precedentemente descritto in Cina da campioni risalenti al 2007. (Guo et al., 2010) (Fig. 7).

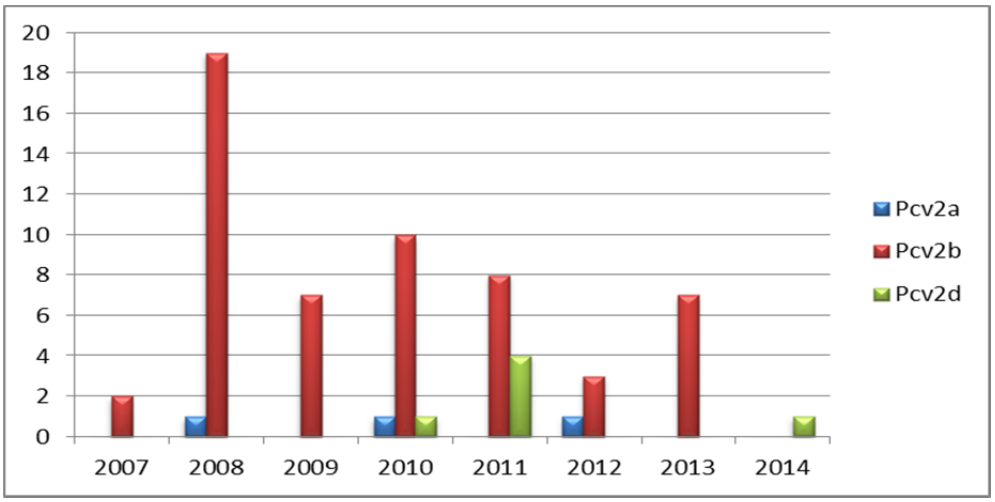

Figura 7: distribuzione temporale dei genotipi.

Particolare attenzione è stata riservata alle sequenze ricombinanti (Fig. 8), riunite in base all'evento di ricombinazione (Tab. 5). Si può osservare come gli stipiti riconducibili agli stessi eventi di ricombinazione, siano stati campionati in aree geografiche contigue e in un limitato lasso di tempo. Tale elemento può suggerire valutazioni riguardanti la reale *fitness* degli stipiti ricombinanti, con una ridotta capacità di diffusione o di persistenza.

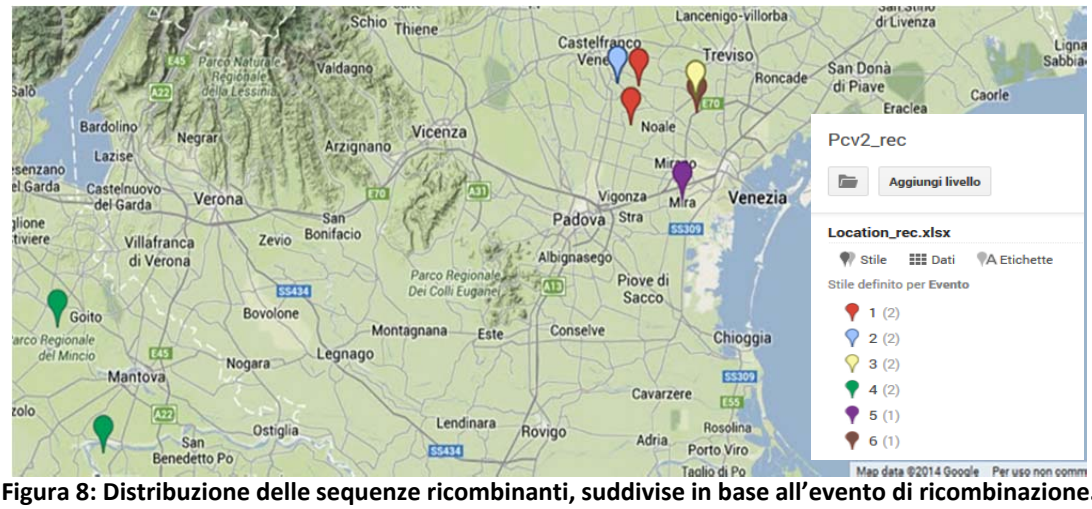

Figura 8: Distribuzione delle sequenze ricombinanti, suddivise in base all'evento di ricombinazione.

Si è cercato di individuare per ogni sequenza ricombinante le probabili sequenze parentali, ma non è stato possibile associare con certezza un ricombinante a due singole sequenze, data l'elevata similarità del pool di sequenze campionate. In due casi però (Fig. 9) sono state proposte situazioni particolari: in un caso è stata ipotizzata una triangolazione tra due eventi distinti di ricombinazione, identificati in aziende limitrofe, che potrebbero condividere i medesimi stipiti parentali o quantomeno stipiti altamente similari (Fig. 9a); nell'altro, in virtù del riscontro di possibili parentali derivanti da uno stesso allevamento vicino alla struttura in cui è stato individuato il ricombinante, è stata avanzata l'ipotesi di una possibile diffusione da un allevamento all'altro (Fig. 9b). Valutazioni di questo tipo sono da considerare puramente speculative, data l'intensità del campionamento e i limiti tecnici dei software attualmente disponibili.

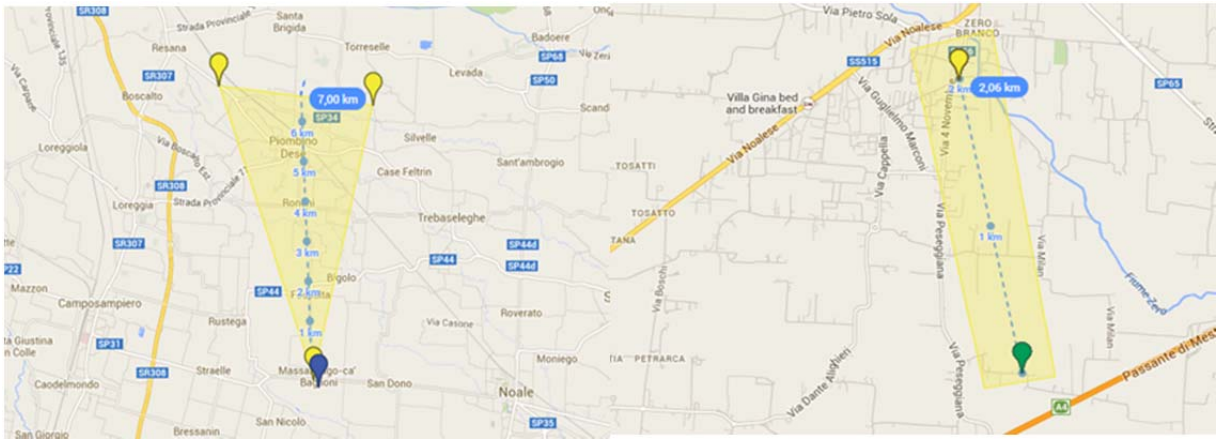

Figura 9 (a-b): Rappresentazione delle distanze tra sequenze probabilmente correlabili a eventi di ricombinazione.

3.2.3 VARIABILITÀ

La variabilità è stata analizzata sul genoma intero, su porzioni distinte di genoma e con un confronto tra genotipi, senza escludere le sequenze ricombinanti. La variabilità (Tab. 6) della sequenza nucleotidica del genoma completo è stata valutata entro e fra i singoli genotipi: i genotipi 2a, 2b e 2d possiedono una rispettiva lunghezza di 1768, 1767 e 1767 nucleotidi e una *p-distance* media di 0,023 (*range* 0,01-0,03), 0,01 (0-0,025), 0,003 (0,001-0,006). Non è stata valutata la variabilità aminoacidica poiché il genoma virale contiene anche regioni non codificanti. Per ORF2 sono state valutate la variabilità nucleotidica e aminoacidica tra tutte le sequenze, intra- e inter-genotipica. L'analisi sul database completo ha permesso di calcolare

valori di *p-distance* nucleotidica media pari a 0,026, con un *range* di 0-0,011 e una lunghezza di 699-702 nucleotidi; la *p-distance* aminoacidica media è invece risultata 0,028 (*range* 0-0,133) e la lunghezza compresa fra i 233 e 234 aminoacidi. Essendo ORF2 la regione più variabile, sono emersi valori di lunghezza, *p-distance* e *range* dissimili tra i diversi genotipi: per il genotipo 2a è stata individuata una *p-distance* media nucleotidica di 0,047 (*range* 0,02-0,063), per il 2b di 0,007 (*range* 0-0,033), per il 2d di 0,005 (*range* 0-0,011). L'analisi su ORF1 e ORF3, interna a ORF1, condotta sull'intero database, ha permesso di determinare il grado di conservazione di questo tratto, considerato il più stabile anche tra i diversi genotipi data la funzione biologica svolta. I valori relativi a ORF1 indicano una lunghezza di 942 nucleotidi (314 aminoacidi), *p-distance* media nucleotidica di 0,017 (0-0,033) e aminoacidica di 0,006 (0-0,022). ORF3 è lunga 312 nucleotidi (104 aminoacidi), la *p-distance* media nucleotidica è di 0,013 (0-0,035) e quella aminoacidica è di 0,028 (0-0,087). I valori di ORF3 relativi alla proteina sono superiori ai valori della sequenza nucleotidica della stessa ORF3 e di ORF1, una variazione di questo tipo può evidenziare come il *frame* di lettura (antisenso in ORF3) influenzi la natura silente o non silente di mutazioni, con la codifica di aminoacidi diversi in ORF3 ma non in ORF1. La differente configurazione dei due geni comporta, infatti, che la medesima mutazione nucleotidica interessi posizioni diverse nei codoni delle due ORF (i.e. una mutazione nella terza posizione del codone in ORF1 implica una mutazione della prima posizione del corrispondente codone in ORF3).

I valori di variabilità dei singoli genotipi possono permettere l'avanzamento di ipotesi in merito all'andamento dell'evoluzione e della diffusione dei ceppi. Il genotipo 2a presenta un *range* di variabilità molto ampio, nonostante l'esiguo numero delle sequenze appartenenti a esso tra quelle analizzate. L'identificazione di stipiti appartenenti a *cluster* distinti, rende improbabile l'ipotesi di un comune antenato italiano, in favore di un più probabile importazione dall'estero di stipiti differenti. Il genotipo 2b presenta una *p-distance* molto bassa, ma gli estremi del *range* di variabilità sono più elevati denotando la presenza, confermata dall'analisi filogenetica (dati non mostrati), di alcuni cluster differenti, al loro interno piuttosto omogenei. Questo fenomeno è potenzialmente riconducibile a multiple introduzioni di stipiti differenti, i quali sarebbero andati incontro a una progressiva diffusione ed evoluzione nel territorio italiano.

PCV2d invece è probabilmente un genotipo emergente, data l'identificazione molto recente; dalle sequenze analizzate, emergono caratteristiche di ridotta variabilità imputabili quindi alla nuova introduzione e al percorso evolutivo ancora breve, o finanche a un singolo evento di introduzione nel panorama italiano.

GENOMA COMPLETO	p-dist	range	ntd	p-dist AA	range AA	AA
genotipo a	0,023	0,010-0,030	1768	-	-	-
genotipo b	0,01	0-0,025	1767	-	-	-
genotipo d	0,003	0,001-0,006	1767	-	-	-
tutte le sequenze	0,02	0-0,056	-	-	-	-
intergenotipica 2a-2b	0,045	-	-	-	-	-
intergenotipica 2a-2d	0,053	-	-	-	-	-
intergenotipica 2b-2d	0,039	-	-	-	-	-

ORF2	p-dist	range	ntd	p-dist AA	range AA	AA
genotipo a	0,047	0,020-0,063	699	0,054	0,026-0,073	233
genotipo b	0,007	0-0,033	699-702	0,007	0-0,034	233-234
genotipo d	0,005	0-0,011	702	0,004	0-0,013	234
tutte le sequenze	0,026	0-0,11	699-702	0,028	0-0,133	233-234
intergenotipica 2a-2b	0,085	-	-	0,099	-	-
intergenotipica 2a-2d	0,101	-	-	0,114	-	-
intergenotipica 2b-2d	0,055	-	-	0,058	-	-

ORF1	p-dist	range	ntd	p-dist AA	range AA	AA
tutte le sequenze	0,017	0-0,033	942	0,006	0-0,022	314

ORF3	p-dist	range	ntd	p-dist AA	range AA	AA
tutte le sequenze	0,013	0-0,035	312	0,028	0-0,087	104

Tabella 6: Variabilità, valori di *p-distance* media, *range* e lunghezza, relativi a sequenza nucleotidica e aminoacidica; (-) valori non calcolati.

3.2.4 Entropia e Pressione Selettiva

Associate alle analisi di variabilità, sono state effettuate le misurazioni dell'entropia sulle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche, il cui confronto ha permesso una rappresentazione grafica immediata delle differenze tra la variabilità nucleotidica e il cambiamento, o la conservazione, degli aminoacidi codificati. Per fornire maggior supporto statistico a quanto suggerito dalla precedente analisi, è stata valutata l'azione della pressione selettiva sul genoma, confrontando i tassi di sostituzione sinonimo e non-sinonimo (dN-dS), stimati utilizzando diversi modelli matematici basati sul *Maximum Likelihood*. Le analisi sono state condotte singolarmente sulle quattro ORF principali (ORF1-4) (Tab. 7).

ORF	dN/dS[1]	95% IC[2]	dN-dS<0[3]	dN-dS>0[4]
ORF1	0,1	0,07-0,15	37	3
ORF2	0,24	0,19-0,29	40	11
ORF3	1,01	0,69-1,4	6	4
ORF4	0,55	0,25-1,04	2	2

Tabella 7: Confronto della pressione selettiva sulle diverse ORF.
[1]Rapporto tra tasso di sostituzione sinonimo/non-sinonimo.
[2]Intervallo di confidenza.
[3]Siti sottoposti a pressione negativa.
[4]Siti sottoposti a pressione positiva.

Sia per *Rep* (Fig. 10) sia per *Rep'* (Fig. 12) è evidente l'elevato livello di entropia della sequenza nucleotidica, rafforzato dal noto valore del tasso di sostituzione nucleotidica ($1{,}2\times10^{-3}$ sostituzioni / sito / anno), ma la sequenza aminoacidica presenta un'entropia molto più bassa, perciò ORF1 risulta un tratto ricco di sostituzioni sinonimo che non comportano la variazione dell'aminoacido codificato. Il pattern di variazione aminoacidica è comunque sovrapponibile nel confronto delle due proteine codificate da ORF1, sia nel primo tratto comune, sia nel secondo tratto, nonostante lo *shift* del *frame* di lettura (Fig. 14). Il valore del rapporto dN/dS della proteina *Rep* è di 0,1 (95% IC 0,07-0,15), sono stati individuati 37 siti sottoposti a pressione negativa e 3 siti sottoposti a pressione positiva (Fig. 11). Le analisi effettuate su *Rep'*, nonostante le differenze funzionali fra le proteine codificate da ORF1, hanno evidenziato, come atteso, gli stessi risultati nel tratto comune di *Rep'* (AA 1-122), mentre il secondo tratto non risulta affetto da rilevanti pressioni evolutive (Fig. 13).

L'entropia di *Cap* invece si presenta simile a *Rep*, se valutata sulla sequenza nucleotidica, ma risulta parimenti elevata anche nella sequenza aminoacidica, mostrando quindi un più frequente esito non-sinonimo delle sostituzioni (Fig. 15). Difatti, *Cap* presenta un valore dN/dS di 0,24 (95% IC 0,19-0,29), sono stati identificati 40 siti sottoposti a pressione negativa e 9 a pressione positiva, più 2 interessati da pressione selettiva episodica (Fig. 16). L'elevata frequenza di siti sottoposti a pressione selettiva negativa è probabilmente da ricondursi alla funzione biologica, oltre che strutturale, di ampie aree della proteina *Cap*. Ne è stato infatti ipotizzato un ruolo in diverse fasi del ciclo replicativo, come l'interazione con il DNA virale per l'adsorbimento alla cellula, il trasporto nel nucleo e l'assemblaggio capsidico.

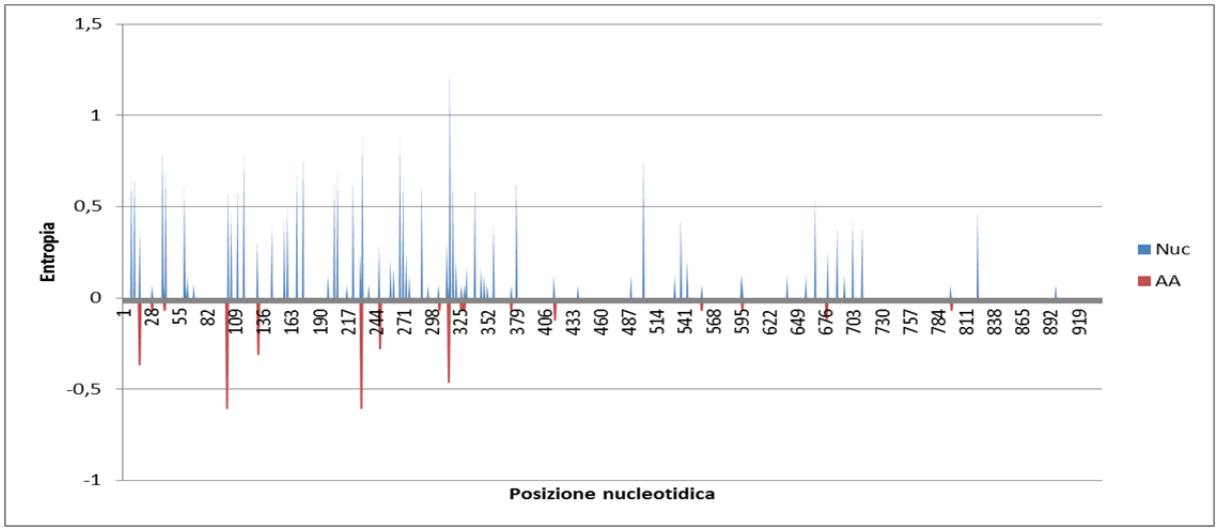

Figura 10: Entropia di *Rep*, confronto posizioni nucleotidiche con posizioni aminoacidiche.

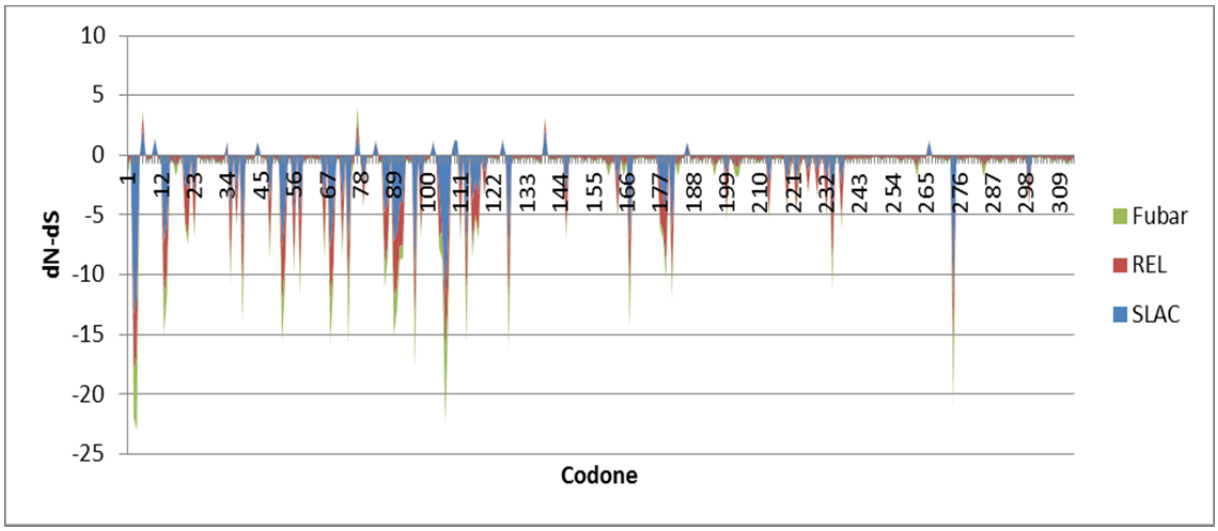

Figura 11: Distribuzione dei siti sottoposti a pressione selettiva su *Rep*. La relazione fra tasso di sostituzione non sinonimo e sinonimo è espressa, per ciascun codone, dalla relazione dN-dS.

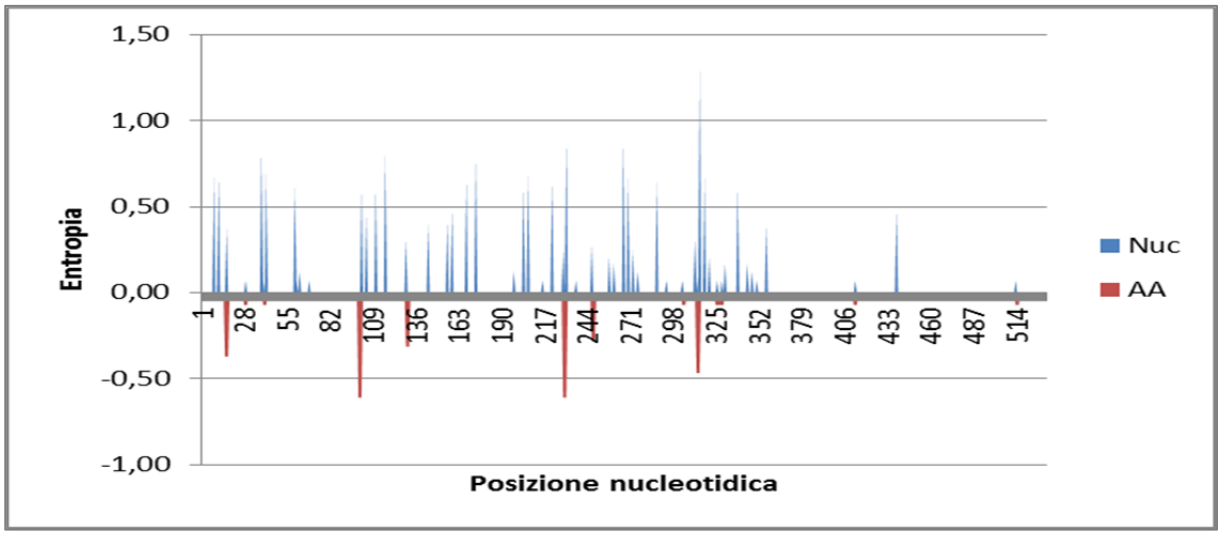

Figura 12: Entropia di *Rep'*, confronto posizioni nucleotidiche con posizioni aminoacidiche.

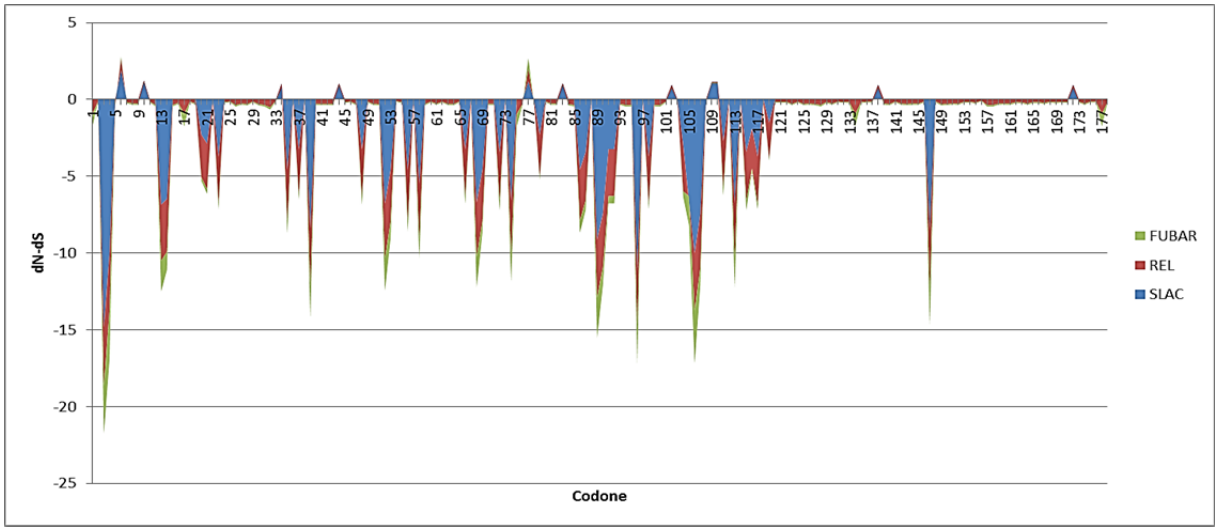

Figura 13: Distribuzione dei siti sottoposti a pressione selettiva su *Rep'*. La relazione fra tasso di sostituzione non sinonimo e sinonimo è espressa, per ciascun codone, dalla relazione dN-dS.

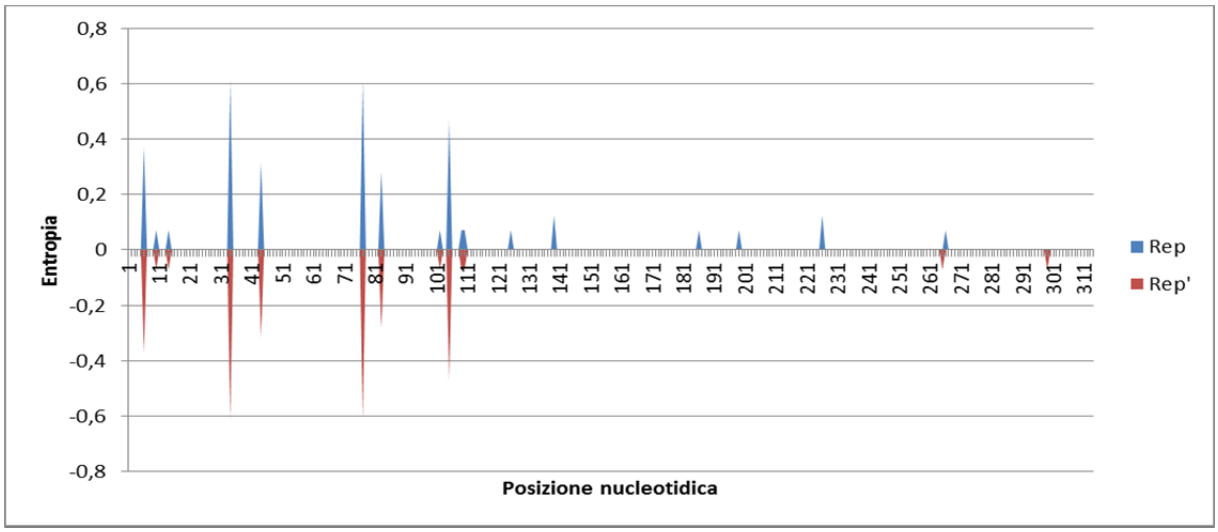

Figura 14: Comparazione dei valori di entropia aminoacidica di *Rep* e *Rep'*.

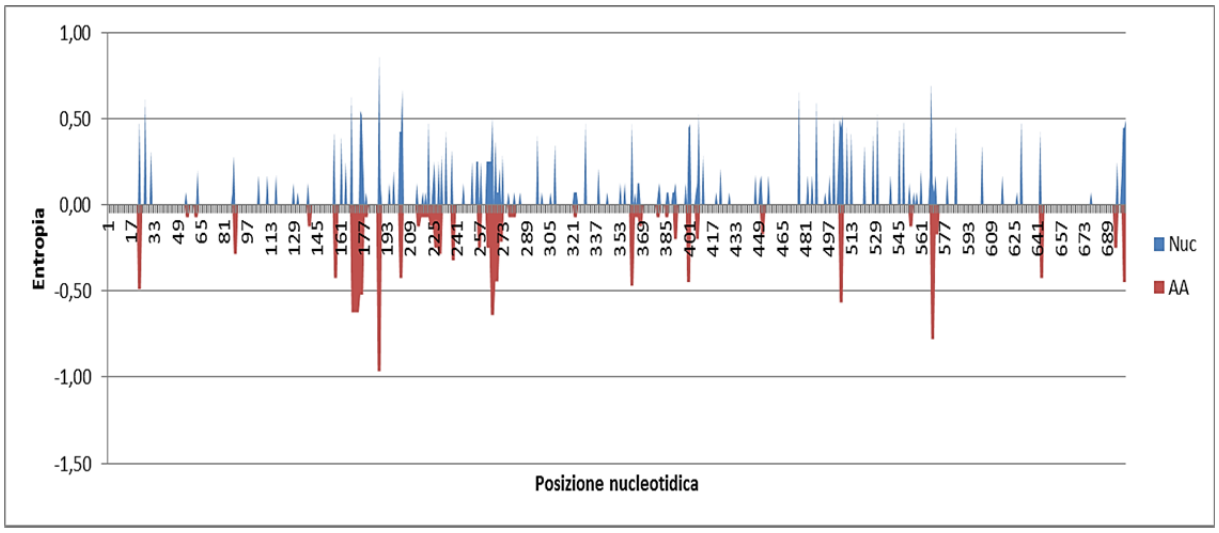

Figura 15: Entropia di *Cap*, confronto posizioni nucleotidiche con posizioni aminoacidiche.

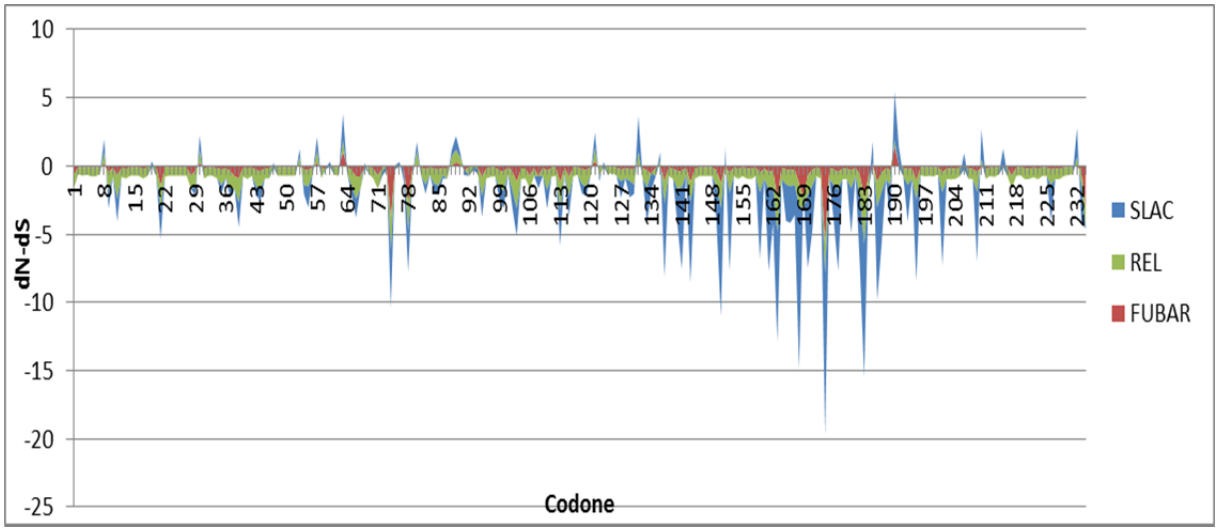

Figura 16: Distribuzione dei siti sottoposti a pressione selettiva su *Cap*. La relazione fra tasso di sostituzione non sinonimo e sinonimo è espressa, per ciascun codone, dalla relazione dN-dS.

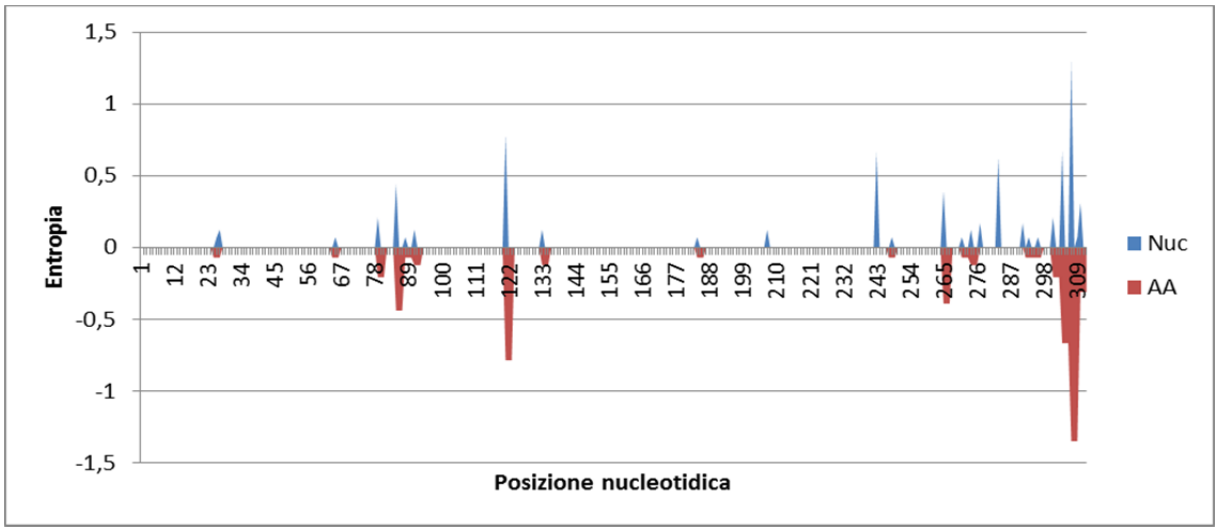

Figura 17: Entropia di ORF3, confronto posizioni nucleotidiche con posizioni aminoacidiche.

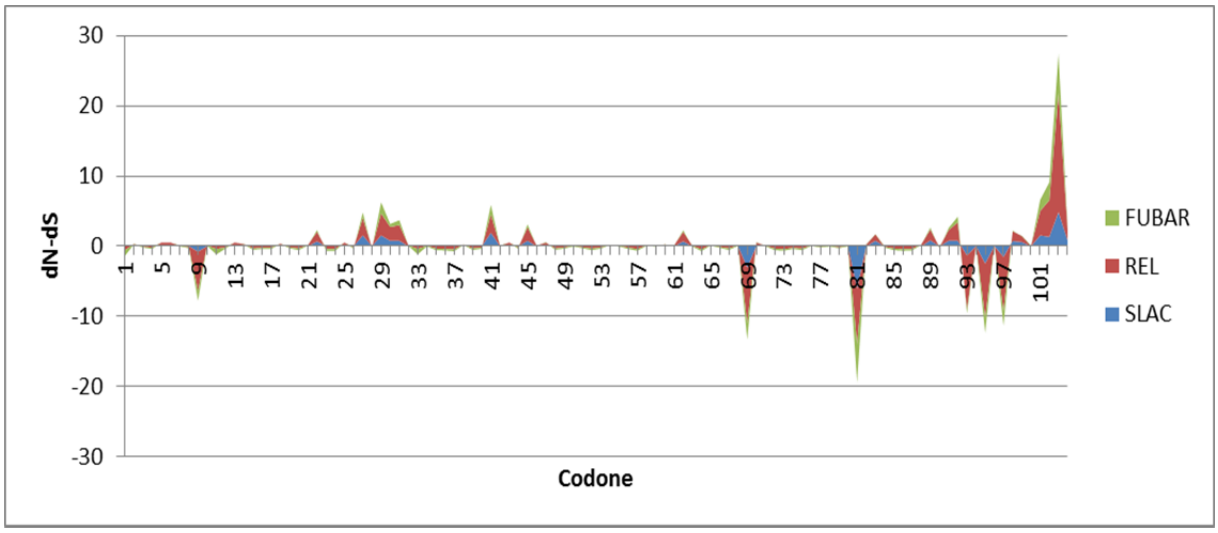

Figura 18: Distribuzione dei siti sottoposti a pressione selettiva su ORF3. La relazione fra tasso di sostituzione non sinonimo e sinonimo è espressa, per ciascun codone, dalla relazione dN-dS.

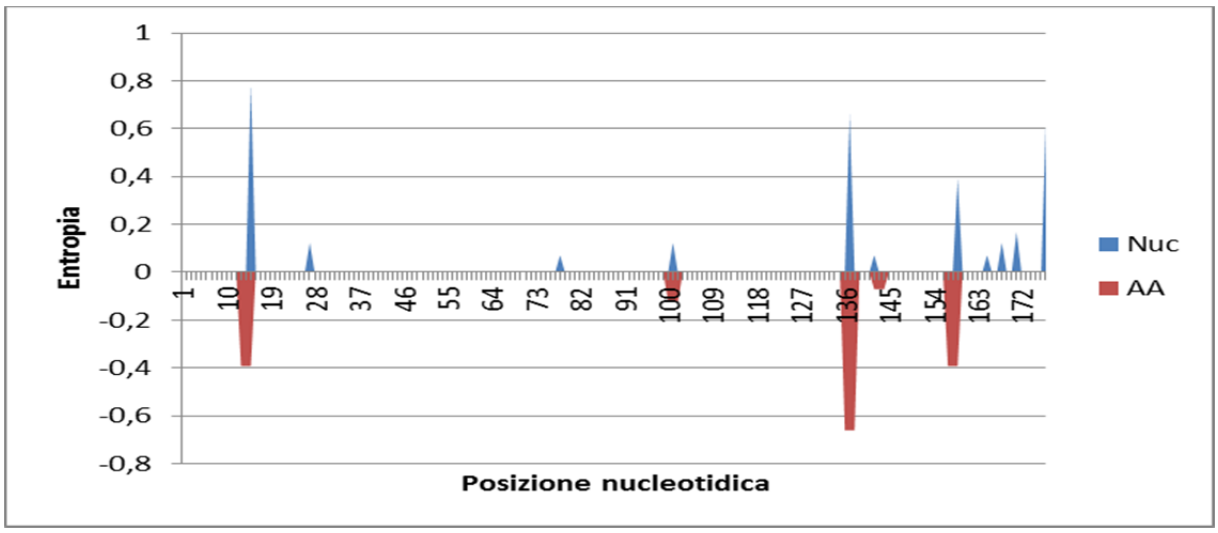

Figura 19: Entropia di ORF4, confronto posizioni nucleotidiche con posizioni aminoacidiche.

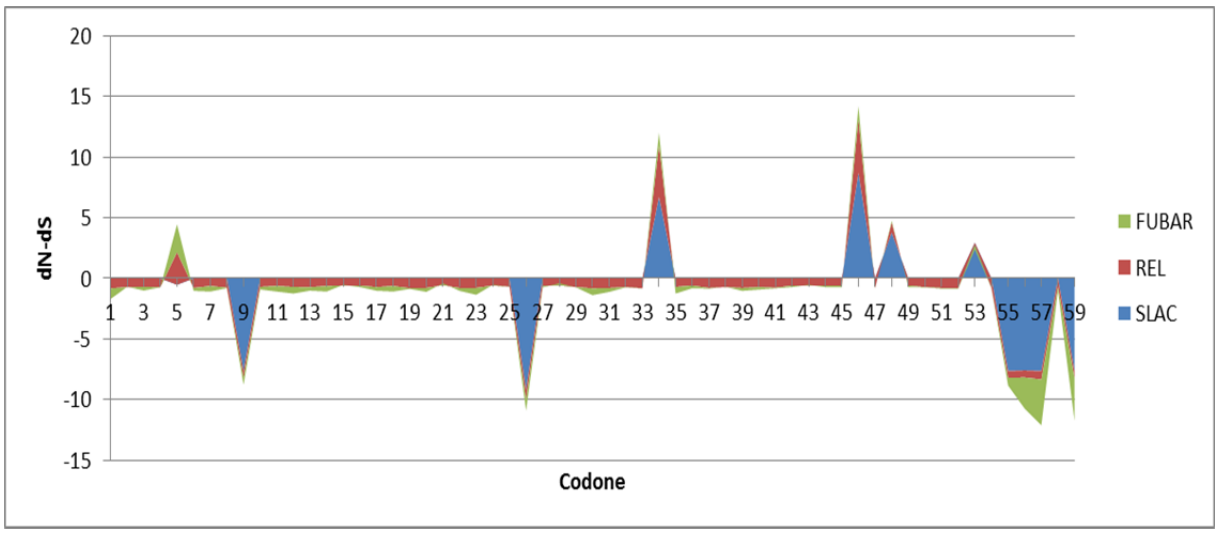

Figura 20: Distribuzione dei siti sottoposti a pressione selettiva su ORF4. La relazione fra tasso di sostituzione non sinonimo e sinonimo è espressa, per ciascun codone, dalla relazione dN-dS.

Alcuni dei siti sottoposti a pressione positiva sono collocabili all'interno delle aree immunoreattive di *Cap* (Tab. 8), a livello degli epitopi neutralizzanti conformazionali (47-63, 165-200 e 230-233) e lineari (65-87, 117-131, 157-183 e 193-207), inducendo a considerare l'azione della pressione immunitaria nel promuovere la variabilità di queste regioni. Come segnalato precedentemente in bibliografia (Olvera et al., 2007), è stata invece individuata un'estesa regione epitopica (157-183) ricca di siti sottoposti a pressione negativa, fattore che potrebbe contrapporsi alla generica tendenza alla variabilità delle regioni interessate da elevata pressione immunitaria (Fig. 16). Considerato come in questa regione sia stata dimostrata la presenza di un *decoy epitope* (169-180) (Trible et al., 2012), è possibile avanzare l'affascinante ipotesi che, la conservazione di questo tratto, sia riconducibile all'utilità di non alterare un epitopo in grado di distogliere risposta immunitaria dell'ospite da regioni fondamentali per l'infettività virale.

dN-dS<0[1]	EPITOPI[3]	dN-dS<0[1]	EPITOPI[3]	dN-dS>0[2]	EPITOPI[3]
9	-	140	-	8	-
11	-	143	-	30	-
21	-	150	-	57	**47-63**
37	-	152	-	63	**47-63**
39	-	159	**157-183**	68	**65-87**
44	-	161	**157-183**	88	-
66	**47-63**	163	**157-183**	89	-
74	**47-63**	168	**157-183**	90	-
78	**47-63**	170	**157-183**	108	-
95	-	174	**157-183**	121	**117-131**
99	-	177	**157-183**	190	**165-200**
100	-	180	**157-183**	-	-
102	-	182	**157-183**	-	-
103	-	183	**157-183**	-	-
110	-	186	**-**	-	-
113	-	187	**-**	-	-
115	-	195	**193-207**	-	-
119	**117-131**	201	**193-207**	-	-
133	-	209	-	-	-
137	-	234	**230-233**	-	-

Tabella 8: Siti di *Cap* sottoposti a pressione negativa[1] e positiva[2], in relazione agli epitopi neutralizzanti conformazionali 47-63, 165-200 e 230-233 e lineari 65-87, 117-131, 157-183 e 193-207.
[3](-) Posizioni non epitopiche.

L'analisi dell'entropia dei tratti ORF3 (Fig. 17) e ORF4 (Fig. 19) rivela tra un andamento simile a quello riscontrato in *Cap*. ORF3 mostra un valore dN/dS di 1,01 (95% IC 0,69-1,4), tutti i metodi si sono rivelati in accordo nell'individuazione di 6 siti sottoposti a pressione negativa e 4 a pressione positiva (Fig. 18). Essendo ORF3 compresa all'interno di ORF1 (104-307), è possibile rilevare come regioni sottoposte a pressione positiva in ORF3 (41, 101-103) siano invece interessate da pressione negativa in ORF1 (167, 105-107) e come, viceversa, regioni sottoposte a pressione positiva in ORF1 (139, 108-110) siano sottoposte a pressione negativa in ORF3 (69, 93-97) (Fig. 11-13-18). In ORF4 infine il valore del rapporto dN/dS è di 0,55 (95% IC 0,25-1,04) e sono stati considerati significativi 4 siti, 2 dei quali sottoposti a pressione negativa e 2 a pressione positiva (Fig. 20).

Considerando quindi congiuntamente le informazioni fornite dalla pressione selettiva e dall'entropia, si possono formulare alcune ipotesi volte a giustificare i valori ottenuti.

La regione corrispondente a ORF1 è la più complessa dell'intero genoma, contendo l'informazione per la codifica di ben quattro proteine distinte e, la sovrapposizione delle rispettive ORF, modula senza dubbio l'azione della pressione selettiva.

Il riscontro forse più eclatante è l'esistenza di forze contrapposte, agenti su ORF1, ORF3 e ORF4 che condividono il medesimo tratto di genoma. Se ORF1 sembra modellata da una pressione preminentemente purificante (Fig. 11-13), in modo conforme al suo ruolo biologico, su ORF3 e ORF4 si rileva l'azione più intensa di una pressione diversificante (Fig. 18-20). Tale fenomeno è in apparente contrasto con la funzione proposta per queste ultime proteine. Recenti studi hanno, infatti, evidenziato una loro interazione con proteine dell'ospite che, come tali, sono altamente conservate; risulta quindi difficilmente comprensibile il vantaggio evolutivo derivante da una continua variazione della struttura proteica. Inoltre il rapporto dN/dS relativo a ORF3 e ORF4 è in entrambi i casi superiore a quello stimato per *Cap*, proteina di per sé esposta alla pressione immunitaria e che quindi beneficia di una certa variabilità. Una giustificazione biologica a questa dinamica potrebbe risiedere nella predominanza delle forze che agiscono su ORF1, nel condizionare l'evoluzione dell'intera regione. L'azione conservativa mirata quindi su ORF1 si rifletterebbe in modo opposto su ORF3 e ORF4.

Partendo da questo assunto, risulta facile argomentare come il differente comportamento, tra ORF3 e ORF4, possa essere imputabile ai diversi *frame* di lettura che conducono alla trascrizione delle proteine. All'interno del codone, le posizioni della tripletta non hanno lo stesso peso nel condizionare l'esito sinonimo o non-sinonimo della sostituzione e, a causa della degenerazione del codice genetico, la posizione 2, seguita in misura minore dalla posizione 1, è determinante per il cambiamento dell'aminoacido. La lettura in direzione antisenso di ORF3 rispetto a ORF1, pur mantenendo invariata la posizione 2 tra i due *frame*, genera un'inversione tra le posizioni 1 e 3 nella tripletta, con l'effetto di attribuire in ORF3 una maggiore responsabilità nel cambiamento dell'aminoacido, a una posizione nucleotidica che, in ORF1, è generalmente meno influente e più variabile.

ORF4 invece, contraddistinta anch'essa da *frame* di lettura antisenso ma anticipato di un nucleotide (i.e. *frame*=-3), vedrebbe uno scambio tra le posizioni 1 e 2 all'interno della tripletta, senza alterare l'allineamento della terza posizione. Le due posizioni lette in modo invertito controllano in modo simile il cambiamento dell'aminoacido, riducendo le forze che agiscono su ORF4, conferendole dei valori inferiori a quelli emersi per ORF3. Anche nel confronto delle due proteine codificate da ORF1 emerge la presenza di forze che agiscono parallelamente sull'ultima porzione dell'ORF. Il tratto C-terminale nelle due proteine è trascritto con *frame* diversi e presenta un tasso di sostituzione nucleotidica decisamente inferiore al primo tratto della stessa ORF, mostrandosi il più conservato dell'intera sequenza. Poiché una sostituzione nucleotidica in questa regione determinerebbe un cambiamento non-sinonimo in almeno una delle due proteine, con conseguenze svantaggiose per l'imprescindibile ruolo nel ciclo replicativo virale, è evidente l'effetto di bilanciamento delle forze selettive, che agiscono in modo sinergico al fine di conservare ORF1.

4. CONCLUSIONI

La classificazione delle sequenze collezionate in questo studio consente di affacciarsi per la prima volta sul panorama genetico italiano di PCV2. Se, data la natura del campionamento (non sistematico ma di convenienza) con cui è stato costituito il database utilizzato, non è stato possibile elaborare dati di prevalenza, è stato invece possibile ritenere rappresentativi i risultati ottenuti in funzione della distribuzione geografica e temporale dei campioni, al fine di delineare un quadro più approfondito e consapevole dell'epidemiologia molecolare del virus. La ripartizione delle sequenze nei diversi genotipi riconosciuti fino ad oggi, rispecchia quella mondiale, configurando anche in Italia il genotipo 2b come predominante, a discapito del 2a. L'individuazione del genotipo 2d, di ultima introduzione, supporta inoltre le considerazioni sui legami tra commercio, importazione di animali e diffusione di patogeni, comuni o nuovi. La compresenza dei tre genotipi nello stesso territorio è, di per sé, evidenza dei fenomeni di importazione di PCV2 e, il ritrovamento di stipiti ricombinanti tra i diversi genotipi, ne sottolinea la stretta convivenza all'interno dei medesimi allevamenti, origine dell'evento di ricombinazione. Dalle valutazioni strumentali della variabilità affiora una certa uniformità intra-genotipica, mentre è evidentemente marcata la distanza tra i genotipi, rilievo che introduce al problema della possibile carente cross-protezione indotta da infezione naturale o mediante vaccinazione nei confronti di stipiti differenti.

La caratterizzazione preliminare della situazione italiana ha permesso analisi più approfondite sulle forze che la determinano, dimostrando come la grande variabilità di PCV2, aspetto connaturato del virus, sia però contrastata da un preponderante effetto purificante della pressione selettiva. L'elevato tasso di sostituzione nucleotidica, confortato anche graficamente in termini di entropia, è espressione quindi della natura del virus e riscontro inconfondibile lungo tutto il genoma. L'esame della sequenza aminoacidica rivela, al contrario, una tendenza alla conservazione che si manifesta con una prevalenza delle sostituzioni sinonimo, quantomeno nelle due ORF principali. ORF1 risulta infatti soggetta ad una forte pressione purificante volta a preservare, da eventuali cambiamenti svantaggiosi, le indispensabili proteine di replicazione da essa codificate. La pressione che agisce su ORF2 ha un duplice effetto: la componente negativa, difende la proteina capsidica da alterazioni

strutturali e funzionali che potrebbero compromettere la fitness virale, la forza diversificante limitata invece ad aree più circoscritte, può essere espressione della pressione immunitaria e promuovere un certo grado di variabilità entro le regioni epitopiche. Se la pressione purificante è quindi necessità biologica per le due ORF maggiori nel contrasto delle sostituzioni non sinonimo, la pressione diversificante riconosciuta su ORF3 e ORF4 non sembra giustificabile, tantomeno considerando il presunto ruolo biologico, accessorio e di interazione con l'ospite, delle proteine che ne derivano. In questo caso, la contrapposizione della selezione negativa e positiva è perciò da ritenere solamente un esito della sovrapposizione, nel primo tratto di DNA, di tre geni orientati in modo opposto e non di una reale richiesta di variabilità delle ORF secondarie. Nonostante quanto risulta per ORF3 e ORF4, PCV2 è considerato un virus interessato complessivamente da pressione selettiva purificante.

Considerazioni così ampie sul virus sono state permesse dalla scelta iniziale di sequenziare l'intero genoma di PCV2, per quanto sia noto in bibliografia che, ai fini della classificazione, possa essere sufficiente il tratto ORF2, più variabile e quindi informativo, per la costruzione di alberi accurati. L'acquisizione dell'informazione completa ha permesso lo studio di tutte le regioni genomiche, il confronto delle singole peculiarità e la valutazione parallela dei diversi parametri analizzati sui vari tratti. Inoltre, lo studio dell'intero genoma di PCV2, attraverso l'amplificazione di segmenti separati ma sovrapponibili alle estremità, ha permesso di mettere a punto e validare un rigoroso protocollo di sequenziamento del suo DNA circolare, ora patrimonio del *know-how* del laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro di tesi.

La mole di informazioni ricavate da questo studio contribuisce, assieme alla vasta bibliografia che riporta analisi simili ma effettuate in altre parti del mondo, ad avere una visione generale della diffusione e dell'evoluzione di PCV2. I risultati del presente lavoro fanno emergere l'utilità di campionamenti più sistematici e di precise analisi di prevalenza nelle situazioni produttive di campo o entro popolazioni selvatiche sul territorio italiano. Inoltre sottolineano l'importanza di un monitoraggio periodico dell'efficacia delle strategie di controllo e profilassi della patologia. La produzione e l'utilizzo di vaccini sono stati basati sul genotipo 2a, fino ad ora apparentemente in grado di generare una valida immunità

protettiva. Data la variabilità di PCV2, la rapida diffusione e l'introduzione di nuovi genotipi attraverso gli scambi commerciali, è necessario considerare i fattori di rischio legati a un aumento di virulenza, a una possibile evasione della risposta immunitaria da parte dei nuovi stipiti e a insuccessi delle strategie vaccinali. In situazioni di campo sono normale riscontro la presenza di genotipi differenti, coinfezioni, fenomeni di ricombinazione ed eterogenee risposte cliniche all'introduzione di stipiti diversi, rendendo perciò doverosa una certa prontezza nell'individuare le cause di eventuali episodi di riacutizzazione del problema clinico e nel proporre soluzioni. Il tentativo di iniziare quindi una descrizione della situazione italiana può servire a stimolare una ricerca approfondita che fornisca periodici *update* con cui confrontare l'evoluzione di un agente eziologico complesso, con ripercussioni così importanti sulla produzione e sul mercato.

5. BIBLIOGRAFIA

Alarcon, P., 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.

Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: A review. 12, 3.

Allan, G., 2012. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. Virus Res. 164, 4-9.

Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.-., Dessimoz, C., Gascuel, O., 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. Syst.Biol. 60, 685-699.

Beach, N.M., Meng, X.-., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 33-42.

Brunborg, I.M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. J.Virol.Methods. 122, 171-178.

Cadar, D., Csagola, A., Lorincz, M., Tombacz, K., Spinu, M., Tuboly, T., 2012. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. Infect.Genet.Evol. 12, 420-427.

Chae, C., 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. 194, 151.

Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. 169, 326.

Chae, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: A review of aetiology, diagnosis and pathology. 168, 41.

Chaiyakul, M., Hsu, K., Dardari, R., Marshall, F., Czub, M., 2010. Cytotoxicity of ORF3 proteins from a nonpathogenic and a pathogenic porcine circovirus. J.Virol. 84, 11440.

Cheung, A.K., 2012. Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. Virus Res. 164, 46.

Cheung, A.K., 2007. A stem-loop structure, sequence non-specific, at the origin of DNA replication of porcine circovirus is essential for termination but not for initiation of rolling-circle DNA replication. Virology. 363, 229.

Cheung, A.K., 2003. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. Virology. 305, 168.

Cino-Ozuna, A., Henry, S., Hesse, R., Nietfeld, J.C., Bai, J., Scott, H.M., Rowland, R.R.R., 2011. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. J.Clin.Microbiol. 49, 2012.

Cortey, M., 2011. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. 187, 363-368.

Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segalés, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. Vet.Microbiol. 149, 522.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. 9, 772.

de Boisséson, C., Béven, V., Bigarré, L., Thiéry, R., Rose, N., Eveno, E., Madec, F., Jestin, A., 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. J.Gen.Virol. 85, 293.

Delwart, E., Li, L., 2012. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. Virus Res. 164, 114-121.

Drew, T.W., 2011. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity?. 30, 95-106.

Dupont, K., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. Vet.Microbiol. 128, 56-64.

Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., Jestin, A., 2009. Replication of porcine circoviruses. 6.

Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: Porcine circovirus 2. J.Virol. 83, 12813.

Gagnon, C.A., 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant. Vet.Microbiol. 144, 18-23.

Galindo-Cardiel, I., Grau-Roma, L., Pérez-Maíllo, M., Segalés, J., 2011. Characterization of Necrotizing Lymphadenitis Associated with Porcine Circovirus Type 2 Infection. J.Comp.Pathol. 144, 63.

Ge, M., 2013. Epitope screening of the PCV2 Cap protein by use of a random peptide-displayed library and polyclonal antibody. Virus Res. 177, 103-107.

Gibbs, M.J., 1999. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96, 8022-8027.

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. 23, 1151.

Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. Vet.Microbiol. 128, 23.

Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. 187, 23.

Guindon, S., Dufayard, J.-., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. Syst.Biol. 59, 307-321.

Guo, L.J., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Huang, L.P., Liu, C.M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China. 7.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J.Virol. 72, 5262.

Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. J.Comp.Pathol. 143, 120.

Harding, J.C.S., Clark, E.G., Strokappe, J.H., Willson, P.I., Ellis, J.A., 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. 6, 249.

He Jialing, J., Cao, J., Zhou, N., Jin, J., Wu, J., Zhou, J., 2013. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. J.Virol. 87, 1420.

Johne, R., 2006. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. J.Gen.Virol. 87, 1189-1195.

Karuppannan, A.K., 2011. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the in vitro and in vivo spread of the of the virus. Virology. 410, 248-256.

Khaiseb, S., 2011. Coreplication of the Major Genotype Group Members of Porcine Circovirus Type 2 as a Prerequisite to Coevolution May Explain the Variable Disease Manifestations. J.Virol. 85, 11111-11120.

King, D., DuBois, P., Painter, T., Holck, T., Edler, R., Johnson, C., Diaz, E., 2008. Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination. Proc AASV, 159-161.

Kiupel, M., Stevenson, G.W., Galbreath, E.J., North, A., HogenEsch, H., Mittal, S.K., 2005. Porcine Circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. 1.

Krakowka, S., Allan, G., Ellis, J., Hamberg, A., Charreyre, C., Kaufmann, E., Brooks, C., Meehan, B., 2012. A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence. Virus Res. 164, 90.

Kristensen, C.S., Hjulsager, C.K., Vestergaard, K., Dupont, K., Bille-Hansen, V., Enoe, C., Jorsal, S.E., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2013. Experimental airborne transmission of porcine postweaning multisystemic wasting syndrome. J.Pathog. 2013, 534342.

Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. J.Virol. 80, 5065.

Lopez-Soria, S., 2005. Evidence of genetics influence on the expression of porcine circovirus disease (PCVD) in postweaning pigs, 391-393.

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. Vet.Pathol. 46, 707-716.

Mandrioli, L., 2004. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet.Immunol.Immunopathol. 97, 25-37.

Mankertz, A., 2008. Circoviruses, in: Mahy, B.W.J., Regenmortel, M.H.V.V. (Eds.), Encyclopedia of Virology (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 513-519.

Mankertz, A., Çaliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication. Vet.Microbiol. 98, 81.

Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2001. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. Virology. 279, 429.

Martin, D.P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics. 26, 2462-2463.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. J.Gen.Virol. 79, 2171.

Meng, X.J., 2012. Spread like a wildfire-The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. Virus Res. 164, 1-3.

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. J.Gen.Virol. 81, 2281.

O'Dea, M., Kabay, M., Carr, J., Wilcox, G., Richards, R., 2011. Porcine circovirus-associated disease in weaner pigs in Western Australia. Aust.Vet.J. 89, 122.

Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. Virology. 357, 175.

Opriessnig, T., 2008. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. J.Gen.Virol. 89, 2482-2491.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. Virus Res. 164, 20.

Opriessnig, T., Madson, D.M., Roof, M., Layton, S.M., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2011. Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with Lawsonia intracellularis or Salmonella typhimurium. J.Comp.Pathol. 145, 261.

Opriessnig, T., McKeown, N.E., Zhou, E.-., Meng, X.-., Halbur, P.G., 2006. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for difference in virulence. J.Gen.Virol. 87, 2923.

Opriessnig, T., Meng, X.-., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. 19, 591.

Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. Vet.Microbiol. 149, 225.

Pond, S.L.K., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics. 21, 676.

Resendes, A.R., Majó, N., Segalés, J., Mateu, E., Calsamiglia, M., Domingo, M., 2004. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. J.Gen.Virol. 85, 2837.

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res. 164, 78.

Sarli, G., Morandi, F., Panarese, S., Bacci, B., Ferrara, D., Bianco, C., Fusaro, L., Bacci, M.L., Galeati, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Lelli, D., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Allan, G., Benazzi,

C., Ostanello, F., 2012. Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen. Acta Vet.Scand. 54, 51.

Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Res. 164, 10.

Segalés, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., K.McCullough, Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Crassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. Vet.Rec. 162, 867.

Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. Anim.Health.Res.Rev. 6, 119-142.

Shibahara, T., 2000. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. 62, 1125-1131.

Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2007. Functional analysis of cis- and trans-acting replication factors of porcine circovirus type 1. J.Virol. 81, 5696.

Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., 2001. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. 13, 57.

Stewart, M.E., 2006. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (Corvus coronoides) with feather disease. Avian Pathol. 35, 86.

Tamura, K., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol.Biol.Evol. 30, 2725.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature. 295, 64.

Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines. ZBL.BAKT.REIHE A. 226, 153.

Trible, B.R., Rowland, R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. Virus Res. 164, 68-77.

Trible, B.R., Suddith, A.W., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A., Hesse, R.A., Rowland, R.R.R., 2012. Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2. J.Virol. 86, 13508.

Vidigal, P.M.P., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: A phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. Virus Res. 163, 320-327.

Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. Virus Res. 145, 151

6. SITOGRAFIA

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml

http://www.ictvonline.org/

7. RINGRAZIAMENTI

Rivolgo i miei più sentiti ringraziamenti al dottor Drigo che, con grande fiducia e disponibilità, mi ha coinvolto e sostenuto in questo stimolante progetto.

Vorrei ringraziare con tutto il cuore il dottor Franzo che, con instancabile pazienza, mi ha permesso di raggiungere questo traguardo e la cui passione e competenza hanno reso ogni giorno del nostro lavoro una sfida e un successo.

Vorrei inoltre ringraziare tutte le persone che ho avuto il privilegio di incontrare in questo lungo periodo di studio e che mi hanno appoggiato, sia dal punto di vista professionale sia da quello umano, accogliendomi con entusiasmo. Ringrazio la dottoressa Dotto e la sua meravigliosa empatia, la dottoressa Mondin e il suo spesso provvidenziale aiuto, il dottor Cecchinato, la dottoressa Pasotto e la dottoressa Menandro per i suggerimenti, il confronto e la compagnia, ringrazio il professor Martini per l'incoraggiamento e i preziosi consigli nella stesura di questa particolare sezione.

Ringrazio infine il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per la collaborazione.