

IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA SPECIE DI CIRCOVIRUS IN UN ALLOCCO (*STRIX ALUCO*) IN SUD ITALIA

Grassi L.¹, Legnardi M.¹, Franzo G.¹, Menandro M.L.¹, Tucciarone C.M.¹, Minichino A.², Dipineto L.², Fioretti A.², Cecchinato M.¹

¹ Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italia;

² Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italia

Summary

The genus *Circovirus* recognizes 49 species found in a broad range of vertebrates, most of which have been described in the last decade thanks to the advancement of molecular diagnostics. In particular, more than ten avian circoviruses are currently known, most notably *beak and feather disease virus*, which is responsible for a relevant disease in Psittacine birds. However, little is known about the circulation and impact of these viruses in wildlife species. To fill this gap, the present study aimed to assess the possible presence of circoviruses in birds of prey. A total of 61 liver and 13 spleen samples were collected during anatomico-pathological examinations of birds of prey belonging to ten different species, which were recovered at the wildlife rescue centre Federico II in Naples (Southern Italy). Only one spleen sample, collected from a tawny owl (*Strix aluco*) tested positive to a PCR based on genus-specific primers. The complete genome sequence was obtained by primer walking and revealed a 1745 nt-long circular genome, featured by the typical organization of circoviruses, with two major ORFs encoding for a capsid (*Cap*) and a replication-associated (*Rep*) protein. According to ICTV demarcation criteria, this virus qualifies as a new species, which was tentatively named "*tawny owl-associated circovirus*". Phylogenetic analyses showed that this newly discovered virus is closer to mammalian circoviruses than to avian ones. Specifically, it is more related to a rodent circovirus, possibly suggesting that its actual host may have been a rodent, either preyed in the wild or fed to the tawny owl during its stay at the rescue centre. Therefore, further efforts should be devoted to investigate the presence of *tawny owl-associated circovirus* in both populations, to shed light on its host range and better characterize its epidemiology.

INTRODUZIONE

Il genere *Circovirus*, appartenente alla famiglia *Circoviridae*, include più di 40 specie di virus icosaedrici, sprovvisti di *envelope* e caratterizzati da un genoma a singolo filamento circolare di DNA dalla lunghezza compresa tra 1700 e 2300 basi. Viste le dimensioni particolarmente ridotte, vengono considerati come i virus a DNA più piccoli in grado di infettare mammiferi ed uccelli (1). I circovirus di interesse aviario sono stati isolati da diverse specie e, nonostante le molte similarità, sono solitamente caratterizzati da una spiccata specie-specificità. La via di trasmissione principale è quella orizzontale, strettamente correlata alla notevole resistenza delle particelle virali in ambiente, ma in alcuni casi è stata descritta anche la trasmissione verticale. L'ingresso del virus avviene tipicamente tramite ingestione, a cui fa seguito un'infezione del tratto intestinale con conseguente viremia e diffusione ad altri tessuti e organi. L'escrezione virale avviene soprattutto per via fecale. Lo spiccato epiteliotropismo e linfotropismo fa sì che la sintomatologia si possa manifestare

con alterazioni del tegumento e/o stati immunodepressivi (2). La specie di circovirus più studiata in ambito aviario è sicuramente *beak and feather disease virus* (BFDV), responsabile di una malattia nota già alla fine dell'800 e strettamente associata all'ordine degli Psittaciformi. In una fase iniziale, la malattia si manifesta clinicamente con perdita e alterazione/deformazione delle penne a cui fanno seguito anche possibili deformità del becco, da cui deriva il nome di questo agente eziologico. Una manifestazione clinica meno appariscente, ma ugualmente associata alla presenza di questo virus, si evidenzia in giovani animali con crescita rallentata, deperimento e infezioni batteriche secondarie, conseguenti all'azione immunosoppressiva indotta dal virus (3). Altre specie di circovirus sono causa di malattia in specie aviari non appartenenti all'ordine degli Psittaciformi. Anche in questo caso la principale attività patogena si manifesta a livello immunitario. L'immunosoppressione predispone gli animali alla perdita di peso e al deperimento, a cui tipicamente si associa l'insorgere di infezioni secondarie responsabili delle manifestazioni cliniche più evidenti (2, 3). Ad oggi, diverse specie di circovirus sono state descritte in piccioni (*Pigeon Circovirus*), canarini (*Canary Circovirus*), gabbiani (*Gull Circovirus*), oche (*Goose Circovirus*), anatre (*Duck Circovirus*), fringuelli (*Finch Circovirus*), pinguini (*Penguin Circovirus*), corvidi (*Raven Circovirus*), stornelli (*Starling Circovirus*), cigni (*Swan Circovirus*) e diamanti mandarini (*Zebra Finch Circovirus*) (1). I circovirus meglio caratterizzati sono quelli che affliggono specie allevate, come animali da cortile o specie ornamentali/canore, in quanto più frequentemente sottoposte ad esame anatomo-patologico e/o indagini molecolari. Di conseguenza, i dati riguardo la presenza e prevalenza di circovirus nell'avifauna selvatica sono particolarmente scarsi, quantomeno in Europa, dove sono limitati alla segnalazione di alcuni focolai in gabbiani, storni e cigni a seguito del ritrovamento di esemplari deceduti. In particolare, per quanto riguarda i rapaci, le informazioni riguardanti la loro diffusione sono quasi del tutto assenti (2). Nel presente studio, la presenza di circovirus è stata indagata in rapaci sia diurni che notturni provenienti dal Sud Italia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Le attività di campionamento sono state condotte presso il Centro Recupero Animali Selvatici (CRAS) "Federico II" del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli. Durante l'esame anatomo-patologico sono stati prelevati campioni di fegato e milza, organi nei quali era già stata riportata la presenza di circovirus in altre specie aviari (4). I campioni sono stati conservati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Analisi molecolari

Dopo l'eluizione dei campioni in tampone fosfato salino (PBS), il DNA virale è stato estratto con il kit DNEasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Germania). Le analisi di PCR sono state condotte con il kit Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). È stata impiegata la coppia di *primer* degenerati CV1F (5'-GGIAYICCCAYYTICARGG-3') e CV1R (5'-AWCCAICCRTARAAR-TCRTC-3'), disegnata da Li et al. (2010) basandosi sulla sequenza di esponenti di ciascuna delle specie virali del genere *Circovirus* allora conosciute (5). I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger dell'intero genoma, ottenuto mediante *primer walking*. I segmenti genomici così ottenuti sono stati sottoposti ad un'analisi qualitativa e a *trimming* usando il programma FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e assemblati con il software ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia). Infine, il genoma è stato analizzato per la ricerca di *open*

reading frame (ORF) usando ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Analisi filogenetica

I genomi completi così ottenuti sono stati sottoposti ad un'indagine BLAST (6) per accertarne l'appartenenza al genere *Circovirus*. Le sequenze sono state poi allineate ad un database composto da ceppi di referenza di ciascuna delle 49 specie di circovirus ad oggi conosciute (1), utilizzando l'algorithm MUSCLE implementato nel software MEGA X (7). Le successive analisi filogenetiche hanno permesso di studiare le relazioni dei ceppi identificati con le specie conosciute e di determinare se si qualificassero come nuove specie.

RISULTATI

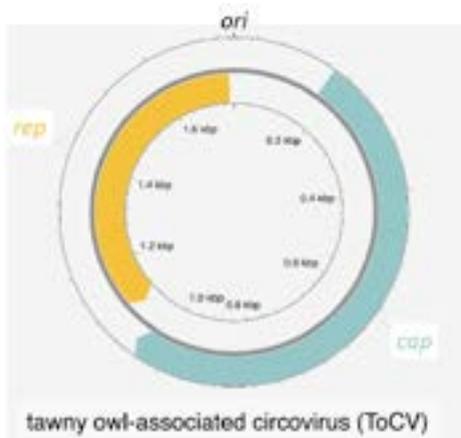
Campionamento

In totale sono stati analizzati 61 campioni di fegato da rapaci sia diurni che notturni. In particolare, sono state indagate 10 specie diverse: allocco (*Strix aluco*), assiolo (*Otus scopus*), astore (*Accipiter gentilis*), barbagianni (*Tyto alba*), civetta comune (*Athene noctua*), falco pellegrino (*Falco peregrinus*), gheppio (*Falco tinnunculus*), gufo comune (*Asio otus*), lodolaio (*Falco subbuteo*) e poiana (*Buteo buteo*). Per 13 di questi animali sono stati analizzati anche campioni di milza.

Analisi molecolari

Tutti i campioni sono risultati negativi alle analisi PCR ad eccezione di un campione di milza prelevato da un allocco ricoverato per una grave lesione all'avambraccio destro, deceduto poco dopo il ricovero, per cause traumatiche. Oltre alla lesione muscolo-scheletrica all'arto destro, l'animale si presentava in scarso stato di nutrizione (BCS 1) e riportava inoltre un ematoma cerebellare, lesioni ulcerative a livello di stomaco ghiandolare, fegato e milza ipotrofici. L'esame ematologico ha evidenziato linfocitosi ed eterofili reattivi. Sulla base della sequenza parziale ottenuta dalla PCR genere-specifica, una seconda coppia di primer, RC2-F (5'-CCAAGACGCTACTACGCACA-3') e RC2-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3'), è stata disegnata per permettere il sequenziamento dell'intero genoma, che è risultato avere una lunghezza di 1745 nucleotidi. Sono stati identificati due ORF maggiori: uno situato sul filamento virale, lungo 954 nucleotidi e codificante per la replicasi (*Rep*), l'altro sito sul filamento complementare, della lunghezza di 645 nucleotidi e codificante per la proteina capsidica (*Cap*) (Figura 1).

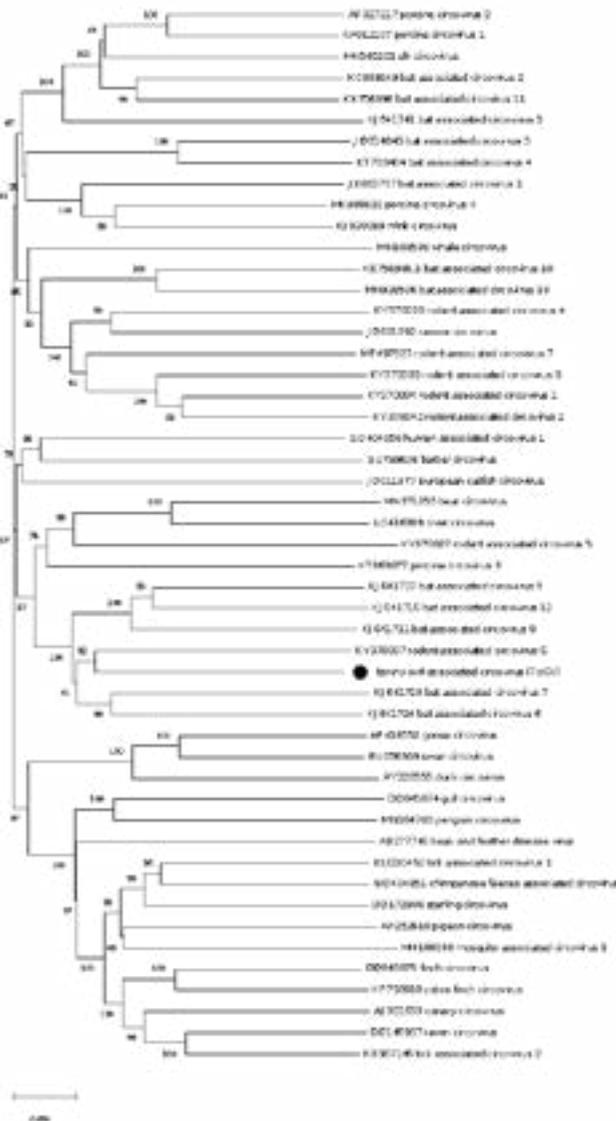
Figura 1. Rappresentazione del genoma di *tawny owl-associated circovirus*.



Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica ha rivelato come il circovirus ritrovato nell'alocco appartenga ad un cluster che comprende circovirus identificati in pipistrelli e roditori (Figura 2). In particolare, la specie virale con cui condivide il più alto valore di identità genomica (i.e. 60.6%) è il *rodent associated circovirus 6*.

Figura 2. *Tawny owl-associated circovirus* e le relazioni filogenetiche tra le specie virali attualmente appartenenti al genere *Circovirus*. Il ToCV è evidenziato dal pallino nero. L'albero filogenetico è stato inferito con metodica Neighbor-joining e 1000 replicati.



DISCUSSIONE

Il genoma del virus identificato nell'allocco presenta tutte le caratteristiche tipiche dei circovirus (Figura 1). Si tratta di un genoma circolare di piccole dimensioni e ambisenso, con un gene *rep* più conservato sul filamento virale e un gene *cap* più divergente sul filamento complementare. Tra *rep* e *cap* si possono individuare due regioni intergeniche. All'interno di quella di maggiori dimensioni, situata tra le due estremità 5', è presente l'origine di replicazione (*ori*), che consiste in un nonanucleotide altamente conservato caratterizzato dal motivo 'AA-GTATTAC'. Durante la replicazione, che avviene tramite *rolling circle replication*, la proteina *Rep* taglia il filamento virale tra la settima e l'ottava posizione di questa sequenza (8). Secondo i criteri di demarcazione tra specie attualmente in vigore per il genere *Circovirus*, secondo cui il valore di *pairwise identity* deve essere inferiore a 80% (4), il virus sequenziato si qualifica come una nuova specie, provvisoriamente denominata *tawny owl-associated circovirus* (ToCV). Secondo le linee guida proposte da Rosario et al. (2017), infatti, la parola "*associated*" va inserita qualora l'individuazione dell'ospite definitivo non sia adeguatamente supportata dal punto di vista biologico, come nel caso di ToCV (4). Dal punto di vista evolutivo infatti, questo virus sembra avere maggiori affinità con specie ritrovate in mammiferi, in particolare roditori, piuttosto che in uccelli. Una possibile interpretazione di questo risultato è che l'ospite di ToCV possa essere stato un micro-mammifero. Questa ipotesi è supportata dal fatto che, durante il periodo di ricovero presso il CRAS, l'allocco è stato nutrito con roditori allevati. È inoltre probabile che, anche allo stato selvatico, l'animale possa aver cacciato roditori. Ricordando l'elevata specie-specificità tipica dei circovirus, si riporta come in letteratura siano già state isolate specie di circovirus da ospiti non convenzionali. Queste positività però, si descrivono soprattutto da campioni di feci, coerentemente con una trasmissione alimentare dovuta a predazione, in probabile assenza di replicazione virale (5). In questo caso però, il virus è stato trovato nella milza e il meccanismo di questo fenomeno non è ancora stato chiarito. Una seconda ipotesi trova spiegazione in un possibile *spillover* tra la specie di roditore e l'allocco, dovuta alla frequente esposizione preda-predatore. Sebbene le lesioni anatomo-patologiche rilevate, soprattutto quelle riguardanti fegato e milza, siano probabilmente riconducibili allo stato di grave malnutrizione dell'animale, non si esclude un possibile contributo dato dalla replicazione virale. Saranno necessari ulteriori studi per identificare l'ospite naturale dell'infezione, permettendo così di chiarirne l'epidemiologia e la possibile patogenicità, indagando ulteriormente sia i rapaci che i micro-mammiferi.

CONCLUSIONE

Questo studio preliminare ha permesso di indagare la presenza di circovirus in numerose specie di rapaci selvatici, ad oggi scarsamente studiate. Sui 61 rapaci analizzati, solo un esemplare di allocco è risultato positivo all'infezione. Il ritrovamento è stato di particolare rilievo in quanto ha portato all'identificazione di una nuova specie virale, attualmente denominata *tawny owl-associated circovirus*, più vicina ai circovirus dei micromammiferi che degli uccelli. Per questo motivo, saranno necessarie ulteriori indagini per chiarire l'epidemiologia di questa nuova specie.

BIBLIOGRAFIA

1. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus
2. Gavier-Widén D, Duff PJ, Meredith A. (2012). Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe, Chapter “Circovirus Infections” pages 67-72
3. Thomas NJ, Hunter BD, Atkinson CT. (2007). Infectious Diseases of Wild Birds, Chapter “Circovirus”, pages 194-205
4. Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. (2017). Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.* 162(5): 1447-1463.
5. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango JB, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E. (2010). Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J. Virol.* 84(4): 1674-1682.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
8. Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. (2006). Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 80(13): 6225-6234.