

# CARATTERIZZAZIONE DI VIRUS INFLUENZALI CIRCOLANTI NEL SUINO NEGLI ANNI 2008-2009 IN ITALIA

## CHARACTERIZATION OF SWINE INFLUENZA VIRUSES CIRCULATING IN ITALY IN 2008-2009

FONI E.<sup>1</sup>; CHIAPPONI C.<sup>1</sup>; SOZZI E.<sup>2</sup>; BARBIERI I.<sup>2</sup>; MORENO A.M.<sup>2</sup>; MERENDA  
M.<sup>1</sup>; LUPPI A.<sup>3</sup>; ALBORALI L.<sup>2</sup>; CORDIOLI P.<sup>2</sup>

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini"  
Sezione di Parma; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna  
"B. Ubertini Sede di Brescia;  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini"  
Sezione di Reggio Emilia*

**Parole Chiave:** influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, analisi genetica

**Key Words:** swine influenza, H1N1, H1N2, H3N2, genetic analysis

**Riassunto:** Negli anni 2008 e 2009 nell'ambito della attività diagnostica routinaria delle forme respiratorie del suino, sono stati raccolti, da allevamenti del Nord Italia, 1854 campioni di polmoni e tamponi nasali che sono stati sottoposti ad analisi tramite RT-PCR per la ricerca del virus influenzale suino. A partire dai campioni risultati positivi alla prova biomolecolare, 114 nel 2008 e 102 nel 2009, sono stati isolati rispettivamente 52 (25 H1N1, 7 H1N2 e 20 H3N2) e 54 stipiti virali stipiti virali (21 H1N1, 19 H1N2, 13 H3N2 e 1 H1N1 Pandemico 2009). Sono stati selezionati 24 virus sui quali sono state eseguite analisi genetiche. Gli studi genetici hanno confermato, per quanto riguarda i virus H1N1, una distribuzione omogenea nell'ambito del gruppo di virus europei "avian-like" rappresentati dallo stipite di referenza A/sw/Finistere/2899/82. I virus H3N2, per quanto riguarda la sequenza dell'emoagglutinina (HA) dimostrano ancora una stretta correlazione con l' HA del virus progenitore A/Port Chalmers/73, mentre la sequenza della neuroaminidasi (NA) si avvicina a quella di recenti stipiti suini tedeschi di virus H1N2. L'analisi genetica dei virus del sottotipo H1N2 ha invece evidenziato in questi virus italiani la presenza di riassortanti la cui HA dimostra di essere correlata a quella tipica dei virus H1N2 europei, mentre la NA chiaramente distinta da questi e risulta invece molto vicina alle caratteristiche genetiche della NA di virus umani H3N2 di recente isolamento.

**Abstract:** Samples from 1854 outbreaks of respiratory disease in Italian pig farms, collected in 2008-2009, were submitted to RT-PCR for influenza virus M gene. From 114 RT-PCR positive samples collected in 2008, 52 swine influenza viruses (SIVs) were isolated and subtyped (25 H1N1, 7 H1N2 and 20 H3N2). From 102 RT-PCR positive samples collected in 2009, 54 SIVs were isolated and subtyped ( 21 H1N1, 19 H1N2, 13 H3N2 and 1 H1N1 Pandemic 2009). Genetic and phylogenetic analysis of H1N1 strains showed a low degree of etherogeneity, confirming the circulation of viruses referring to the "avian-like" Sw/Finistere/2899/82. Haemoagglutinin (HA) of H3N2 SIVs showed to be strictly correlated to the reference strain A/Port Chalmers/73, while it was demonstrated that the neuroaminidase (NA) was correlated to NA of recent German

H1N2 SIVs. Phylogenetic analysis of H1N2 SIVs showed that these recent Italian strains were reassortant strains carrying the HA closely related to European H1N2 SIVs and the NA to the recent H3N2 human influenza virus.

## **INTRODUZIONE**

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia Orthomixoviridae, genere Influenzavirus che comprende tre tipi: A, B e C. Gli uccelli selvatici degli ambienti acquatici sono considerati la riserva naturale del virus influenzale tipo A che sono in grado di infettare varie specie animali, uomo compreso. Gli stipiti vengono classificati a seconda delle caratteristiche dei determinanti antigenici di superficie, l'emoagglutinina (HA) e la neuroaminidasi (NA), antigeni coinvolti in modo determinante nei processi di infezione a livello delle cellule bersaglio e nella stimolazione del sistema immunitario. Nella specie suina l'evoluzione clinica è determinata dalle caratteristiche intrinseche del sottotipo virale, dalla situazione immunitaria di popolazione, ma anche dall'intervento di infezioni secondarie e dalle condizioni di allevamento. L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina (SIV) ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina italiana di tre diversi sottotipi H1N1, H3N2, H1N2. Inoltre nel corso del 2009 è stata accertata, se pur limitata a due focolai, la circolazione del virus "A H1N1 Pandemic 2009" anche nell'allevamento suino (Moreno A.M. com. pers.).

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) svolge monitoraggio della presenza del SIV nel Nord-Italia, area ad elevata densità di allevamenti suini ed aviari, da oltre 30 anni.

Sulla base dei dati virologici raccolti negli ultimi 10 anni dall'IZSLER, l'incidenza dei tre sottotipi nei casi di malattia respiratoria è del 46% per H1N1, 28% per H1N2 e del 26% per H3N2.

I virus influenza A, e quindi anche i SIV, vanno incontro nel tempo a continue evoluzioni antigeniche determinate dall'accumulo di mutazioni a livello dei tratti gnomici. Si tratta di mutazioni puntiformi, sostituzione, delezione e/o inserzione di basi che determinano differenze aminoacidiche a livello dei determinanti antigenici. Modifiche antigeniche si possono anche verificare per fenomeni di riassortimento cioè per scambio di tratti di genoma fra due o più virus influenzali che coinfettano lo stesso animale, anche provenienti da specie diverse (Kuntz-Simon et al. 2009). Presso i laboratori di Virologia della Sede e della Sezione Diagnostica di Parma è stato messo in atto un sistematico programma di screening per il monitoraggio dei ceppi di SIV circolanti e delle loro caratteristiche antigeniche e genetiche. Tale programma copre territorialmente la maggior parte delle aree nazionali con allevamento intensivo del suino (80% dei suini allevati in Italia), dove al sistema di allevamento tradizionale a ciclo chiuso ed aperto si è in parte affiancato l'allevamento multi-sito.

Si riportano in questo studio i risultati della sorveglianza della circolazione dei vari sottotipi di SIV nella popolazione suina negli anni 2008 e 2009 con particolare attenzione alla evoluzione delle caratteristiche antigeniche e genetiche degli stipiti isolati.

## **MATERIALI E METODI**

Nel corso dell'attività diagnostica svolta dai laboratori della Sezione Diagnostica di Parma, Reggio Emilia e Brescia negli anni 2008 e 2009 sono stati raccolti, rispettivamente, 959 e 895 campioni diagnostici, per un totale di 1854, rappresentati da polmoni e tamponi nasali provenienti da allevamenti del Nord Italia nei quali era stata rilevata presenza di sintomatologia clinica respiratoria. Nei Laboratori di Virologia delle rispettive Sezioni Diagnostiche, i campioni sono stati sottoposti a trattamento di omogeneizzazione e sono

stati esaminati con test biomolecolare di RT-PCR (Spackman et al. 2002) per la ricerca del genoma virale del virus dell'influenza. I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a prove di isolamento virale su uova embrionate di pollo e colture cellulari, utilizzando linee stabilizzate MDCK e CACO2 (Chiapponi et al. 2010). Il sottotipo virale degli stipiti isolati è stato identificato tramite inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) utilizzando sieri iperimmuni di pollo nei confronti di virus di riferimento (OIE 2008) e tramite tecnica PCR (Chiapponi et al. 2003). Dal Settembre 2009 i campioni risultati positivi al test biomolecolare sono stati anche esaminati tramite RT-PCR per la ricerca del genoma del virus H1N1 pandemico 2009 (CDC 2009).

Tra gli stipiti isolati sono stati scelti 24 virus sui quali sono state eseguite analisi genetiche tramite sequenziamento parziale di HA1 e NA (792 pb per N2 e 514 per N1) (Chiapponi et al. 2007). Le reazioni di sequenza sono state effettuate con il metodo dell'incorporazione di terminatori desossinucleotidici trifostati fluorescenti (BigDye Terminator kit, Applied Biosystem), impiegando gli stessi primers utilizzati nell'amplificazione e sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga3130 (Applied Biosystems). L'analisi filogenetica (MEGA 4, metodo della massima parsimonia) è stata effettuata confrontando le sequenze ottenute con quelle ad altri virus influenzali suini, umani ed aviari, disponibili in GeneBank dopo allineamento multiplo con metodo ClustalW.

## RISULTATI

Nel corso dell'anno 2008 sono stati esaminati tramite RT-PCR, 959 campioni di estratto di tessuto polmonare o tampone nasale, tramite questa analisi sono stati individuati 114 campioni positivi per la presenza del gene della matrice del virus influenzale A, che rappresentano il 12% dei focolai di sintomatologia respiratoria indagati. Da questi campioni, sottoposti a prove di isolamento virale, è stato possibile isolare 52 stipiti virali ripartiti così fra i sottotipi: 25 H1N1, 7 H1N2 e 20 H3N2.

Nel corso dell'anno 2009, sono stati esaminati 895 campioni tra i quali sono stati individuati 102 campioni positivi per influenza tramite RT-PCR (11%) dai quali sono stati isolati 54 stipiti virali : 21 H1N1, 19 H1N2 , 13 H3N2 e un virus riferibile allo stipite A H1N1 pandemico 2009, virus responsabile della Pandemia influenzale umana 2009 (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009). I dati sono stati raccolti nella Tabella 1.

**Tabella 1: Risultati delle indagini biomolecolari e virologiche per ricerca virus influenzale eseguite su campioni diagnostici raccolti in corso di sindrome respiratoria nel suino negli anni 2008-2009**

ANNO	TOTALE ESEGUITI	ESITO PCR		ISOLATI			
		NEGATIVI	POSITIVI	H1N1	H1N2	H3N2	H1N1 pandemico
2008	959	845	114 (12%)	25	7	20	/
2009	895	793	102 (11%)	21	19	13	1

## H1N1

L'analisi filogenetica dei virus H1N1 analizzati nello studio mostrano una distribuzione omogenea nell'ambito del gruppo di virus europei derivanti da virus con HA "avian-

like” rappresentati dallo stipite di referenza A/sw/Finistere/2899/82 (Fig.1). Tuttavia, sporadicamente sono stati isolati virus riassortanti con HA di origine umana (A/swine/Italy/284997/09 in Fig. 1). Per quanto riguarda il gene NA dei virus H1N1 si è osservata una relativa omologia delle sequenze italiane che risultano correlate con sequenze di virus suini europei contemporanei che hanno come capostipite il virus di riferimento A/sw/Finistere/2899/82 (Fig. 2).

Il virus H1N1 pandemico A/Sw/290271/2009 è stato isolato a novembre 2009 in suinetti sottoscrofa di un allevamento suino a ciclo aperto del Nord Italia. La sequenza completa del genoma virale rivela un elevato grado di omologia con i virus influenzali pandemici già isolati e caratterizzati in altri Paesi (Moreno A.M. com. pers.).

### **H1N2**

L’analisi delle sequenze del gene HA ha evidenziato che i ceppi H1N2 formano un cluster chiaramente distinguibile dal gruppo dei ceppi H1N1 (Fig. 1) come atteso, in quanto posseggono una HA di origine umana. In particolare tutti i recenti isolati originano dallo stipite italiano A/sw/it/1521/98 con cui condividono la delezione di due residui aminoacidici nelle posizioni 147 e 148 all’interno della regione HA1. Tuttavia la percentuale di omologia (non superiore al 95%) suggerisce che i virus H1N2 stiano evolvendo e vadano a costituire un gruppo estremamente omogeneo.

Per quanto riguarda invece la sequenza del gene NA, si è osservato lo stabilirsi della circolazione di ceppi con N2 strettamente correlata alla NA di virus H3N2 umani recentemente circolanti. In particolare i virus H1N2 originatesi dallo stipite italiano A/sw/it/1521/98 mostrano un’elevata omologia per quanto riguarda la NA con un virus H3N2 umano di origine asiatica (A/Hong Kong/CUHK20199/97) (Fig. 3).

### **H3N2**

Il gene HA dei virus H3N2 selezionati mostra un’elevata correlazione con il virus A/Port Chalmers/1/73 e rispetto agli anni precedenti non si registra una particolare evoluzione (Fig. 3). Per quanto riguarda il gene N2, la maggior parte dei virus presi in considerazione risultano essere maggiormente correlati a virus H1N2 riassortanti tedeschi di recente isolamento. (Fig. 4)

## **DISCUSSIONE**

I dati raccolti nel corso di questo studio dimostrano che il virus influenzale è ancora attivamente circolante nell’allevamento suinicolo intensivo italiano e responsabile dell’insorgenza di forme respiratorie primarie. Le indagini virologiche hanno evidenziato, infatti, percentuali rilevanti di risultati positivi, del 12% e del 11%, rispettivamente negli anni 2008 e 2009.

L’identificazione dei sottotipi di virus influenzale circolanti ha evidenziato la continua e pressoché paritaria circolazione di tutti i tre sottotipi H1N1 (46 isolati), H1N2 (23 isolati) e H3N2 (43 isolati) nel corso dei due anni considerati. L’incidenza del sottotipo H1N1 è rimasta costante nel corso dei due anni, mentre è stata osservata una diminuzione degli isolamenti di virus H3N2 nel 2009 (13 isolati) rispetto al 2008 (20 isolati). Per contro si è assistito ad un aumento di virus sottotipo H1N2 isolati nel 2009 (21 isolati) rispetto al 2008 (7 isolati). Questa tendenza potrebbe essere ricollegata al fatto che negli ultimi due anni si è osservato una progressiva divergenza delle caratteristiche genetiche della NA del sottotipo italiano H1N2 da quelle della NA degli stipiti H1N2 preesistenti (Moreno et al. 2009) che più si avvicinavano alle caratteristiche dei virus nord europei (Chiapponi et al. 2007). Infatti le caratteristiche della NA dei virus H1N2 oggi più frequentemente isolati sul territorio, si avvicinano sempre più alle NA di virus umani di recente circolazione. Questi cambiamenti potrebbero aver facilitato la circolazione di tali virus nell’ambito della

popolazione suina, immunologicamente non sensibilizzata nei confronti di una NA diversa, sia da quella presente nei sottotipi H1N2 di precedente circolazione, sia da quella del sottotipo H3N2 stabilizzato nel suino. La circolazione di questo sottotipo sembra quindi affermarsi alla pari con il sottotipo H1N1 nei nostri allevamenti.

L' Italia, insieme al Belgio, la Spagna e la Germania si conferma essere un'area geografica in cui il sottotipo H3N2, se pur con alterna fortuna, continua a circolare attivamente, mentre sembra non essere più presente in altri paesi europei come la Francia e la Gran Bretagna (Kyriakis et al. 2009, Kuntz-Simon et al. 2009)

I risultati di questo studio, considerando l'elevato numero di casi esaminati, può inoltre rassicurare sulla scarsa circolazione e diffusione del virus A H1N1 pandemico 2009 nei nostri allevamenti ( 0,11% dei casi di sintomatologia respiratoria considerati), a fronte di una elevata circolazione nella specie umana ( 8% su scala mondiale) nello stesso spazio temporale (WHO 2009) .

Nel corso di questi due anni è stata anche osservata la presenza di stipiti H1N1 riassortanti con HA di origine umana acquisita da virus H1N2 suino, che però non hanno mostrato capacità diffusive, rimanendo segnalazioni sporadiche.

**Figura n.1: Albero filogenetico gene H1**

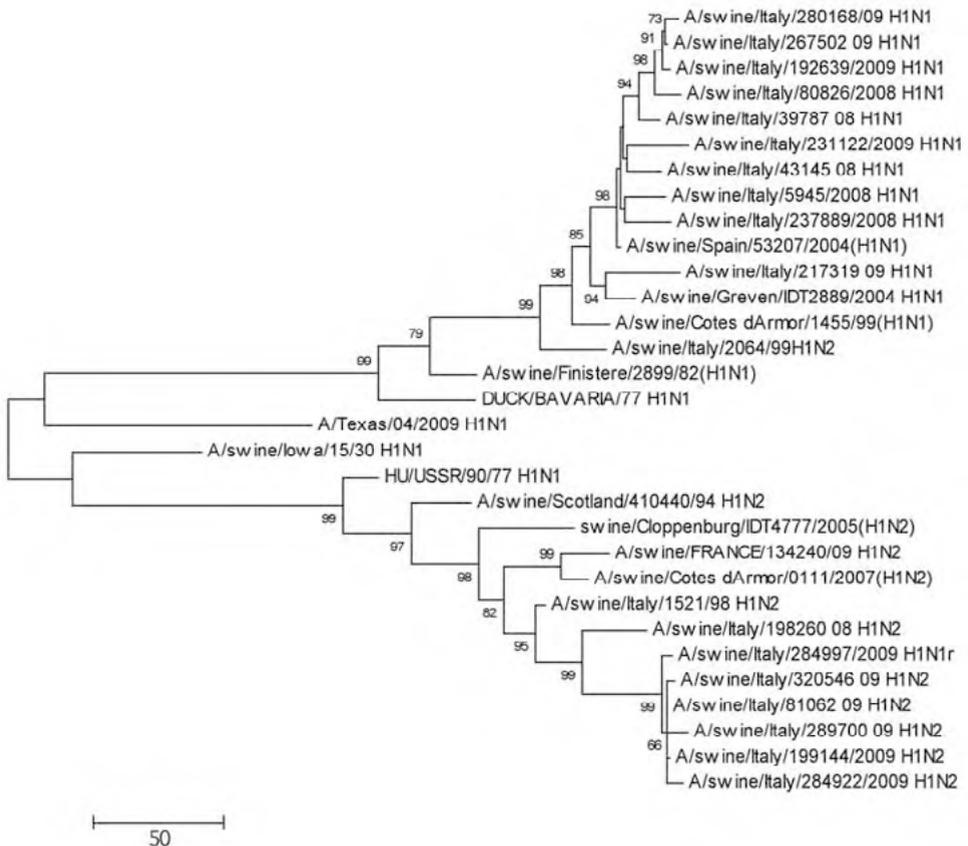


Figura n. 2: Albero filogenetico gene N1

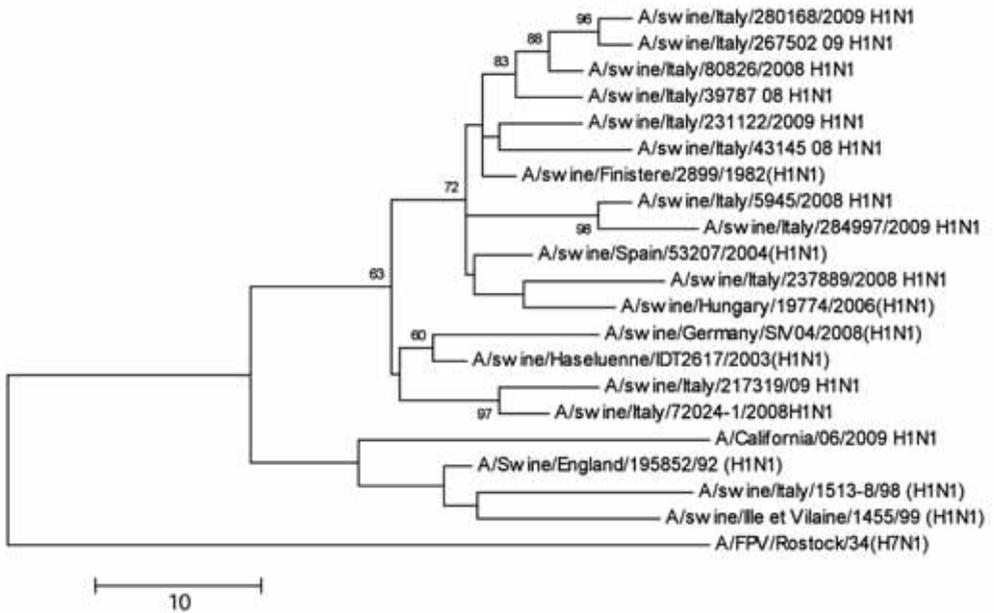
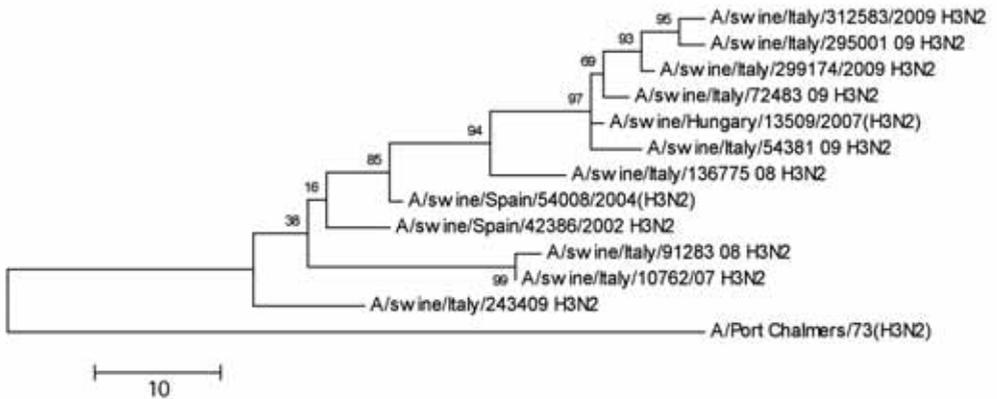
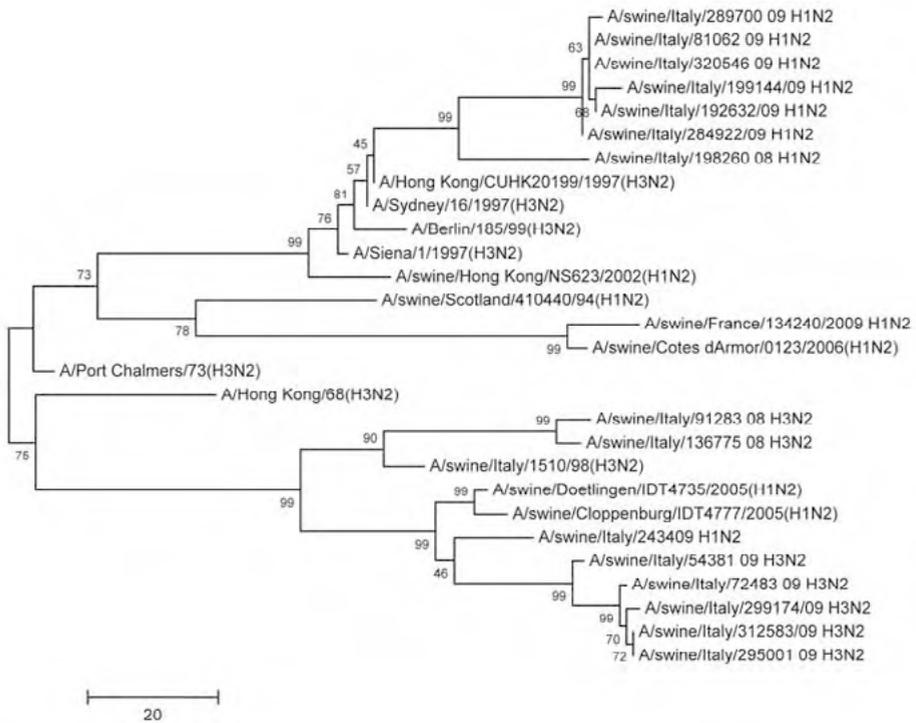


Figura n. 3: Albero filogenetico gene H3



**Figura n.4: Albero filogenetico gene N2**



**BIBLIOGRAFIA:**

CDC (2009) CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Assay-2009\\_20090430.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf)

Chiapponi C., Fallacara F. and Foni E. (2003) Subtyping of H1N1, H1N2 and H3N2 swine Influenza Viruses by two multiplex RT-PCR 4th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases PRRS-PMWS-Swine Influenza. Roma 29 Giugno-2 Luglio. 257-258

Kuntz-Simon G, Madec F. (2009) Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. Zoonoses Public Health. May 28. [Epub ahead of print]

Chiapponi C., Barbieri I., Manfredi R., Zanni I., Barigazzi G., Foni E.. (2007) Genetic diversity among H1N1 and H1N2 Swine Influenza viruses in Italy: preliminary results. Proceedings of PMWS PRRS SWINE INFLUENZA and associate diseases. Krakow 24th / 27th June. 261

Chiapponi C, Zanni I, Garbarino C, Barigazzi G, Foni E. (2010) Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses. *J Virol Methods* Jan;163(1):162-5. Epub 2009 Sep 23.

Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen SC, Chiapponi C, Van Reeth K. (2009) Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*. Dec 23. [Epub ahead of print] OIE, ed, 2008.

Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. Jun 18;360(25):2605-15. .

OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. Office International des Epizooties , Paris

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*. Sep;40(9):3256-60.

World Health Organisation (WHO), (2009) CSR, Disease Outbreak News, Wed 30 Dec. [http://www.who.int/csr/don/2009\\_12\\_30/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_12_30/en/index.html)

Moreno A, Barbieri I, Sozzi E, Lelli D, Fontana R, Alborali L, Cordioli P (2009) Virus influenzali suini H1N2 in Italia: presenza di ceppi riassortanti. *Atti XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, 25. Parma 30 settembre 2009