

# INDAGINE SULLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A NELLA POPOLAZIONE DI CINGHIALI DELLE PROVINCIE DI PARMA E PIACENZA

## *EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF SWINE INFLUENZA A VIRUS IN WILD BOAR POPULATION IN PARMA AND PIACENZA ITALIAN PROVINCES*

FONI E.<sup>1</sup>, GARBARINO C.<sup>2</sup>, CHIAPPONI C.<sup>1</sup>, CORDIOLI P.<sup>3</sup>, BAIONI L.<sup>1</sup>, ZANNI I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> OIE Reference Laboratory for Swine Influenza Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Via Dei Mercati 13A, 43126 Parma;

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna,  
Strada Faggiola 1, 29027 Piacenza

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Virologia Via A. Bianchi  
9 25125 Brescia.

**Parole Chiave:** influenza virus, cinghiale, anticorpi

**Key words:** influenza virus, wild boar, antibodies

### **RIASSUNTO**

Lo studio riporta i dati di un monitoraggio virologico e sierologico nei confronti del virus influenzale tipo A nella popolazione di cinghiali presenti sul territorio delle provincie di Parma e Piacenza. Nell'ambito dei programmi di contenimento sul territorio del numero di cinghiali e della attuazione del Piano Regionale di Monitoraggio della Fauna Selvatica sono stati raccolti 354 campioni di polmone da cinghiali, abbattuti e cacciati, pervenuti nei centri di raccolta autorizzati per la lavorazione delle carcasse. Sono stati inoltre raccolti 1977 campioni di siero. I 354 campioni di polmone sono stati esaminati per la presenza gene M del virus dell'influenza tramite Real Time PCR. I 12 campioni risultati positivi sono stati sottoposti a prove di isolamento virale e RT multiplex PCR per identificazione del sottotipo. I test di isolamento virale hanno permesso di ottenere 3 isolati virali che, tramite prove di tipizzazione biomolecolare e antigenica sono risultati stipiti virali riferibili al sottotipo avian-like H1N1 suino. L'analisi filogenetica di uno degli stipiti isolati dal cinghiale, A/wb/291320/12, ha confermato i dati antigenici. L'indagine condotta non ha messo in evidenza nei polmoni considerati la presenza di virus influenzale H1N1 pdm 2009. Dei 1977 sieri esaminati, 78 campioni sono risultati positivi per anticorpi nei confronti della nucleoproteina del virus influenza A e 68 di questi presentavano titoli nei confronti dell'isolato A/wb/291320/12.

### **ABSTRACT**

Since July 2012 to December 2012, during hunting and culling programs, 354 lungs samples were collected from wild boar stalked in Parma (n= 224) e Piacenza (n=130). The samples were submitted to Real Time PCR for gene M of SIV. The samples resulted positive to PCR tests were submitted to isolation tests. The real time PCR tests detected 12 SIV positive samples (3,38%), 3 SIV were isolated ant they were identified the isolates as avian-like SIV subtype H1N1. Phylogenetic analysis of the sequences obtained from isolate A/wb/291320/12 showed it clustered with recent Italian avian-like H1N1 SIVs isolated from domestic pigs. A collection of 1977 sera samples were submitted to ELISA test against Nucleoprotein of Influenza A virus and the 78 positive samples were submitted to inhibition

of haemoagglutination test. 68 samples showed positive titers to the isolate A/wb/291320/12. This study suggests that SIV actively circulates in wild boar population in the investigated area. Wild boar influenza A virus infection should be more widely studied to better understand the epidemiological role of this specie in the evolution of influenza virus infection.

## INTRODUZIONE

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia *Orthomixoviridae*, genere *Influenzavirus* che comprende tre tipi: A, B e C. I virus di maggiore importanza sono i virus appartenenti al tipo A che infettano sia l'uomo che varie specie animali: principalmente suini, canidi, equini, uccelli selvatici e domestici. Le specie aviarie selvatiche svolgono un ruolo primario nell'ecologia del Virus Influenza tipo A (Alexander et al 2000). Per le caratteristiche di segmentazione del genoma virale i virus influenza A, e quindi anche il virus dell'influenza suina, vanno incontro nel tempo a continue evoluzioni antigeniche (Webster 1998). Il suino, in particolare, svolge un ruolo importante nell'ecologia del virus influenzale in quanto specie suscettibile ad infezione sia da parte di virus aviari che virus che infettano i mammiferi, compreso l'uomo (Brown 2000).

L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina italiana di tre diversi principali sottotipi H1N1, H3N2, H1N2 e recentemente del sottotipo H1N1pdm 2009, il coinvolgimento del virus influenzale suino nel determinismo dell'insorgenza delle forme respiratorie nell'allevamento intensivo è stimato intorno al 12% dei casi (Foni E. et al. 2010).

Se molto è stato fatto nello studio epidemiologico del virus influenzale per le specie animali domestiche, senz'altro uno studio più approfondito delle dinamiche di evoluzione della infezione influenzale nelle specie selvatiche sarebbe auspicabile. Esigue e parcellizzate sul territorio sono le indagini epidemiologiche riguardanti il ruolo svolto dal suino selvatico e/o dal cinghiale, entrambi appartenenti alla specie *Sus scrofa*, nel mantenimento e/o diffusione del virus influenzale. Studi di prevalenza sierologica nei confronti del virus influenzale in questa specie vengono riportati in alcuni paesi Europei nei confronti del sottotipo H1N1: 0,7% in Polonia (Markowska 2003), 4% (Vincente 2002) e 6,4% (Closa-Sebastià et al. 2011) in Spagna. Uno studio svolto in Slovenia non ha evidenziato positività per influenza su 178 campioni di siero (Vengust 2006), in Germania si è osservata positività del 7,8% e 5,2% in studi di due anni consecutivi (Kaden et al. 2008, Kaden et al. 2009), in Croazia si è riscontrata positività del 9,7% (Roic et al 2012). Anche negli USA, se pur su esigui numeri di osservazioni, alcuni studi hanno evidenziato positività sierologica nei suini selvatici nei confronti di influenza suina in Oklahoma (Saliki et al. 1998) e in Kansas (Gipson et al. 1999). Alcuni autori nel South and North Carolina, hanno riscontrato variazioni dallo 0% al 91% a seconda dell'area geografica (Corn et al. 2009). In Texas, recentemente, è stata dimostrata, nei suini selvatici, la circolazione di un virus influenzale riferibile al sottotipo H1N1 pdm 2009 (Clavijo et al. 2012). Nel sud della Francia, in un'area condivisa da popolazione di cinghiali e specie aviari acquatiche in migrazione è stata condotta una indagine sia virologica che sierologica nei cinghiali senza poter dimostrare la circolazione di virus influenzali (Vittecoq et al. 2012).

In Italia, dati non recenti hanno escluso la circolazione del virus influenzale nella popolazione di cinghiali nell'area dell'Appennino Parmense (Cordioli et al. 1993), osservazione confermata da studi più recenti che riguardano i cinghiali presenti nell'Arco Alpino occidentale (Ferroglio et al. 2003).

In questo studio, considerata l'alta densità di allevamenti suini presenti nell'area padana, l'elevata incidenza di infezione da influenza virus nell'allevamento intensivo del suino

commerciale (Foni et al. 2010) e il progressivo aumento della numerosità della popolazione di cinghiali sul territorio italiano (Carnevali et al. 2009), si è operato al fine di acquisire dati epidemiologici recenti riguardo alla circolazione di virus influenzale nella popolazione di cinghiali. E' stata individuata come area di interesse quella delle provincie di Parma e Piacenza che comprendono vaste aree di territorio di superficie protetta che ricade sotto la gestione Parchi Regionali "Area Parchi Emilia Occidentale".

## **MATERIALI E METODI**

Nel periodo compreso tra Luglio 2012 e Dicembre 2012 nell'ambito della attività di sorveglianza attiva prevista dal Piano Regionale di Monitoraggio della Fauna Selvatica 2012-2013, si è concordata la raccolta di campioni di polmoni provenienti da soggetti abbattuti sia nel corso della attività venatoria che nell'ambito dei piani provinciali di controllo delle provincie contigue di Parma e Piacenza. Dei 354 campioni prelevati 130 campioni provenivano dall'area piacentina e 224 campioni dall'area parmense. Si è proceduto inoltre anche alla raccolta e stoccaggio dei sieri di cinghiali cacciati o abbattuti nella medesima area nello stesso arco temporale. Complessivamente sono stati raccolti 1977 campioni di siero.

I 354 campioni di polmone sono stati esaminati con tecnica di Real-Time PCR (Slomka et al.2010) per la ricerca di virus influenzale tipo A. I campioni positivi per la presenza del gene M di virus influenzale di tipo A sono stati quindi inoculati su uova embrionate di pollo SPF e su due linee cellulari, CACO-2 e MDCK, come descritto in precedenza (Chiapponi et. al 2009).

Per verificare la presenza del virus influenzale i sovrinatanti delle colture e i liquidi allantoidei raccolti sono stati sottoposti a test ELISA nei confronti della nucleoproteina di virus influenzali di tipo A (Foni E. et al. 1995) e a test di emoagglutinazione (OIE 2010). Prima di definire un campione come negativo i test sono stati eseguiti su due passaggi seriali di isolamento.

Sui campioni risultati positivi per presenza di virus influenzale si è proceduto alla tipizzazione del virus isolato mediante RT Multiplex PCR (Chiapponi et al. 2012), confermata da test di inibizione dell'emoagglutinazione allestito utilizzando sieri iperimmuni nei confronti di virus di referenza del virus influenzale suino (OIE 2010). Nei casi in cui i campioni di polmone, pur risultando positivi in PCR, risultavano negativi all'isolamento virale, si è proceduto ad eseguire RT multiplex PCR a partire dall'omogenato di polmone, al fine di individuare il sottotipo di virus influenzale suino presente se pur non isolabile.

Uno degli stipiti isolati è stato sottoposto ad analisi genetica tramite sequenziamento dell'antigene HA, NA e degli altri geni interni mediante sequenziatore automatico ABI 3130. Le sequenze ottenute sono state elaborate con il software Lasergene (DNASTAR, Madison, WI). Le sequenze genetiche ottenute sono state allineate mediante il software ClustalW (Larkin et Al. 2007) con sequenze di virus influenzali suini di riferimento presenti in GenBank e sequenze di isolati presso l'IZSLER. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il software MEGA5 con il metodo Neighbor-Joining con test bootstrap (1000 replicati) (Tamura et al. 2011).

I 1977 campioni di siero di cinghiale raccolti sono stati esaminati tramite test ELISA per la presenza di anticorpi nei confronti di NP del virus influenza A (De Boer et al. 1990). I campioni risultati positivi sono stati testati mediante inibizione dell'emoagglutinazione (Kendall et al. 1992, OIE 2010) per la presenza di anticorpi verso i tre sottotipi circolanti attualmente nella popolazione suina e precisamente: H1N1 A/sw/It/267505/10, H3N2 A/sw/It/312583/09 e H1N2 A/sw/It/284922/09. Nella prova è stato inoltre utilizzato, in parallelo, lo stipite virale omologo isolato da cinghiale: A/wild boar/It/ 291320/12. Sono stati considerati

positivi i campioni che presentavano titolo  $\geq 1/20$  . Nel caso di positività nei confronti di più sottotipi, al fine di evitare errori di interpretazione dovuti a cross reattività del siero, un campione veniva considerato negativo nei confronti di un determinato sottotipo se la differenza nei confronti dell'altro sottotipo era maggiore di due diluizioni in base 2.

## RISULTATI

Dei 354 campioni di polmoni sottoposti ad analisi biomolecolare, 12 campioni (3,38%) sono risultati positivi per la presenza del gene M del virus dell'influenza A. I test di isolamento virale su questi campioni positivi hanno permesso di ottenere 3 isolati virali che, sia tramite prove di tipizzazione biomolecolare in multiplex PCR, sia tramite prove di tipizzazione antigenica tramite tecnica sierologica sono risultati stipiti virali riferibili al sottotipo avian-like H1N1 suino. I 12 campioni PCR positivi facevano parte dei 130 campioni raccolti nella provincia di Piacenza, in particolare si trattava di soggetti abbattuti nei comuni di Bobbio, Vernasca, Rivergaro e Ponte dell'Olio. Per quanto riguarda i rimanenti 9 campioni positivi a PCR, ma negativi all'isolamento virale, la prova di tipizzazione biomolecolare applicata all'omogenato di polmone ha messo in evidenza virus influenzale suino H1N1 avian-like. L'indagine condotta non ha messo in evidenza nei polmoni considerati la presenza di virus influenzale H1N1 pdm 2009.

L'analisi filogenetica dello stipite isolato dal cinghiale dimostra la sua stretta correlazione con i virus influenzali suini sottotipo H1N1 avian-like isolati negli ultimi anni, sia per quanto riguarda l'antigene HA che per quanto riguarda l'antigene NA (Fig. 1 e 2).

La prova immunoenzimatica ELISA per la ricerca di anticorpi nei confronti della nucleoproteina del virus influenzale eseguita su 1977 campioni di siero di cinghiale collezionati nel corso del 2012 dai cinghiali abbattuti, ha messo in evidenza la presenza di 78 sieri positivi (3,9%). Di questi 42 provenivano da soggetti abbattuti sul territorio della provincia di Parma e 36 da soggetti abbattuti in provincia di Piacenza.

La reazione di inibizione dell'emoagglutinazione eseguita sui 78 campioni risultati positivi al test immunoenzimatico, ha messo in evidenza la presenza di 58 campioni di siero con anticorpi nei confronti del sottotipo H1N1 A/sw/It/267505/10 utilizzato nella routine diagnostica dell'influenza suina e di 68 campioni positivi nei confronti del virus omologo A/wb/It/291320/12, il primo stipite isolato nel corso dell'indagine. Dei 68 campioni positivi 35 provenivano dal parmense e 33 dal piacentino. Solo 1 campione ha presentato titoli nei confronti del sottotipo H3N2 con un valore (1/640) non ascrivibile a cross reattività, si tratta di un campione proveniente dal comune di Bobbio. Le prove eseguite con lo stipite omologo isolato da cinghiale, hanno evidenziato non solo un numero più elevato di sieri positivi complessivamente sulle due province, ma hanno dato la possibilità di evidenziare titoli più elevati come evidenziato nella tabella n. 1.

H1N1	n. positivi	20	40	80	160	320	640	>1280
A/sw/It/267505/10	58	21	21	12	1	3	0	0
A/wb/It/291320/12	68	8	16	15	17	8	2	2

**Tabella n.1:** Confronto fra titoli anticorpali ottenuti in reazione di inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando virus H1N1 suino e virus H1N1 cinghiale.

## **DISCUSSIONE**

L'indagine condotta sui campioni di polmone raccolti nel corso delle attività venatoria e di abbattimento programmato sul territorio delle provincie di Parma e Piacenza, ha messo in evidenza, per la prima volta, la circolazione di virus influenzale sottotipo H1N1 nei cinghiali, in un'area in cui si osserva una elevata densità di questa popolazione. La positività virologica è stato documentato essere peculiarità dei soggetti abbattuti in alcuni comuni della provincia di Piacenza. Pertanto restringendo l'ambito territoriale solo a questa provincia, la percentuale di positività dal 3,38% sul totale, sale a 9,23%. Le indagini sierologiche condotte sui 1977 sieri di cinghiale, oltre che confermare la circolazione del sottotipo H1N1 nei cinghiali dell'area piacentina, ha evidenziato che lo stesso virus sembra circolare anche nell'area parmense, visto il riscontro di positività, tramite inibizione dell'emoagglutinazione, di 35 campioni su 42 campioni positivi in test ELISA. Questo riscontro non sorprende vista la contiguità del territorio delle due provincie, le caratteristiche orografiche del confine e la tendenza del cinghiale a muoversi sul territorio. I titoli anticorpali elevati riscontrati utilizzando lo stipite cinghiale consentono di confermare la circolazione recente del virus. Il dato percentuale di positività virologica riscontrato in questo studio è un dato finora unico nel panorama epidemiologico europeo dell'influenza nei cinghiali. Viene riportato l'isolamento di 2 virus appartenenti al sottotipo H3N2 in Germania su 242 campioni esaminati (Kaden et al. 2008). Non va sottovalutato, se pur nella scarsa significatività numerica, il riscontro di positività sierologica nei confronti del sottotipo H3N2 in un cinghiale del comune di Bobbio, che suggerisce la necessità di ulteriori indagini per verificare se anche il sottotipo H3N2 possa svolgere un ruolo nell'epidemiologia dell'influenza in questa specie selvatica.

I dati dell'analisi filogenetica evidenziano che lo stipite circolante nella popolazioni di cinghiali è strettamente correlato al virus influenzale suino. Si è tentato di valutare quali dati oggettivi ambientali potevano essere stati determinanti nell'andamento epidemiologico dell'infezione fotografato dall'indagine.

L'analisi di elementi disponibili nella banca dati del centro Sorveglianza Epidemiologica Emilia Romagna (SEER) hanno evidenziato come nell'area dei comuni nei quali sono stati cacciati i soggetti risultati positivi al test virologico, siano presenti allevamenti familiari di suini, alcuni dei quali, di tipo semibrado anche aperto (Fig. n. 3). Possiamo ipotizzare che questi allevamenti possano rappresentare fonte di contaminazione per la popolazione selvatica per vari agenti patogeni e quindi anche per il virus dell'influenza che, nella popolazione suina domestica di tipo intensivo, per quanto riguarda il sottotipo H1N1, può raggiungere il 47% di incidenza nei casi clinici di forme respiratorie causati da virus influenzale (Foni E. com. pers). A questo osservazione si aggiunge anche la rilevazione, non georeferenziata, della presenza nella provincia di Piacenza, di allevamenti di cinghiali di tipo semibrado in recinto, nei quali non si può escludere possano essere stati introdotti suini domestici.

## **CONCLUSIONI**

L'approfondimento delle conoscenze sulla epidemiologia del virus influenzale A nell'ambito umano, aviario e suino e negli eventi di interscambio virale fra le specie è sempre stato considerato un passo obbligato per poter interpretare le dinamiche che sottendono alla sua evoluzione genetica. Considerata l'importanza dell'ambiente selvatico come reservoir del virus influenzale, la dimostrazione della circolazione di virus H1N1 nel cinghiale, conferisce a questa specie un ruolo epidemiologico da valutare attentamente. Va considerata la capacità degli adulti questa specie di coprire lunghe distanze durante l'attività venatoria o per la ricerca di cibo e/o di accoppiamento, comportamento che amplia considerevolmente la possibilità di trasmissibilità dell'infezione nell'ambito selvatico e da questo a quello domestico. Ne

conseguono un aumento di probabilità di interscambio virale tra specie domestiche e selvatiche sia della stessa specie, suina in questo caso, ma anche tra specie diverse, con maggior probabilità quelle aviari. La pianificazione, per legge, di piani di limitazione per il cinghiale e i piani di controllo previsti da Piani Regionali di Monitoraggio della Fauna Selvatica, almeno per le regioni Lombardia ed Emilia Romagna, rappresentano solidi presupposti perché una sorveglianza accurata sul territorio si possa realizzare.

**Ringraziamenti:** Si ringrazia il Servizio Vigilanza dell'Ente di Gestione per i Parchi e la Biodiversità Emilia Occidentale e i Veterinari dell'AUSL di Piacenza per la collaborazione fornita nella raccolta dei campioni, la Sig.ra Bresciani Daniela e la Sig.ra Roberta Manfredi per la preziosa collaborazione tecnica, il Dr. Giorgio Galletti per aver fornito i dati del SEER.

## BIBLIOGRAFIA

Alexander, D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3–13.

Brown, I.H., 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 7, 29–46.

Carnevali L., Pedrotti L., Riga F., Toso S. (2009) Banca Dati Ungulati: Status, distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di Ungulati in Italia. Rapporto 2001-2005. *Biol. Cons. Fauna*, 117:1-168

Chiapponi C. Zanni I., Garbarino C., Barigazzi G., and Foni E. (2010) “Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses” *Journal of Virological Methods*, Jan;163(1):162-5.

Chiapponi C., Moreno A., Barbieri I., Merenda M., Foni E. 2012. *J Virol. Methods.* 2012 184, 117-20

Clavijo A, Nikooienejad A, Esfahani MS, Metz RP, Schwartz S, Atashpaz-Gargari E, Deliberto TJ, Lutman MW, Pedersen K, Bazan LR, Koster LG, Jenkins-Moore M, Swenson SL, Zhang M, Beckham T, Johnson CD, Bounpheng M. (2012) “Identification and Analysis of the First 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus from U.S. Feral Swine” *Zoonoses Public Health.* 2012 Sep 17. doi: 10.1111/zph.12006. [Epub ahead of print]

Closa-Sebastià F., Casas-Díaz E., Cuenca R., Lavin S., Mentaberre G., Marco I.(2011) “Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia(NE Spain) *Eur. J. Wildl. Res.* 57:977-981

Cordioli P., Callegari S., Berlinzani A., Foni E., Candotti P., Barigazzi G.(1993) ”Indagine sierologica su cinchiali selvatici dell'Appennino Parmense” *Atti Della Società Italiana delle Scienze Veterinarie.* Riccione 29 Settembre- 2 Ottobre 1159-1162.

Corn, J.L., Cumbee, J.C., Barfoot, R., Erickson, G.A., 2009. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *J. Wildl. Dis.* 45, 713–721.

De Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D. (1990) “An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in human and various animal species” *Arch Virol.* 115,47-61.

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) 225-228

Foni E., Candotti P., Raffo A., Gamba D., Cataldi M., Barigazzi G.(1995) Utilizzo di ELISA Sandwich nella diagnosi di influenza suina a confronto con tecniche di isolamento virale. *Atti S.I.S.Vet.*, XLIX, 543-544.

Foni E., Chiapponi C., Sozzi E., Barbieri I., Moreno A.M., Merenda M., Luppi A., Alborali L., Cordioli P.(2010). Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia. *Atti del XXXVI Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini.* Montichiari (Bs)

Germundsson, A., Madslie, K.I., Hjortaa, M.J., Handeland, K., Jonassen, C.M., 2010. Prevalence and subtypes of Influenza A Viruses in Wild Waterfowl in Norway 2006–2007. *Acta Vet. Scand.* 52, 28.

Gipson, P.S., Veatch, J.K., Matlack, R.S., Jones, D.P., 1999. Health status of a recently discovered population of feral swine in Kansas. *J. Wildl. Dis.* 35, 624–627.

Grog, 2010 Human Influenza infections surveillance. Available from: <<http://www.grog.org/cgi-files/dh.cgi> (accessed 23.05.11).

Hall, J.S., Minnis, R.B., Campbell, T.A., Barras, S., Deyoung, R.W., Pabilonia, K., Avery, M.L., Sullivan, H., Clark, L., McLean, R.G., 2008. Influenza exposure in United States feral swine populations. *J. Wildl. Dis.* 44, 362–368.

Kaden, V., Lange, E., Hänel, A., Hlinak, A., Mewes, L., Hergarten, G., Irsch, B., Dedek, J., Bruer, W., 2009. Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 153–159

Kaden, V., Lange, E., Starick, E., Bruer, W., Krakowski, W., Klopries, M., 2008. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Vet. Microbiol.* 44, 362–368.

Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) “Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance”. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Service.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948)

Markowska-Daniel, I., 2003. Monitoring of swine influenza in Poland in the season 2001/2002. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases*, Rome, Italy, pp. 277–278.

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

Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T. (2012) "Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10" *J Wildl Dis.* 2012 Jan;48(1):131-7.

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.

Slomka MJ, Densham AL, Coward VJ, Essen S, Brookes SM, Irvine RM, Spackman E, Ridgeon J, Gardner R, Hanna A, Suarez DL, Brown IH (2010) "Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs". *Influenza Other Respi Viruses.* 2010 Sep;4(5):277-93. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00149.x.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739)

Vengust, G., Valencak, Z., Bidovec, A., 2006. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *J. Veterinary Med. Ser. B* 53, 24–27.

Vicente, J., Leon-Vizcaino, L., Gortazar, C., Cubero, M.J., Gonzalez, M., Martin-Atance M., 2002. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from south-central Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, 649–652.

Webster, R.G., 1998. Influenza: an emerging disease. *Emerging Infect. Dis.* 4, 436



# 1. HA

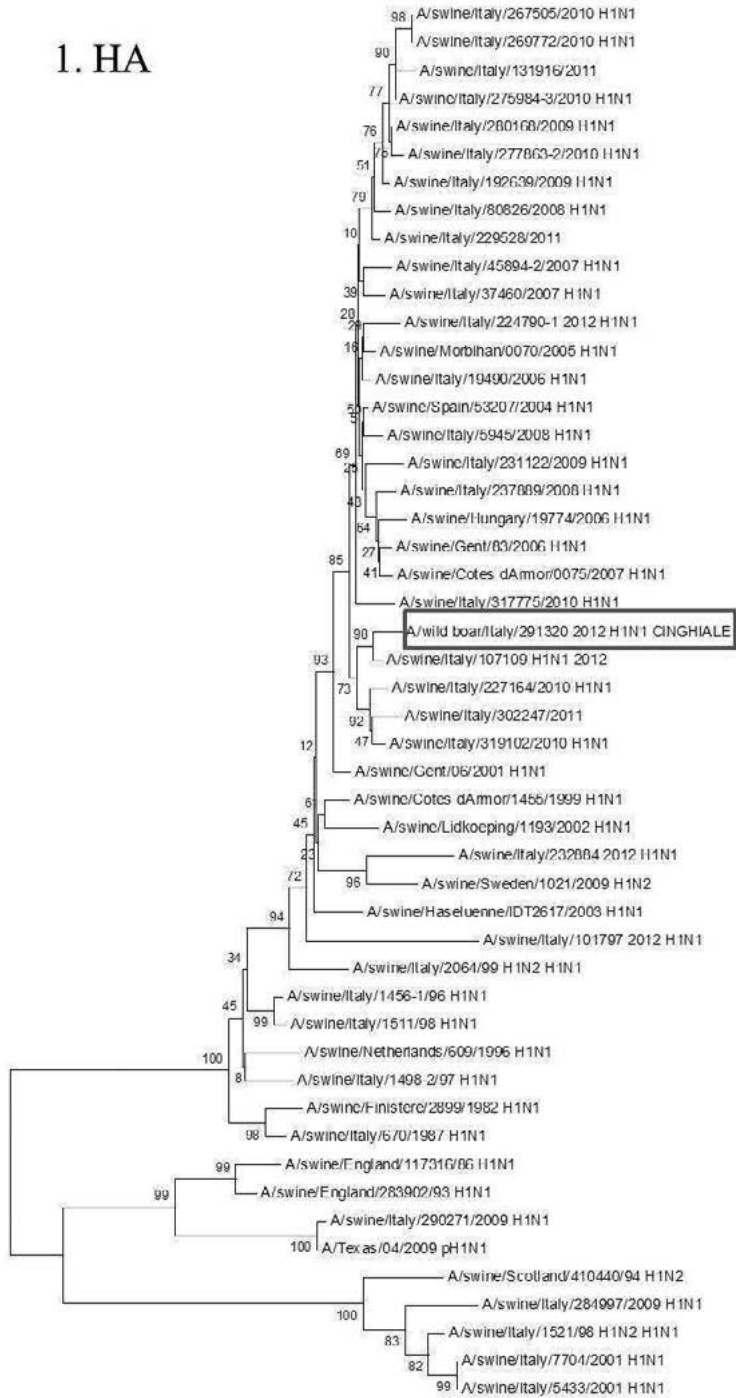
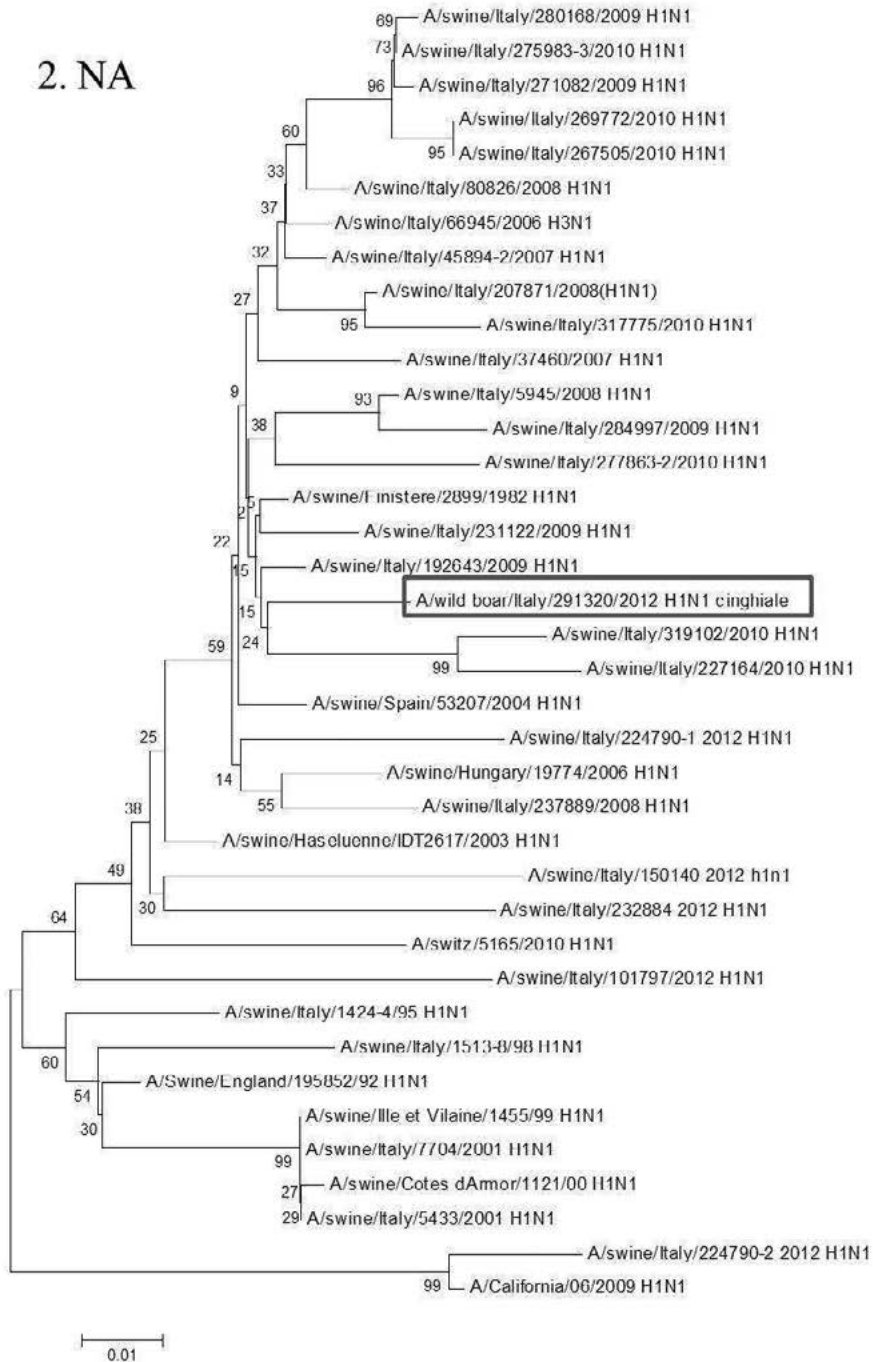


Figura. 1

0.05

## 2. NA



**Figure. 1 e 2** Analisi filogenetica del gene codificante per HA e per NA del virus A/wild boar/ Italy/291320/2012. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il software MEGA5 con il metodo Neighbor-Joining con test bootstrap (1000 replicati) (Tamura et Al. 2011).

