

INDAGINE SIEROLOGICA NEI CONFRONTI DEI SOTTOTIPI H1N1, H1N2 E H3N2 DEL VIRUS INFLUENZALE IN CINGHIALI (*SUS SCROFA*) ABBATTUTI IN PROVINCIA DI RIMINI

SEROLOGICAL INVESTIGATION AGAINST H1N1, H1N2 E H3N2 INFLUENZA VIRUS IN WILD BOARS (*SUS SCROFA*) HUNTED IN THE PROVINCE OF RIMINI, ITALY

FIorentini L.¹, TOSI G.¹, TADDEI R.¹, ANGELINI R.², FABBRI D.², MASSI P.¹

1- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
Sezione Diagnostica di Forlì

2- Azienda Unità Sanitaria Locale di Rimini, Dipartimento di sanità Pubblica,
U.O. Sanità Animale

Parole chiave: influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, sierologia, cinghiale (*Sus scrofa*)
Key words: swine influenza, H1N1, H1N2, H3N2, serology, wild boar (*Sus scrofa*)

Riassunto.

Veniva condotta un'indagine sierologica nei confronti dei virus influenzali suini H1N1, H1N2 and H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL) tramite Inibizione dell'emoagglutinazione su 307 sieri di cinghiale (*Sus scrofa*) soggetti al Piano di monitoraggio della fauna selvatica 2011, tutti provenienti dalle aree venatorie della Provincia di Rimini. I risultati ottenuti hanno permesso di verificare una sieropositività totale pari al 4,9%: 8 campioni (2.6 %) risultavano positivi al sottotipo H1N1, 2 campioni (0.7 %) risultavano positivi al sottotipo H1N2, 5 campioni (1.6 %) risultavano positivi al sottotipo H3N2. Questa indagine sierologica dimostra la circolazione di tutti i sottotipi indagati dei virus influenzali suini anche nei cinghiali selvatici; la valutazione percentuale dei risultati ha evidenziato una maggior sieroprevalenza per il sottotipo H1N1, più bassi i valori per H3N2 e H1N2. Non sembra condizionante la stagionalità sulla prevalenza dei campioni sieropositivi. La forte presenza di allevamenti suini tipo *outdoor* tipici dell'area di studio, risulta probabilmente un fattore predisponente la circolazione dei virus influenzali tipici dei suidi domestici anche nell'omologo selvatico.

Abstract.

Sera from 307 wild boars subject to the Plan of wildlife monitoring 2011, were collected in the Province of Rimini, Italy, during hunting season. Inhibition of haemoagglutination test was used to detect antibodies against the following swine influenza strains: H1N1, H1N2 and H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL): 4.9% of the total tested samples were positive for antibodies against swine influenza: 8 samples (2.6%) were positive to the H1N1 subtype, 2 samples (0.7%) were positive to the H1N2 subtype, 5 specimens (1.6%) were positive to H3N2 subtype. This serological survey demonstrates the spread of all investigated subtypes of influenza viruses in wild boars. The obtained results showed a highest seroprevalence of the subtype H1N1, the lowest values for H3N2 and H1N2. The presence of *outdoor* pig farms typical of the study area, could be a predisposing factor in the spread of influenza viruses to wild boars.

INTRODUZIONE

Il cinghiale è l'unico animale selvatico italiano appartenente alla famiglia dei suidi, nella quale troviamo anche il suo omologo domestico: il suino.

Entrambi i suidi appartengono al genere *Sus* ed alla specie *Sus scrofa*.

Grazie ad alcune sorprendenti caratteristiche biologiche che lo rendono ecologicamente adattabile quasi a qualsiasi tipo di ambiente, il cinghiale è sicuramente, tra i grandi mammiferi europei, quello che ha conseguito il maggior successo evolutivo.

E' noto che la distribuzione e la consistenza del cinghiale sul territorio nazionale è notevolmente aumentata negli ultimi decenni soprattutto in relazione all'elevato incremento utile annuo tipico di questa specie (il più elevato fra gli ungulati: fino al 180% della popolazione).

Tale fenomeno consegue all'elevata capacità di adattamento, al miglioramento delle condizioni ambientali utili alla specie, alla graduale ricolonizzazione della vegetazione naturale.

L'ecologia quindi la presenza nel territorio delle specie selvatiche è in costante mutamento. I risultati dei recenti censimenti del lupo (unico predatore naturale il cui areale è sovrapposto a quello del cinghiale), hanno evidenziato un aumento di questa specie nell'area di studio, ciò nonostante il cinghiale è ancora molto presente nella provincia di Rimini.

Come molte specie selvatiche, il cinghiale può agire da serbatoio, vettore, ospite occasionale e sistema rivelatore (bioindicatore) di malattie trasmissibili ai suini domestici ad altre specie animali fino all'uomo.

Spesso la selvaggina ungulata e tra questa il cinghiale, si trova in condizioni di convivenza più o meno stretta con l'uomo e con il bestiame domestico. Ciò comporta la necessità di una conoscenza precisa delle interrelazioni di natura epidemiologica che si instaurano fra le popolazioni animali presenti.

Il controllo delle malattie infettive ed infestive nei selvatici è estremamente diverso e mostra maggiori complessità rispetto a quello attuato nei domestici. Per questo è necessario disporre di conoscenze dettagliate sul comportamento e sulla nicchia ecologica di un agente eziologico in un determinato ecosistema e sui rapporti epidemiologici che intercorrono tra agente eziologico e specie animali che possono fungere da ospite.

I selvatici possono presentare problemi sanitari comuni alle specie domestiche e spesso sviluppano una maggiore resistenza alle malattie infettive. Una conseguenza è la condizione di *reservoir* senza evidenza clinica di malattia.

Ciò può costituire un rischio di mantenimento di patologie nell'ambiente, di trasmissione ai selvatici a vita libera, ai domestici allevati fino all'uomo (zoonosi). (Meng X.J., 2009)

Per questo motivo, dal 2006, è in vigore un piano di monitoraggio della fauna selvatica che coinvolge diverse specie animali. A tale piano è affidata un'importante attività di monitoraggio delle malattie trasmissibili all'uomo e non solo, eventualmente presenti in ambito silvete.

La sorveglianza attiva sui cinghiali prevede attività di campionamento programmata su tutti i capi abbattuti nel corso dell'attività venatoria per la ricerca della *Trichinella* e, ove possibile, indagini sierologiche per Malattia Vescicolare, Malattia di Aujeszky, Peste Suina Classica, *Toxoplasmosi*. Il piano prevede inoltre il monitoraggio batteriologico per Tubercolosi e Brucellosi dai campioni prelevati presso i centri di lavorazione della selvaggina cacciata.

Congiuntamente ad accordi presi con il Servizio Veterinario di Rimini, abbiamo ritenuto interessante condurre un'indagine sierologica nei confronti dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2 del virus influenzale, sui cinghiali oggetto di attività venatoria nella stessa provincia. La caccia al cinghiale è praticata in due Ambiti Territoriali di Caccia (ATC) della Provincia di Rimini, il primo comprende l'area della vecchia provincia prima dell'annessione dei Comuni della Valmarecchia, l'altro ricalca i confini dei nuovi Comuni. Ogni ATC ospita al suo interno più distretti di caccia tutti rappresentativi dell'area di campionamento.

Il principale interesse dello studio è legato alla possibilità di poter svolgere un'indagine sierologica su una popolazione di suidi selvatici recettivi ai virus influenzali e senza interferenze vaccinali; di studiare una popolazione di animali che per caratteristiche territoriali hanno elevate probabilità di contatto con il suino domestico. Infatti la provincia di Rimini, soprattutto nella zona collinare, è caratterizzata da un'importante presenza di allevamenti suini all'aperto (*outdoor*) che, se in passato rappresentavano il normale sistema di conduzione oggi, grazie alla diffusione delle produzioni biologiche, sono stati rilanciati come forme di allevamento alternativo.

MATERIALE E METODI

In un periodo compreso tra gennaio e dicembre 2011 venivano analizzati 307 sieri di cinghiale soggetti al Piano di monitoraggio della fauna selvatica 2011-2012, tutti provenienti dalle aree venatorie della Provincia di Rimini (zone basse collinari e collinari, tipicamente preappenniniche con forte prevalenza di macchia mediterranea e faggeta. Il sangue veniva prelevato al momento dell'abbattimento dalla ferita e raccolto in provetta con gel separatore (Venoject). Dopo centrifugazione, il siero ottenuto veniva conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Tutti i sieri sono stati analizzati con test specifici tramite reazione di Inibizione dell'Emoagglutinazione (IEA) (Van Reeth K. et al, 2008) nei confronti dei virus influenzali H1N1, H1N2, H3N2 (GD- Animal Health Service Deventer, NL). Dopo titolazione dell'antigene tutti i sieri venivano pretrattati con inattivazione termica e potassio periodato allo scopo di eliminare le reazioni crociate con altri antigeni e le reazioni aspecifiche legate alla presenza di proteine sieriche. Venivano considerati positivi i campioni in grado di inibire il 100% di emoagglutinazione (HA) a partire dalla diluizione iniziale 1:20 (OIE-Manual of Diagnostic Tests, ed. 2010)

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica hanno permesso di valutare che 15 campioni su un totale di 307, ovvero il 4,9% dei sieri analizzati, presentavano una risposta sierologica positiva nei confronti di almeno un sottotipo di virus influenzale suino. La tabella 1 riporta i risultati ottenuti. In particolare 8 campioni (pari al 2.6 %) sono risultati positivi al sottotipo H1N1, 2 campioni (pari allo 0.7 %) sono risultati positivi al sottotipo H1N2, 5 campioni (pari allo 1.6 %) sono risultati positivi al sottotipo H3N2. Questa indagine sierologica dimostra la circolazione di tutti i sottotipi indagati dei virus influenzali suini anche nei cinghiali selvatici; la valutazione percentuale dei risultati ha evidenziato nei campioni analizzati una maggior sieroprevalenza per il sottotipo H1N1, più bassi i valori per H3N2 e H1N2.

Non sembra condizionante la stagionalità sulla prevalenza dei campioni sieropositivi. (Tabella 2)

Lo studio conferma l'importanza della sorveglianza epidemiologica della circolazione degli stipiti influenzali anche negli animali selvatici potenziali ospiti recettivi e *reservoir*. (Vicente J. et al, 2002)

CONCLUSIONI

Le infezioni da virus Influenzali (SIV) nel suino domestico sono note da diversi decenni, sono diffuse negli allevamenti suinicoli di tutto il mondo ed occupano un posto di primo piano nella malattia respiratoria del suino.

L'evoluzione subita nel corso del tempo dai virus dell'influenza suina (SIV) ha portato alla circolazione nella popolazione domestica dei sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2.

Le indagini svolte in precedenza in Italia hanno rivelavano assenza di sieropositività nelle

popolazioni di cinghiali (Cordioli P. et al, 1993), (Ferroglio E. et al, 2003)
 Segnalazioni di influenza suina nel cinghiale sono state fatte negli USA (OK) da Saliki *et al* (1998) ed in Spagna da Vicente *et al* (2002) con sieroprevalenze rispettivamente del 4% e dell'11%. Recenti indagini sierologiche condotte su cinghiali italiani, hanno individuato la presenza di anticorpi nei confronti del virus dell'influenza di tipo A nel 34% dei soggetti. (De Marco M.A. et al, 2011)

Dall'indagine sierologica oggetto dello studio, emerge una sieroprevalenza del 4,9% dell'influenza suina nei cinghiali della provincia di Rimini. Anche se bassa, questa sieropositività ai sottotipi influenzali del suino, dimostra una circolazione virale anche in ambito silvestre. Le caratteristiche del territorio, la forte presenza di insediamenti umani in aree sub-urbane, un forte sfruttamento dei terreni a scopi agricoli, ma soprattutto la forte presenza di allevamenti suini tipo *outdoor* tipici dell'area di studio, sono sicuramente fattori che favoriscono la circolazione dei virus influenzali tipici dei suidi domestici anche nell'omologo selvatico che funge così anch'esso da ospite recettivo e *reservoir*.

Tabella 1.

Esiti indagini sierologica nei confronti di virus influenzale suino in 307 sieri di cinghiale tramite IEA

Titolo IEA	<20	20	40	80	160	320	Totale (%)
H1N1		6	1	0	1	0	8 (2.6%)
H1N2		0	0	0	2	0	2 (0.7%)
H3N2		3	1	0	0	1	5 (1.6%)
TOTALE CAMPIONI ANALIZZATI							
n. 307							
TOTALE DI CAMPIONI SIEROPOSITIVI							
n. 15							
PERCENTUALE DI SIEROPREVALENZA							
4.9 %							

Tabella 2.

Rapporto tra campioni sieropositivi e stagionalità

	Totale campioni analizzati	Totale campioni sieropositivi	sieropositivi H1N1	sieropositivi H1N2	sieropositivi H3N2
gennaio	0	0	0	0	0
febbraio	0	0	0	0	0
marzo	0	0	0	0	0
aprile	0	0	0	0	0
maggio	22	2	0	0	2
giugno	8	0	0	0	0
Luglio	3	0	0	0	0
agosto	6	2	0	0	2
settembre	14	0	0	0	0
ottobre	44	3	2	0	1
novembre	108	6	4	2	0
dicembre	102	2	2	0	0

BIBLIOGRAFIA

Cordioli P., Callegari S., Berlinzani A., Foni E., Candotti P. & Barigazzi G. (1993) Indagine sierologica su cinghiali selvatici dell'Appennino parmense. *Atti S.I.S.VET.*, XLVII: 1159-1167

De Marco M.A., Cotti C., Ghetti G., Piredda I., Musto C., Raffini E., Frasnelli M., Donatelli I., Delogu M. (2011) Antibodies to influenza A virus in european wild boars (*sus scrofa scrofa*) from northern Italy. 6th European Meeting on Viral Zoonoses, 1-4 October 2011, St Raphaël, France

Ferroglio E., Acutis P.L., Masoero L., Gennero S., Rossi L. (2003) Indagine sierologica su una popolazione di cinghiali nelle alpi Occidentali. *J.Mt. Ecol.*,7 (Suppl.)

Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical transactions of the Royal Society* 364, 2697-2707

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. 2010, Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.

Saliki J. T., Rodgers S. J., Eskew G. (1998) Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J. Wildl. Dis.* 34, 834–838

Van Reeth K., Brown I.H., 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 Other Respiratory Viruses*. May; 2 (3): 99-105

Vicente J., León-Vizcaíno L., Gortázar C., José Cubero M., González M., Martín-Atance P. (2002) Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain *J. Wildl. Dis.* 38, 649–652

OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, ed. 2010, Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.