

# DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI INFLUENZA (A/H1N1) IN UN ALLEVAMENTO SUINO DA INGRASSO

## DESCRIPTION OF AN INFLUENZA (A/H1N1) OUTBREAK IN A PIG FATTENING HERD

BORIOSI G.<sup>1</sup>, GUGLIOTTA A.<sup>1</sup>, LASAGNA C.<sup>1</sup>, FONI E.<sup>2</sup>, CHIAPPONI C.<sup>2</sup>,  
DOTTORI M.<sup>3</sup>, VILA T.<sup>4</sup>, LEOTTI G.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Martini S.p.A., Budrio di Longiano, (FC); <sup>2</sup>IZSLER Parma;  
<sup>3</sup>IZSLER Reggio Emilia; <sup>4</sup>Merial S.A.S., Lione; <sup>5</sup>Merial Italia, Milano

**Parole chiave:** suino, Influenza, PRDC, SIV-H1N1, Impatto economico.

**Key Words:** pig, Influenza, PRDC, SIV-H1N1, Economic impact.

**Riassunto.** Gli Autori descrivono un focolaio di influenza suina (SI), sotto-tipo H1N1, con sintomatologia a carattere esclusivamente respiratorio, verificatosi in un allevamento da ingrasso (Sito 3) che fa parte di un'importante azienda con organizzazione di allevamento a multi-sito. Il focolaio ha coinvolto suini nelle fasi finali di ingrasso e si è protratto per oltre un mese con coinvolgimento, in momenti successivi, di tutti i settori dell'allevamento. Le ricerche effettuate hanno evidenziato la presenza di virus influenzale, limitati livelli sierici di genoma virale di PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*. La diagnosi di influenza si è basata, oltre che su rilievi di natura clinica e anatomopatologica, sull'uso di tecniche di laboratorio (RT-PCR da tamponi nasali, isolamento virale) e anche di un kit rapido che è stato utilizzato direttamente in allevamento (mediante tampone nasale). Gli Autori hanno quantificato in 9-10 €, per ogni suino macellato della stessa banda ingrasso, l'ammontare complessivo dei danni economici indotti da questo focolaio di influenza (A/H1N1).

**Abstract.** The Authors describe an outbreak of swine influenza (SI), subtype H1N1, with respiratory symptoms mainly, in a fattening herd (Site 3), part of an integrated multi-site organization. The outbreak invested the finishers in the last period of fattening and it spent one month for to finish: all sectors of the herd were affected. Laboratory investigations identified the presence of influenza virus, low serum levels of PCV2 viral genome, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. The diagnosis of swine influenza was based on pathological and clinical findings, laboratory investigations (RT-PCR from nasal swabs, virus isolation), and also a rapid diagnostic kit used on farm (through nasal swabs). The Authors calculated that this outbreak of influenza (type A/H1N1), in its duration, caused an average total loss of €9-10 for each slaughtered pig.

### INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza suina (SIV) è da sempre considerato uno dei più importanti agenti eziologici di malattia respiratoria in questa specie animale e ha una diffusione elevata in molti paesi (Van Reeth *et al.*, 2008).

Questo virus, considerato uno degli attori principali del cosiddetto complesso respiratorio del suino (PRDC), ha un'azione patogena primaria e una riconosciuta azione "door-opener" come recentemente messo in evidenza in Italia (Gradassi *et al.*, 2009) e in altri paesi europei (considerato in Olanda responsabile del 44% dei focolai di malattia respiratoria nei suini in accrescimento; Loeffen *et al.*, 1999).

Le manifestazioni cliniche della forma classica di questa malattia sono note, ma l'influenza

nel suino spesso si manifesta in forme cliniche meno caratteristiche, come quella subclinica tipica degli allevamenti a ciclo chiuso, dove il virus può permanere a lungo e dare luogo a manifestazioni cliniche ripetute nel tempo (Olsen *et al.*,2006), oppure la cosiddetta forma “enzootica”, che colpisce tipicamente i suini di 6-7 settimane di vita, specialmente, quando le pratiche di “tutto-pieno/tutto-vuoto” non possono essere applicate compiutamente (Guilmoto *et al.*, 2003; Allerson *et al.*, 2011). Un’ampia indagine di campo effettuata recentemente nel nostro paese ha evidenziato una notevole percentuale di diffusione dei virus influenzali nei suini in fase di svezzamento; questi virus sono stati isolati (o messi in evidenza) prevalentemente in seguito a episodi clinici di forme respiratorie; ben il 54% delle positività totali ai SIV era concentrata in suini di questa fascia di età (Gradassi *et al.*,2009). E’ utile a tal proposito ricordare che un esteso monitoraggio sierologico di campo effettuato recentemente in Italia ha evidenziato curve di deplezione degli anticorpi anti-SIV di origine materna molto diverse tra i suini degli allevamenti analizzati (Candotti *et al.*,2003)

L’influenza del suino, inoltre, ha spesso delle conseguenze importanti sulla sfera riproduttiva, dove questo virus può essere responsabile, anche se per via indiretta (rialzo termico), di aborti, natimortalità, infertilità, nascita di nidiate di piccola taglia, ipogalassia, infertilità temporanea dei verri (Olsen *et al.*,2006; Bardini *et al.*,2011).

In Italia sono presenti e circolanti tutti e tre i sottotipi di SIV del suino (H1N1, H1N2, H3N2); l’incidenza negli ultimi 10 anni (dati IZSLER) dei tre sottotipi, nei casi di malattia respiratoria, è stata del 46% per H1N1, 28% per H1N2 e del 26% per H3N2; gli isolamenti dell’anno 2009 hanno in ogni modo evidenziato una maggior frequenza di H1N2 rispetto al passato (19 isolati sui 54 totali di virus influenzale; 21 H1N1 e 13 H3N2) come già da tempo è registrato negli altri paesi europei: il sottotipo H3N2 non è più isolato in determinati paesi (Francia, Gran Bretagna) (Van Reeth *et al.*, 2008; Foni *et al.*,2010).

Dal punto di vista diagnostico l’influenza suina ha come metodica di riferimento l’isolamento virale (VI) , che è effettuato sia da organi sia da prelievi eseguiti “in vivo”, mediante tamponi nasali (Barigazzi *et al.*, 2003); altre tecniche diagnostiche utilizzate per la diagnosi di SI sono la RT-PCR, sierologia (inibizione dell’emoagglutinazione-IHA ed Elisa), immunofluorescenza, istologia e immunistochimica.

Lo studio dei virus influenzali si avvale oggi anche di avanzate tecniche di analisi genetica e inoltre sono stati recentemente impiegati dei kit rapidi (test Elisa su membrana) da utilizzare in campo su materiale organico prelevato mediante tamponi nasali.

Il tampone nasale su animali con temperatura elevata (T°), pur essendo molto utile ai fini diagnostici delle forme influenzali, è però una pratica veterinaria ancora non adeguatamente sfruttata nel nostro paese.

L’incidenza economica dell’influenza è considerata rilevante (Olsen *et al.*, 2006; Gradassi *et al.*,2009), ma non sono molti i lavori reperibili in letteratura che quantificano i danni economici indotti da un focolaio d’Influenza suina (Olsen *et al.*,2006; Madec *et al.*, 1992; Dréau *et al.*,2010). Un lavoro recente pubblicato negli USA (Donovan, 2005) riporta una perdita di \$10,31 per suino in seguito a un focolaio di influenza in un sistema di produzione multi-sito.

L’incidenza economica dell’influenza in un allevamento italiano a ciclo-chiuso (situato in un’area dell’Italia settentrionale considerata tipicamente a rischio per l’influenza suina) è già stata oggetto di una comunicazione recente (Bardini *et al.*, 2011) che ha quantificato l’impatto economico complessivo del focolaio (SIV-H1N2) in €129 per scrofa presente.

Scopo degli Autori è stato quello di fornire una valutazione dell’impatto economico di un focolaio di influenza (SIV-H1N1) in un allevamento da ingrasso italiano che si differenzia nettamente da quello di cui sopra per due ragioni: Sito 3 di una struttura organizzativa a multi-sito e collocazione in un’area dell’Italia centrale considerata a basso rischio per l’influenza suina.

## MATERIALI E METODI

### *Caratteristiche dell'allevamento dove si è verificato il focolaio di influenza*

Allevamento da ingrasso con la disponibilità di allevare contemporaneamente oltre 3.000 suini, inclusi nei circuiti dei prosciutti DOP italiani fino all'invio al macello all'età di 9-10 mesi di vita. L'allevamento, situato a pochi chilometri di distanza dal lago Trasimeno (Umbria), è un Sito 3 inserito all'interno di un'importante azienda integrata con organizzazione di allevamento a multi-sito (oltre 20.000 scrofe). L'allevamento è costituito da 5 capannoni (Figura 1) che sono gestiti con completa applicazione della gestione "tutto-pieno/tutto-vuoto". I suini arrivano in azienda a un peso vivo compreso tra i 30-35 kg, con un'età approssimativa di 80 giorni ed inviati al macello a un peso vivo collocato tra 160 e 170 kg. I suini qui allevati provengono da un unico allevamento di svezzamento (Sito 2), a sua volta rifornito da una o due scrofaie (Sito 1). Questa organizzazione del flusso animale permette di garantire un alto livello sanitario e un'elevata omogeneità genetica. I suini, oltre alle vaccinazioni obbligatorie contro il virus di Aujeszky, sono vaccinati allo svezzamento contro PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

I suini qui allevati provengono da Siti 2 e 1 esenti da Malattia di Aujeszky, PRRS positivi (la circolazione di PRRSv nei Siti 1 e 2 è comunque molto limitata), *Mycoplasma hyopneumoniae* positivi, *Actinobacillus pleuropneumoniae* positivi. L'anamnesi aziendale non riporta la segnalazione di casi precedenti di SI in quest'allevamento. I suini appartenevano a una razza ibrida commerciale.

L'area dove è collocata l'azienda nella quale si è verificato il focolaio di SI, oggetto della nostra comunicazione, è a scarsa densità di popolazione suinicola; l'allevamento più vicino è infatti ubicato a una distanza di circa 2 km e separato dall'allevamento di cui sopra da una collina.

### *Sistema di raccolta dei dati*

Tutti i dati raccolti in allevamento sono stati forniti dai veterinari aziendali e dal proprietario dell'allevamento, che ci ha fatto avere alcuni rapporti scritti, documenti cartacei ed informatici.

### *Tamponi nasali*

La prima tappa dell'accertamento diagnostico è stata realizzata direttamente in allevamento, dal veterinario aziendale, con l'ausilio di un apposito "kit di campo" (Merial® Flu Kit) che contiene tutto il necessario per eseguire correttamente un prelievo di materiale organico mediante tampone nasale. Il Kit anche di un test rapido (FLU DETECT™ Swine, Synbiotics, Lione-Francia) che consente di rilevare la presenza di virus influenzale di tipo A da tamponi nasali ed è utilizzabile anche direttamente in allevamento. In tutti i casi comunque si è proceduto con l'invio al laboratorio di tamponi nasali classici (Virocult<sup>0</sup>- Medical Wire and Equipment, UK) per le indispensabili ricerche diagnostiche successive.

### *Accertamenti diagnostici*

Gli accertamenti diagnostici sono stati eseguiti in due diversi laboratori:

#### *-IZSLER Parma*

Indagini virologiche: sono stati conferiti n°6 tamponi nasali provenienti da suini clinici a fine ingrasso con T° febbrile, che sono stati contrassegnati con numero d'accettazione IZSLER PR 74528. Dopo opportuna omogeneizzazione i campioni sono stati sottoposti a Real Time PCR al fine di evidenziare la presenza del gene M di SIV. Le matrici dei campioni risultati positivi alla Real Time PCR sono state anche sottoposte a Multiplex RT PCR al fine di evidenziare e identificare emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) del sottotipo del virus influenzale presente (Chiapponi *et al.*, 2010). In seguito i campioni sono stati sottoposti a prove di

isolamento virale tramite inoculazione su uova embrionate e colture cellulari, utilizzando le linee stabilizzate CACO2 e MDCK (Chiapponi *et al.*, 2010). Gli isolati virali ottenuti sono stati sottoposti a tipizzazione antigenica tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) utilizzando sieri iperimmuni di referenza e stipti di campo dei sottotipi H1N2, H3N2, H1N1 e vH1N1 pandemic 2009. Due stipti isolati dai tamponi n° 3 e 5 sono stati poi amplificati e sottoposti ad analisi genetica per quanto riguarda il gene HA e la regione N1 del gene NA (Figura 2). Inoltre è stato sottoposto ad amplificazione anche il frammento di HA di tipo aviare rilevato nel campione n° 3. Gli allineamenti sono stati realizzati tramite CustalW, gli alberi filogenetici sono stati costruiti con l'utilizzo di software MEGA 3.1.(Kumar S. *et al.*, 2004).

Indagini sierologiche: sono state eseguite due serie di analisi sierologiche per un totale di n° 50 suini, prelevati a distanza di circa uno e due mesi dall'esecuzione dei tamponi nasali di cui sopra. Le analisi eseguite erano le seguenti: Elisa PRRS (IDDEX), inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) per i tre sottotipi di virus influenzali (H1N1 267505/10, H1N1 pandemico, H1N2 284922/09, H3N2 312582/09), Elisa competitiva per anticorpi Aujeszky anti-gE (IDDEX), Elisa competitiva per anticorpi Aujeszky anti-gB (IZSLER BS), Elisa competitiva per anticorpi anti-PCV2 (IZSLER BS), RT-PCR per PCV2 ( IZSLER BS), Elisa qualitativa per anticorpi anti *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hypra), Elisa per anticorpi anti *Mycoplasma hyopneumoniae* (IDDEX).

#### *-IZSLER Reggio Emilia*

Fu effettuata la valutazione al macello dei punteggi polmonari delle lesioni *Mico-like* secondo griglia Madec (scala dei punteggi: 0-28) e relativo adattamento del metodo per i suini da ingrasso italiani (Ostanello *et al.*, 2007) e delle pleuriti secondo griglia S.P.E.S./A.P.P.I. (Luppi *et al.*, 2011), su un lotto di n° 104 suini appartenenti alla banda coinvolta dall'episodio influenzale. IZSLER RE ha inoltre eseguito l'esame anatomico-patologico, virologico e batteriologico su un polmone prelevato al macello nel corso dell'esecuzione delle osservazioni di cui sopra.

## **RISULTATI**

### *Descrizione del caso clinico*

I suini appartenenti alla banda coinvolta dal focolaio influenzale erano arrivati nel Sito 3 in data 29-10-10 (n° 3.000) con un peso vivo medio di kg 32,996, un'età di circa 80 giorni e sono stati poi inviati al macello nel mese di maggio 2011. I suini sono stati alimentati con mangime secco e con siero di latte tal quale (SS al 3%), somministrato mediante l'impianto dell'acqua di abbeverata. Tutti i dati zoo-economici relativi a questa banda sono segnalati nella Tabella 1 e sono stati oggetto di annotazione costante e standardizzata. Il primo sospetto clinico di SI fu formulato in data 10-03-11, quando i suini avevano raggiunto un peso vivo medio stimabile attorno ai 140-150 kg. La sintomatologia riscontrata era di natura prevalentemente respiratoria, non particolarmente grave, ma con un'evidente riduzione del sensorio e una riduzione media dell'ingestione alimentare del 45%. Le prime manifestazioni cliniche furono segnalate in un capannone e poi si estesero gradualmente a tutto l'allevamento. Le manifestazioni cliniche all'interno di ogni capannone si protrassero per circa una decina di giorni, ma il focolaio si estinse solo dopo oltre un mese di malattia, con un andamento e una diffusione della patologia di tipo influenzale tipica per allevamenti di dimensioni simili e già descritta in letteratura (Bardini *et al.*, 2011; Allerson *et al.*, 2011). Nel corso del focolaio di SI fu accertata la morte per malattia respiratoria di n° 66 suini.

I suini colpiti dalla patologia respiratoria furono anche sottoposti a terapia antibiotica per via orale per periodi variabili dai 5 ai 7 giorni continuativi e con i seguenti principi attivi:

Amoxicillina, Doxiciclina, Lincomicina, associazione Sulfamidico-Trimethoprim.

I veterinari aziendali già da alcuni mesi utilizzavano, a scopo diagnostico, in casi di sospetto clinico di SI, il Merial® Flu Kit con buoni risultati e con la convinzione, maturata in questa vasta esperienza d'uso, della necessità di intervenire con questo kit tempestivamente, per non far perdere sensibilità all'esame stesso e comprometterne la validità della risposta (problema dei "falsi-negativi") per la presenza di scarse quantità di virus influenzale nelle cavità nasali, data la breve durata del periodo d'emissione virale (Olsen *et al.*,2006).

In data 23-03-11 furono eseguiti, in suini con peso vivo elevato e con temperatura febbrile, n° 6 tamponi nasali da esaminare col kit rapido e contestualmente ,sugli stessi suini, altri n° 6 tamponi nasali classici (Virocult<sup>®</sup>), poi inviati tempestivamente al laboratorio (IZSLER PR) per le indagini ulteriori. La lettura degli esiti dell'esame eseguito in allevamento, subito dopo l'esecuzione del test rapido sui tamponi nasali, fu la seguente: 5 tamponi su 6 positivi al virus influenzale di tipo "A".

In data 20-04-11, circa un mese dopo l'esecuzione dei tamponi nasali, n° 30 suini furono sottoposti a un prelievo di sangue per rilevare la presenza di anticorpi contro i più comuni patogeni respiratori del suino da ingrasso e fu eseguita, con gli stessi emosieri, anche un'indagine virologica nei confronti del virus PCV2 (RT-PCR).

In data 16-05-11 furono prelevati n° 20 suini della medesima banda di ingrasso (prelievi trasversali) e di nuovo eseguite le analisi di cui sopra ritenute ancora degne di interesse, anche per evidenziare eventuali sier conversionsi.

In data 18-05-11 furono, infine, completate le indagini diagnostiche mediante l'esame al macello delle lesioni Mico-like e delle pleuriti sui polmoni di n° 104 suini; un polmone prelevato al macello nel corso delle osservazioni sopra citate, fu quindi sottoposto a esame anatomopatologico, virologico e batteriologico.

Poiché l'allevatore aveva manifestato una forma clinica simil-influenzale subito dopo il focolaio d'influenza dei suini, lo stesso fu sottoposto a un prelievo di sangue per la ricerca sierologica nei confronti dell'influenza sia suina che umana.

**Tabella 1.** *Dati zootecnici rilevati nella banda di ingrasso denominata "Ciclo16" colpita da influenza (A/H1N1)*

**Table 1.** *Fattening batch "Ciclo 16" that experienced Flu outbreak (A/H1N1): zootechnical data*

Parametro	Dato
Data inizio ciclo	29-10-2010
N° capi ad inizio prova	3000
N° capi macellati	2804
Peso vivo medio all'arrivo	32,963
Peso vivo medio al carico per il macello	164,847
Durata media del ciclo in giorni	189
IPMG in grammi	697
Consumo medio di mangime per capo macellato	401
Resa alimentare in % (ICA)*	32,8% (3,04)
N° totale dei morti durante il ciclo e % di mortalità totale	196 (6,76%)
N° suini abbattuti in quanto "scarti" e % /mortalità totale	5 (2,50%)
N° morti per forme respiratorie e %/mortalità totale	<b>66 (34,90%)</b>

\*Questo dato non tiene conto dell'apporto alimentare fornito dal Siero di latte

*Accertamenti diagnostici eseguiti da IZSLER Parma*

Tutti i 6 tamponi nasali sono risultati positivi alla prova Real Time PCR per la presenza del gene M del virus dell'influenza suina, la reazione RT-PCR Multiplex per l'identificazione del sottotipo virale ha evidenziato presenza nei campioni n° 1, n° 2, n° 3 di emoagglutinina H1 di tipo umano e neuroaminidasi N1. Nel campione n° 3 è stato possibile evidenziare la contemporanea presenza di emoagglutinina H1 di tipo aviare. Le prove di isolamento virale (VI) hanno permesso di ottenere il virus influenzale suino dai campioni n° 1, n° 2, n° 3, n° 5, n° 6. Le prove di caratterizzazione antigenica tramite IEA (IHA) eseguite su tutti gli isolati hanno rilevato una marcata reattività nei confronti del siero di referenza H1N2 A/sw/Scotland 410440/94, virus capostipite dei virus influenzali suini europei, una più debole reattività nei confronti dei sieri di referenza H1N1 A/sw/It/1513/98, stipite rappresentativo dei virus influenzali suini italiani di tipo aviare. Inoltre gli stipiti isolati hanno reagito anche nei confronti del siero iperimmune H1N1r A/sw/It/7704/01, virus H1N1 isolato nel 2001, riassortante per la presenza di un'emoagglutinina di tipo umano. Le indagini di tipo genetico condotte su HA e NA degli isolati 74528-3 e 74528-5 hanno evidenziato per il gene HA un'omologia del 97% con lo stipite H1N2 A/sw/Kitzen/ IDT6142/07. Per quanto riguarda il gene NA è stata osservata un'omologia del 97% con virus H1N1 A/sw/Spain/53207/2004 rappresentativo degli stipiti H1N1 suini di tipo aviare circolanti in Europa. L'analisi genetica del frammento HA di origine aviare rilevato nel campione n° 3 ha permesso di osservare un'omologia del 97% con virus influenzale suino di tipo aviare H1N1 A/sw/Ghent/132/05. Gli esiti dell'esame sierologico sul siero dell'allevatore hanno evidenziato presenza d'anticorpi (1/80) nei confronti del virus influenzale v H1N1pandemic 2009, mentre si registrava esito negativo nei confronti del virus H1N1 74528/3 isolato nell'allevamento.

**Tabella 2.** *Esiti degli esami virologici per influenza effettuati sui 6 tamponi nasali*

**Table 2.** *Virological test results for influenza virus by n°6 nasal swabs*

Tipo di esame	Tampone n°1	Tampone n°2	Tampone n°3	Tampone n°4	Tampone n°5	Tampone n°6
Test rapido FLU-KIT	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
RT-PCR IZSLER PR	POS	POS	POS	POS	POS	POS
VI-Cult. cell. CACO 2	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
VI-Cult. cell. MDCK	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
VI-Uova embrionate	NEG	POS	POS	POS	POS	POS

**Tabella 3.** *Schema riepilogativo degli esiti degli esami sierologici e virologici effettuati sugli emosieri suini (prelievi trasversali)*

**Table 3.** *Summary table of serological and virological tests on swine serums (Cross-sectional samples)*

<b>Tipo di esame effettuato</b>	<b>1° PRELIEVO 20-04-11* (n°30) (a distanza di circa sei mesi dall'arrivo in azienda dei suini)</b>	<b>2° PRELIEVO 16-05-11(n°20) (prelievo pre- macellazione)</b>
<b>IHA SIV A/H1N1/267505/10</b>	25/30 negativi 5/30 positivi (titoli tra 1: 20/1:40)	17/20 negativi 3/3 positivi (titoli tra 1:20/1:40)
<b>IHA SIV A/H1N2/284922/09</b>	1/30 negativi 29/30 positivi (titoli tra 1:20 /1:320)	5/20 negativi 15/20 positivi (titoli tra 1:20/1:80)
<b>IHA SIV A/H3N2/312583/09</b>	30/30 negativi	20/20 negativi
<b>PRRS Anticorpi</b>	30/30 negativi	20/20 negativi
<b>Aujeszky anticorpi gE</b>	30/30 negativi	20/20 negativi
<b>PCV2 Anticorpi</b>	30/30 positivi (titoli: tutti = o > 1:10000)	ND
<b>PCV2 RT-PCR</b>	4/30 negativi 26/30 positivi (18/30 con <980 copie di genoma virale/ml; 5/30 con n° copie g.v. comprese tra 1.000 e 12.000/ml)	ND
<b><i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> anticorpi</b>	23/30 negativi 7/30 positivi	ND
<b><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> anticorpi</b>	1/30 negativi 29/30 positivi (titoli compresi tra 0,5/3,1 S/P; media titoli S/P: 1,32)	0/20 negativi 20/20 positivi (titoli compresi tra 0,5/2,5 S/P; media titoli S/P: 1,22)

**\*La diagnosi per Influenza con il kit-rapido fu emessa in data 23-03-11**

**Figura 1. Veduta aerea dell'allevamento da ingrasso (Sito 3) colpito dal focolaio di Influenza**  
**Figure 1. Aerial view of fattening herd (Site 3) that experienced Flu outbreak**



**Figura 2.** Albero filogenetico delle sequenze della regione HA1 di virus H1N1 e H1N2 di referenza e dello stipiteA/sw/It/74528-5/11

**Figure 2.** Phylogenetic tree of HA1 region of H1N1 and H1N2 reference viruses and of A/sw/It/74528-5/11 strain

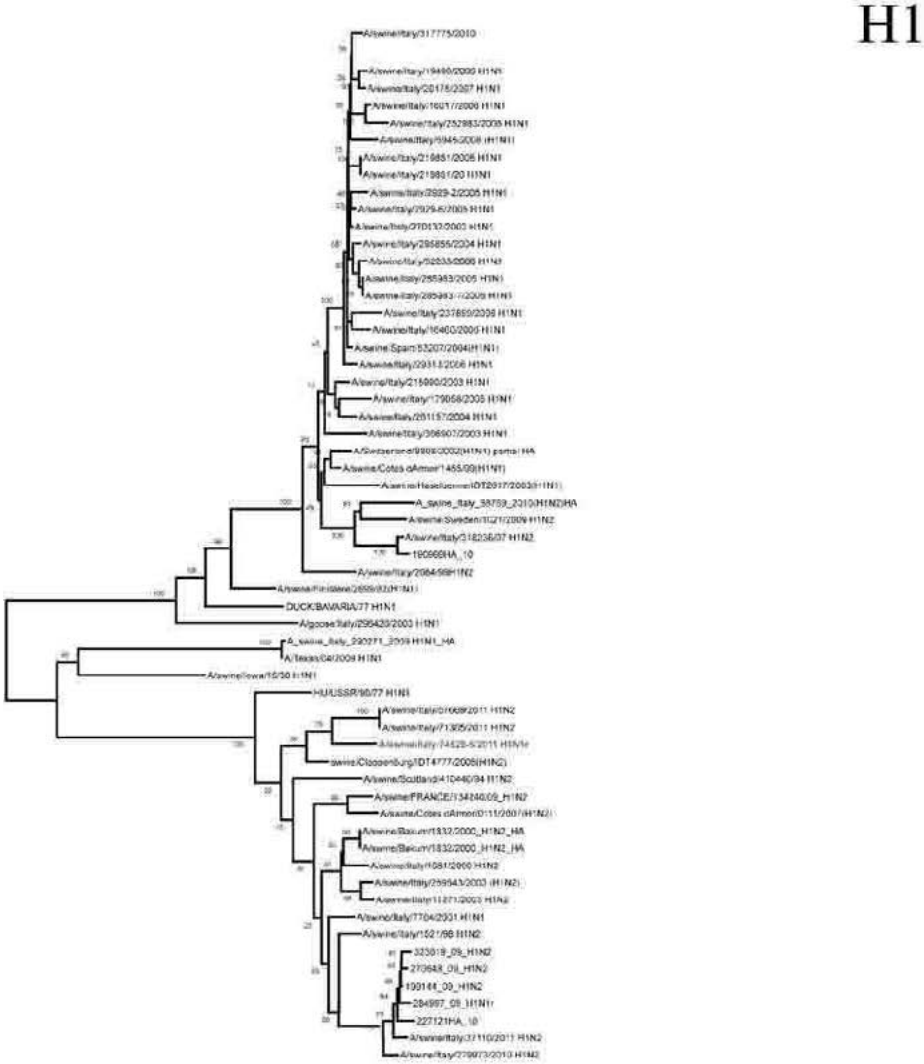


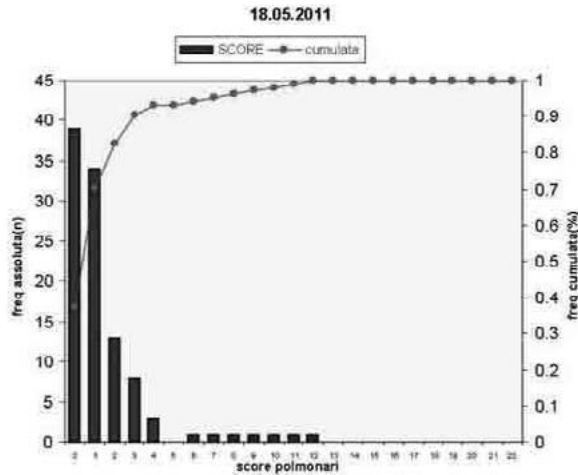
Fig. n.1: Albero filogenetico delle sequenze della regione HA1 di virus H1N1 e H1N2 di referenza e dello stipiteA/sw/It/74528-5/11.

0.05



-Macello

**Figura 3.** Rappresentazione grafica dei Punteggi polmonari delle lesioni Mico-like  
**Figure 3.** Graphic of Myco-like lung lesions score



Alcuni parametri descrittivi della distribuzione osservata sono qui sotto riportati:

	N	Media	ds	Mediana	Moda	Incidenza
Score polmonare	104	1.53	2.33	1	0	62.5%

**Figura 4.** Punteggio A.P.P.I. dell'allevamento esaminato in rapporto alla distribuzione dei punteggi A.P.P.I. nazionali: tali punteggi sono suddivisi in quattro quartili (punteggi medi provenienti dalla classificazione di n° 14.195 polmoni): valori A.P.P.I. <0,28 (quarto migliore delle aziende campionate); valori A.P.P.I. 0,28/0,53 (quarto intermedio migliore); valori A.P.P.I. 0,53/0,81 (quarto intermedio peggiore); valori A.P.P.I. >0,81 (quarto peggiore)

**Figure 4.** A.A.P.I. Index of examined fattening herd vs average national A.P.P.I. Index: such values are divided in four classes (Average score based on n° 14.195 lungs observation): A.P.P.I. <0,28 (best quarter); A.P.P.I. from 0,28 to 0,53 (intermediate best quarter); A.P.P.I. from 0,53 to 0,81 (intermediate worst quarter); A.P.P.I. >0,81 (worst quarter).

A.P.P.I. Index = 0,29. Quest'azienda si posiziona nel quarto intermedio migliore della distribuzione delle aziende Italiane finora campionate nel periodo compreso tra febbraio 2008 e gennaio 2011.



-Polmone

L'esame anatomopatologico rilevò la presenza di aree globulari di consolidamento del parenchima polmonare a carattere globulare con localizzazione prevalentemente apicale.

Gli esami virologici tesi a evidenziare, mediante test in PCR, l'eventuale presenza di PRRSv e SIV risultarono negativi.

Fu isolata una *Pasteurella multocida* che l'antibiogramma classificò come sensibile alla maggior parte degli antibiotici-chemioterapici testati.

#### *Impatto economico del focolaio*

Per il calcolo, non certamente facile e sempre opinabile, delle perdite subite in seguito a questo prolungato focolaio di SI (A/H1N1), ci siamo avvalsi dell'uso di una tabella che elenca sinteticamente le singole perdite produttive da un lato e il loro impatto economico dall'altro, formulando anche, unicamente per uno degli eventi presi in considerazione, due diverse valutazioni di calcolo.

**Tabella 4.** *Perdite produttive e relativo impatto economico del focolaio di influenza(A/H1N1)*  
**Table 4.** *Productivity losses caused by the influenza (A/H1N1) outbreak and relative economic impact*

<b>Evento</b>	<b>Valutazione n°1</b>		<b>Valutazione n°2</b>	
	Note e modalità di calcolo	€	Note e modalità di calcolo	€
Terapie	Amoxicillina, Doxiciclina, Lincomicina Sulfamidico/Trimethoprim	+5.300	Idem	+5.300
Suini morti per Influenza(n°66)	66 suini x 145 kg (p.v. medio) x 1,4*€	+13.398	Idem	+13.398
Smaltimento delle carcasse	66 carcasse x 145 kg x 200 €/ ton	+1.914	Idem	+1.914
Mangime non consumato per riduzione consumi	2.804 suini macellati x 1,215 kg**/suino x 10 giorni x 0,17 €***	-5.791,6	Idem	-5.791,6
Mancato accrescimento dei suini	Questa 1° valutazione è basata sulla riduzione accertata dei consumi di mangime del 45% per 10 giorni: è stimato un decremento conseguente della crescita giornaliera attesa di almeno il 50% = - 3,5 kg p.v. al macello	+13.740	Questa 2° valutazione è basata sulla differenza degli incrementi medi in kg p.v. tra i suini della banda colpita da influenza e la banda precedente dello stesso allevamento non colpita da SI° = - 2,8 kg p.v. al macello	+10.992
Impatto economico totale		28.560,4		25.812,4
Impatto economico calcolato x ogni suino macellato		<b>10,18</b>		<b>9,20</b>

\* Prezzo di mercato di un Kg p.v. di carne suina: a questo andrebbe sommato il premio e il recupero IVA.

\*\*Stimando un normale consumo alimentare giornaliero per un suino di quest'età di 2,7 kg di mangime

\*\*\*Costo mangime/kg

°Dati non riportati in questo lavoro.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo focolaio conferma l'attualità e l'importanza delle infezioni da SIV nei suini, in quanto le manifestazioni cliniche sono state significative, prolungate ed essendosi estese a tutti i settori di questo allevamento da ingrasso, hanno avuto come conseguenza anche un importante risvolto economico, equiparabile a quelli forniti da altri Autori in altrettanti focolai di SI (Donovan *et al.*, 2005; Bardini *et al.*, 2010; Dréau *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2006). A tal proposito ci sembra corretto segnalare che non è stato possibile rilevare i punteggi qualitativo-merceologici delle carcasse (Griglia EUROP) degli animali coinvolti in questo focolaio e il mancato rilievo non ha consentito di valutare se l'episodio influenzale abbia potuto determinare un peggioramento di tali parametri a forte incidenza economica, come spesso è riportato dai veterinari e allevatori in casi simili. Ci sembra interessante da un lato rilevare che SIV ha svolto in questo focolaio un ruolo come agente eziologico primario di malattia respiratoria, ruolo da tempo riconosciuto a questo virus dalla letteratura (Olsen *et al.*, 2006) e dall'altro, la completa assenza, nei suini coinvolti in questo focolaio, di altre importanti virosi, spesso presenti nei nostri allevamenti, come PRRS e Aujeszky e una situazione sanitaria ben controllata nei confronti di PCV2, come evidenziato dalle indagini sierologiche e virologiche svolte.

Per quello che riguarda il dato dello "Scoring polmonare", a fronte di un riscontro pleurico (punteggio S.P.E.S./A.P.P.I.) tranquillizzante (ricordiamo, a tal proposito, che i dati sierologici nei confronti di *Actinobacillus pleuropneumoniae* evidenziarono un basso livello di positività), si può considerare il punteggio medio per le lesioni *Mico-like* (1,53), \*pur accettabile, non del tutto soddisfacente: in un gruppo vaccinato per *Mycoplasma hyopneumoniae*, infatti, si può ottenere normalmente di meglio, anche se i fattori che condizionano questo risultato non sono solo di ordine infettivo. Senz'altro il virus influenzale condiziona l'intervento di batteri di irruzione secondaria, soprattutto *Pasteurella multocida*, che notoriamente è l'agente più importante nella complicazione dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dottori M.: \*comunicazione personale).

Un altro rilievo di natura epidemiologica degno di interesse è constatare che tale focolaio di SI si è verificato all'interno di un'organizzazione di allevamento multi-sito, con una gestione dei flussi animali ottimale, che applica con rigore la pratica del "tutto-pieno/tutto-vuoto", in un'area geografica che non è considerata tra quelle a rischio per influenza e in una stagione primaverile ormai mite in quest'area dell'Italia centrale, anche se vicina a un grande lago che potrebbe sempre rappresentare sito di frequentazione di uccelli migratori, potenziali vettori di virus influenzali.

La raccolta dei dati diagnostici ci permette di affermare che nell'allevamento si è verificata un'intensa circolazione di SIV sottotipo H1N1 riassortante per quanto riguarda il gene HA, in quanto riportabile a HA di origine umana, appartenente a SIV sottotipo H1N2: anche i riscontri sierologici per i tre sottotipi di virus influenzali rilevarono indirettamente la presenza di un sottotipo H1N1 "anomalo", in quanto si riscontrarono titoli sierologici elevati per il sottotipo H1N2, nonostante sia poi stato isolato, appunto, un sottotipo H1N1. Inoltre il riscontro, in uno dei campioni, di un frammento di HA riferibile ad un SIV sottotipo H1N1 di tipo aviare, ci autorizza a ipotizzare che si sia verificata la circolazione contemporanea di diversi sottotipi di SIV.

Infine alcune considerazioni sulla diagnosi: le tecniche diagnostiche attualmente a disposizione del veterinario per la conferma di un sospetto, su base clinica, di SI sono diverse, efficaci (VI, RT-PCR, kit rapidi, ecc) e disponibili in molti laboratori diagnostici, ma certamente la raccolta tempestiva di materiale organico da suini con T° in allevamento (la durata dell'emissione virale dalle cavità nasali non sembra andare oltre i 7-8 giorni, come già

ricordato) (Olsen *et al.*, 2006), mediante idonei tamponi nasali, è certamente da privilegiare e incentivare. Le moderne tecniche di analisi genetica, inoltre, possono far luce su molti aspetti di natura epidemiologica relativi a SI ed essere in grado di aiutare il veterinario nell'identificazione dei fattori di rischio e nella conseguente individuazione e applicazione di misure idonee al controllo aziendale di tale malattia dei suini, la cui importanza, nel nostro paese, è spesso sottovalutata.

## **RINGRAZIAMENTI**

Gli autori ringraziano il sig. Paolo Topini, proprietario dell'allevamento e il Dr Giovanni Macris per la preziosa e appassionata collaborazione fornita, nonché la Prof.ssa M.L. Tanzi (Dipartimento di Sanità Pubblica-Università di Parma) per l'esecuzione delle prove sierologiche sul siero umano.

## **BIBLIOGRAFIA**

Allerson M., Torremorell M., Gramer M. (2011) "Duration of influenza virus infection under field conditions in grow-finish swine populations" in Proceedings Allen D.Leman Swine Conference, 71-72.

Bardini R., Leotti G., Nigrelli A.D., Rosignoli C., Foni E., Sarli G., Morandi F., Galuppini A., Zamperlin D. (2011) "Descrizione di un focolaio di Influenza (A/H1N2) in un allevamento a ciclo chiuso" in Atti SIPAS, 234-242.

Barigazzi G, Foni E., Chiapponi C., Leotti G., Longo S., Joisel F. (2003) "Use of a standard Kit for the diagnosis of respiratory viral infections in pigs". 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases, Roma-29 Giugno/2 Luglio 2003.

Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. (1999) "Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs". J. Vet. Diagn. Invest. 11 (3):246-251  
J Vet Diagn Invest. 1999 May; 11(3):246-51.

Candotti P., Foni E., Leotti G., Joisel F., Longo S., Rota Nodari S. (2003) "Serological prevalence for swine influenza virus in pigs between 3 and 15 weeks of age in Italian farms: evaluation of a maternal antibody decay curve". 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases, Roma-29 Giugno/2 Luglio 2003, 272-273.

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.

Chiapponi C., Barbieri I., Foni E. (2010) "Multiplex RT-PCR for rapid subtyping of haemagglutinin gene of Italian swine influenza virus" in Proceedings 1<sup>st</sup> Congress of the European association of veterinary Laboratory Diagnosticians 15-17 September 2010 Lelystad, The Netherlands. P 3-02.

Daum L.T., Suarez D.L. (2002) "Development a real time revers transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes". J. Clin. Microbiol. 40: 3256-3260.

Donovan T. (2005) “The role of Influenza on the growing pig” in Proceedings Allen D. Leman Conference, 97-98.

Dréau D., Perreul G., Laval A.. (2010) «Primo-infezione d'un cheptel de truie par le virus grippal dans une zone de faible densité porcine en 2010 ». Atti del Congresso AFMVP 2010, Parigi, 104.

Foni E., Chiapponi C., Sozzi E., Barbieri I., Moreno A.M., Merenda M., Luppi A., Alborali L., Cordioli P. “Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia”(2010). Atti XXXVI Meeting annuale SIPAS, 159-166.

Gradassi M., Sozzi M., Zanoni M., Salogni C., Cordioli P., Alborali L. (2009) “Il virus influenzale suino (*SIV*) e le principali associazioni virali, batteriche e da *Mycoplasma hypneumoniae*”. Atti XXXV Meeting annuale SIPAS, 229-239.

Guilmoto H. (2003) “La grippe dans l'espece porcine”. Atti del Congresso AFMVP 2003, 5-12.

J.Moody, T.Donovan, (2011) “How we deal with Swine Influenza Virus in a multisite production system” in Proceedings Allen D.Leman Swine Conference, 75-76.

Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004 Jun; 5(2):150-63.

Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M. (2011) “Griglia SPES: aggiornamenti sul monitoraggio delle lesioni pleuriche in suini macellati”. Atti XXXVII Meeting annuale SIPAS, 306-311.

Loeffen W.L.A., Kamp E.M. *et al.*(1999) “Survey of infectious agents involved in acute respiratory diseases in finishing pigs”. *Vet.Rec* 145,175-180.

Ma W, Lager K.M., Richt J.A., Stoffregen W.C., Zhou F., Yoon K.J. (2008) “Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses”. *J Vet Diagn Invest.* 2008 Jul;20(4):440-7.

Madec *et al.*, (1992) “Updated according to 2008 economic data”. *INRA Prod.Animale*, France, 5(2)149-16.

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

Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., Van Reeth K., (2006) “Swine Influenza”. *Diseases of swine*, 8<sup>th</sup> edition, 469-482.

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

Ostanello F., Dottori M., Gusmara C, Leotti G., Sala V. (2007) "Pneumonia Disease Assessment using a Slaughterhouse Lung-Score Method". *J.Vet.Med.* A54, 70-75.

Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P., Sala G. (2001) "Evaluation of three RT-PCR assay for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples" in *International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology.*

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.

Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K.,

Van Reeth K., Brown IH., Dürrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., Pospisil Z., Koch G.. (2008) "Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003". *Influenza and Other Respiratory Viruses.* May; 2 (3), 99-105.