

## SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS “INFLUENZA D” IN SUINI DI ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

FONI E.<sup>[1]</sup>, CHIAPPONI C.<sup>[1]</sup>, FACCINI S.<sup>[2]</sup>, BAIONI L.<sup>[1]</sup>, BARBIERI I.<sup>[3]</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>[2]</sup>,  
MERENDA M.<sup>[1]</sup>, ZANNI I.<sup>[1]</sup>, MANFREDI R.<sup>[1]</sup>, SANDRI G.<sup>[4]</sup>, NIGRELLI A.D.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna Sezione di Parma ~ Parma ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna Sezione di Mantova ~ Mantova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy, <sup>[4]</sup>Agricola Tre Valli ~ Verona ~ Italy

Keywords: influenza D, virus, swine

### Riassunto

Tra i virus appartenenti alla famiglia Orthomyxoviridae è stato recentemente individuato un nuovo tipo di virus influenza che è stato proposto di identificare come “influenza D”. In questo studio è stata condotta una indagine virologica, nei confronti di virus “influenza D”, su campioni diagnostici (n.530) prelevati in suini di allevamenti (n.273) dell’area padana, in corso di forme morbose febbrili-respiratorie, ma anche nell’ambito di piani aziendali di monitoraggio sanitario. Tramite metodiche di tipo biomolecolare è stato possibile accertare la presenza di virus “influenza D” nel 3,2% dei campioni provenienti da 4 allevamenti (1,4%). E’ stato ottenuto isolamento virale da tre tamponi nasali tramite inoculazione di substrati cellulari (HRT-18 e ST). L’analisi genetica condotta su una selezione dei genomi ottenuti ha permesso di rilevare che i virus suini influenzali D italiani sono correlati fra loro e appartengono al cluster riferibile a D/swine/Oklahoma/1334/2011. Indagini epidemiologiche, virologiche e filogenetiche più accurate ed estese si rendono necessarie per delineare meglio il ruolo patogenetico di questo agente nel suino. Un approfondimento delle conoscenze è imperativo per ottenere elementi di valutazione sull’eventuale ruolo di serbatoio di questa specie nella epidemiologia dell’infezione e soprattutto per capire meglio la genesi e la storia evolutiva del virus “influenza D”.

### Abstract

Among the viruses belonging to the family Orthomyxoviridae a new type of influenza virus was recently identified. It has been proposed to be named “influenza D”. To evaluate circulation of “influenza D virus” in Italian pig farms a virological was conducted on diagnostic samples (n.530) collected from pig farms (n.273) in the Po Valley, during febrile-respiratory symptoms, but also on samples collected for health monitoring. By biomolecular tests (RT-PCR) it was possible to ascertain the presence of “influenza D” virus in 3.2% of samples from four monitored farms (1.4%). Virus isolation was obtained from three nasal swabs on cell lines (HRT-18 and ST). Genetic analysis conducted on a selection of available genomes revealed that the Italian swine influenza D viruses are closely related and cluster with D/swine/Oklahoma/1334/2011. Epidemiological investigations, virological and phylogenetic studies are required to better outline the pathogenic role of this virus in swine and to obtain elements of assessment on the possible role of swine as a reservoir of this virus and above all to better understand the genesis and the evolutionary history of this novel virus.

### INTRODUZIONE:

I virus influenza A, B and C (IAV, IBV, ICV) appartengono alla famiglia Orthomyxoviridae. IAV infetta uomo e varie specie di mammiferi e specie aviarie. Le specie aviarie selvatiche

rappresentano il serbatoio di persistenza del virus in natura. IBV è considerato agente di forme respiratorie stagionali nell'uomo con andamento simile alla infezione da IAV anche se con incidenza inferiore, mentre ICV viene riportato come agente di forme respiratorie lievi delle prime vie respiratorie nell'uomo (3, 10). Recentemente IBV è stato dimostrato essere in grado di infettare sia i suini (14) che i mammiferi acquatici (13). ICV è stato isolato solo una volta da suini in Cina nel 1981 e in quel caso era stata dimostrata una vicinanza genetica con ICV umano (4). Inoltre indagini sierologiche nei confronti di ICV umano condotte in Giappone e in U.K. hanno dimostrato una positività del 9,9% e 19% rispettivamente in suini di allevamento (1, 16). Nel 2011 in Oklahoma è stato isolato in suini affetti da sindrome simil-influenzale, un Orthomyxovirus, (C/swine/Oklahoma/1334/2011) (C/OK), le cui caratteristiche antigeniche e genetiche risultavano sovrapponibili a quelle di ICV (6). Indagini condotte successivamente hanno permesso di rilevare la circolazione di virus riferibili a C-OK in bovini in Francia, Cina e USA (2, 5, 7). Analisi genetiche approfondite hanno dimostrato che questi isolati non potevano essere considerati sovrapponibili a ICV umano. Di conseguenza si è valutata l'opportunità di inquadrare i virus "C-OK like" in un nuovo tipo di virus influenzale il cui prototipo D/swine/Oklahoma/1334/2011 è stato denominato in via provvisoria "virus influenza tipo D" (IDV) (6). In questo studio è stato inoltre riportata la realizzazione di una infezione sperimentale nel furetto, con dimostrazione di trasmissibilità da un soggetto all'altro. Il furetto è specie considerata assimilabile all'uomo per quanto riguarda la sensibilità alla infezione influenzale e per questo utilizzata come modello surrogato negli studi di patogenicità dei virus influenzale nell'uomo. In Canada, inoltre, una modesta indagine sierologica nell'uomo (316 sieri) ha dimostrato la presenza di anticorpi specifici per IDV con una incidenza dell'1,3% (6). Al fine di raccogliere elementi di valutazione sulla presenza e sulla eventuale circolazione di questo nuovo virus fra i suini dei nostri allevamenti, sono state avviate ricerche sia di tipo diretto su campioni diagnostici conferiti presso il laboratorio diagnostico che indagini indirette su campioni sierologici prelevati negli allevamenti interessati dalla infezione.

#### **MATERIALI E METODI:**

Nel periodo Giugno-Dicembre 2015 sono stati raccolti complessivamente 530 campioni diagnostici da 273 allevamenti suini dell'area Padana che venivano conferiti ai Laboratori delle Sezioni IZSLER di Mantova e Parma per accertamenti diagnostici nei confronti di affezioni respiratorie. I campioni erano rappresentati da tamponi nasali (n. 219), polmoni (n. 211) e fluidi orali (n.100).

In 4 aziende con riscontro di positività tramite test biomolecolari sono stati eseguiti prelievi di sieri in soggetti (n.90) appartenenti allo stesso gruppo nel quale si era riscontrata positività virologica.

Le caratteristiche e le attività di prelievo espletate in questi allevamenti si possono così riassumere:

A: Allevamento da ingrasso situato in provincia di Mantova, nessun sintomo clinico. E' stato eseguito, in soggetti di 30kg di peso, prelievo fluidi orali per il monitoraggio della circolazione del virus PRRS.

B: Allevamento ciclo chiuso situato nella provincia di Cremona, in concomitanza con episodi di febbre e aborto in scrofette, è stato eseguito prelievo tamponi nasali.

C: Allevamento ciclo chiuso in provincia di Treviso. E' stato eseguito prelievo di tamponi nasali in soggetti in svezzamento affetti da sintomatologia respiratoria.

D: Allevamento da ingrasso situato in provincia di Reggio Emilia, mortalità in magroni con manifestazioni respiratorie acute. E' stato eseguito prelievo di polmoni e tamponi nasali.

I campioni clinici sono stati sottoposti a screening tramite RT-PCR per la ricerca del gene

PB1 di IDV, con Real-Time PCR, secondo il metodo descritto da Hause (6). I campioni positivi sono stati testati per isolamento virale su colture cellulari, HRT18 (human rectal tumor) e ST (swine testicular cell line). Dopo l'infezione del monostrato l'incubazione è stata prolungata, in assenza di sofferenza cellulare, fino a 5 giorni. Per ciascun campione sono stati eseguiti due passaggi seriali.

La conferma della replicazione virale è stata eseguita tramite test biomolecolare RT-PCR (6). Reazioni di amplificazione e sequenziamento genomico con sequenziatore Miseq (Illumina) sono state approntate sia su campioni clinici risultati positivi al test biomolecolare (n.2), che su una sospensione ottenuta nelle prove di isolamento virale su monostrati cellulari (5).

Le sequenze genetiche ottenute sono state allineate mediante il software ClustalW (9) con le sequenze di virus influenzali D presenti in GenBank. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il metodo Maximum likelihood con il software IQTREE (11) e sono stati graficamente condensati mediante MEGA5 (15).

Tutti i campioni clinici testati per IDV e i campioni di sangue che corredavano i conferimenti sono stati sottoposti anche ad analisi batteriologiche e/o virologiche nei confronti dei più comuni patogeni del suino (virus influenza A, virus PRRS, PCV2, virus Malattia di Aujeszky) secondo i metodi di prova interni e/o normati in uso nella routine diagnostica dei laboratori IZSLER. I sieri sono stati trattati per l'eliminazione di fattori aspecifici inibenti l'emoagglutinazione secondo quanto previsto in (8) successivamente sono stati diluiti in base 2 da 1/20 a 1/160 ed esaminati tramite inibizione dell'emoagglutinazione (12) per l'evidenziazione di anticorpi nei confronti di IDV. I campioni con valore anticorpale  $\geq 1/20$  venivano considerati positivi.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

L'analisi eseguita tramite RT-PCR ha messo in evidenza la presenza del virus IDV in 17 campioni diagnostici (3.2%) provenienti da 4 (1,4%) diversi allevamenti delle province di Mantova, Treviso, Reggio Emilia e Cremona. Dei 17 campioni positivi, 14 erano rappresentati da tamponi nasali (6,3%), due erano fluidi orali mentre solo un campione di tessuto polmonare è stato riscontrato positivo (0,4%).

L'isolamento virale è stato ottenuto sulle linee cellulari HRT18 e ST da tre tamponi nasali provenienti da due allevamenti, uno in provincia di Mantova ed uno in provincia di Reggio Emilia. Gli isolati sono stati identificati come: D/swine/Italy/199724-3/2015, D/swine/Italy/354017-7/2015 e D/swine/Italy/354017-11/2015. L'analisi genetica condotta su virus isolato D/swine/Italy/199724-3/2015 e su due campioni di tampone nasale D/swine/Italy/254578/2015 e D/swine/Italy/268344/2015 ha evidenziato che i virus influenza D italiani sono strettamente correlati tra loro e raggruppano, insieme con gli isolati IDV finora ottenuti in bovini italiani, in un cluster riferibile a D/swine/Oklahoma/1334/2011 (Figura1). Per quanto riguarda esiti analitici riguardo ad altri agenti eziologici il quadro diagnostico completo si può così riassumere:

A: fluidi orali positivi per virus PRRS e negativi per influenza A e PCV2.

B: tamponi nasali negativi per virus PRRS e Influenza A ma accertamenti su altri campioni prelevati in breve successione hanno dimostrato circolazione di virus PRRS.

C: tamponi nasali positivi per virus PRRS, virus influenza A e PCV2d.

D: polmoni positivi per *Actinobacillus pleuropneumoniae*, negativi virus PRRS e virus influenza A.

Tamponi nasali negativi per PRRS e influenza A ma positivi per PVC2. Dei 90 sieri prelevati nei gruppi cui appartenevano i soggetti risultati positivi a PCR dal campione clinico, 26 (28%) sono risultati positivi per anticorpi inibenti emoagglutinazione nei confronti di IDV, di questi 15 (57%) con titolo 1/20, 6 (23%) con titolo 1/40 e 5 (19%) con titolo 1/80. Questo

studio preliminare ha permesso di verificare che attualmente negli allevamenti suini dell'area padana è rilevabile la circolazione di IDV sia tramite indagine virologica che sierologica. Questo agente virale ha mostrato un certo grado di difficoltà a replicare su substrati cellulari, infatti si sono ottenuti solo 4 stipiti isolati dai 17 campioni positivi alla prova biomolecolare. Probabilmente questa difficoltà è legata, più che a scarsa affinità ai substrati utilizzati, ad una vera e propria esiguità di particelle virali presenti nel campione, infatti, nei 4 casi di successo, l'isolamento è stato ottenuto in tutti i substrati utilizzati. Per quanto riguarda la matrice d'elezione per il rilevamento di IDV, visto le percentuali di positività riscontrate sia nelle prove biomolecolari che nelle prove di isolamento sembra che il tampone nasale sia materiale diagnostico più indicato per la rilevazione del virus. Questa osservazione ci permette anche di azzardare l'ipotesi che le prime vie respiratorie siano il sito di elezione per la replicazione virale.

Non è stato possibile, nei casi osservati, mettere in correlazione il rilevamento dell'agente IDV con problematiche cliniche di gruppo rilevate, infatti i campioni clinici sono risultati positivi contemporaneamente a più di uno degli agenti eziologici ricercati oltre IDV. Inoltre la positività biomolecolare è stata riscontrata, come nel caso dell'allevamento A, in suinetti in assenza di sintomatologia clinica.

La risposta sierologica degli animali appartenenti ai gruppi nei quali si è osservata positività virologica per IDV, se pur presente, va considerata di modesta entità; infatti solo il 28% dei campioni è risultato positivo e la maggior parte di questi (57%) a titolo 1/20. Ad oggi il numero di virus sequenziati e presenti in Genbank è ancora esiguo tuttavia l'analisi di tutti i segmenti genomici mostra che i virus finora isolati in Italia appartengono ad uno stesso cluster genetico e non sono stati evidenziati fenomeni di riassortimento.

Questi dati epidemiologici, se pur con la limitazione dei brevi tempi di raccolta dei campioni, forniscono comunque già indicazioni specifiche sulla presenza e incidenza della infezione da IDV nei nostri allevamenti. Si rendono comunque necessarie ulteriori indagini sia virologiche che sierologiche per delineare meglio l'eventuale ruolo patogenetico dell'agente virale nella specie suina e/o l'eventuale ruolo di serbatoio rappresentato da questa specie, ma anche per arricchire il "data base" delle sequenze genetiche di questi virus e poter quindi meglio capire la storia evolutiva di questo virus. Lo studio filogenetico approfondito e comparato con IDV isolato da altre specie, per il momento il bovino, tra le specie animali, sembra essere sensibile a questa infezione, permetterebbe anche di acquisire elementi di valutazione su eventuali risvolti zoonosici che, non si può escludere, possano palesarsi anche con i virus influenzali tipo D alla stregua di quanto ben noto, in merito, nell'ambito dei virus influenzali tipo A.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Brown IH, Harris PA, Alexander DJ. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2. *Epidemiol Infect.* 1995 Jun;114(3):511-20.
2. Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):368-71.
3. Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, Cu villon-Nimal D, et al. Study of influenza C virus infection in France. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1441-6.
4. Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol.* 1983 Jan;64 (Pt 1)(Pt 1):177-82.
5. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio.* 2014 Mar 4;5(2):e00031-14.

6. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003176.
7. Jiang WM, Wang SC, Peng C, Yu JM, Zhuang QY, Hou GY, et al. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China. *Virus Genes.* 2014 Dec;49(3):493-6.
8. Kendall AP, Pereira MS, Skehel JJ. Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention: Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, editors.; 1982.
9. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.
10. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, et al. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis.* 2006 May 1;193(9):1229-35.
11. Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol.* 2013 May;30(5):1188-95.
12. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8. 2015th ed. ; 2015.
13. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science.* 2000 May 12;288(5468):1051-3.
14. Ran Z, Shen H, Lang Y, Kolb EA, Turan N, Zhu L, et al. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses. *J Virol.* 2015 May;89(9):4818-26.
15. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
16. Yuanji G, Desselberger U. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol.* 1984 Nov;65(Pt 11):1857-72.