

# I VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN NORD ITALIA: CO-CIRCOLAZIONE DI DIVERSI GENOTIPI ED EVENTI DI RIASSORTIMENTO

## *SWINE INFLUENZA IN NORTHERN ITALY: CO-CIRCULATION OF DIFFERENT GENOTYPES AND REASSORTMENT EVENTS*

CAVICCHIO, L.<sup>1</sup>, FUSARO, A.<sup>1</sup>, ZAMPERIN, G.<sup>1</sup>, MILANI, A.<sup>1</sup>, SCHIVO, A.<sup>1</sup>,  
MANTOVANI, C.<sup>1</sup>, MONNE, I.<sup>1</sup>, VIO, D.<sup>1</sup>, SCHIAVON, E.<sup>1</sup>, MION, M.<sup>1</sup>, BEATO, M.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*IZSVe, Viale dell'Università 10, Legnaro 35020, Padova, Italia;*

**Parole chiave:** influenza suina, genotipi, novel

**Key words:** swine influenza, genotypes, novel

**Riassunto:** Il consorzio Europeo per la sorveglianza dei virus influenzali suini (European Surveillance Network for influenza in pigs – ESNIP) tra il 2009 e il 2013 ha caratterizzato geneticamente i virus circolanti nei Paesi aderenti creando un nuovo modello di classificazione (Watson et al. 2015). In totale sono stati caratterizzati 290 virus e definiti 25 diversi genotipi nominati da A a W. Il presente lavoro è il frutto della sorveglianza passiva condotta in Veneto e Friuli Venezia Giulia tra il 2013 e il 2017. In totale sono stati rilevati 15 allevamenti positivi al virus, localizzati in 15 differenti comuni di 4 diverse provincie. Con il fine di definire i genotipi circolanti nel territorio, il genoma completo dei 33 virus è stato caratterizzato mediante Illumina MiSeq. L'analisi filogenetica condotta per i virus classificati come H1 ha mostrato come questi appartenessero a 4 differenti genotipi: 1B.1.2.2 (human-like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1) pdm09), 1C.2 e 1C.2.1 (avian like H1N1 and H1N2). Le analisi filogenetiche condotte sull'intero genoma hanno identificato 8 differenti genotipi, di cui 6 precedentemente descritti in Europa (A, B, D, F, P e T) e 2 (X e Y), descritti nel presente lavoro per la prima volta. Considerando il potenziale zoonotico dell'influenza suina, la sorveglianza e la caratterizzazione molecolare dei virus circolanti si dimostra necessaria per monitorare l'emergenza di virus con potenziale pandemico.

**Abstract:** Passive surveillance of Swine Influenza virus (SIV) in north-eastern Italy (Veneto and Friuli Venezia Giulia regions), carried out between November 2013 and June 2017, identified fifteen infected farms in fifteen different municipalities covering four neighbouring provinces. Watson et al. (2015) had previously described 25 different SIV genotypes in Europe (A-W). To explore the genetic diversity of the circulating SIVs in north-eastern Italy, we genetically characterized the complete genome of 33 viruses (8 H1N1, 23 H1N2 and 2 H3N2) collected from all the affected farms using the Illumina MiSeq. Topology of the maximum likelihood phylogenetic tree obtained for the H1 gene showed that the viruses belonged to four distinct lineages, namely 1B.1.2.2 (human-like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1)pdm09), 1C.2 and 1C.2.1 (avian like H1N1 and H1N2), according to the classification by Anderson et al. (2016). Phylogenetic analyses of the eight gene segments identified 8 different genotypes - 6 (A, B, D, F, P and T) previously described by Watson et al. (2015) and 2 (X and Y) here described for the first time. The many reassortment events identified in this small geographic area, as well as the high number of co-circulating genotypes (F, P, T, X and Y) containing the matrix gene of the (A(H1N1) pdm09) lineage, may pose a potential public health risk and therefore their persistence in pigs should be carefully monitored.

## INTRODUZIONE

L'influenza di tipo A causa infezioni in diverse specie di aviari e mammiferi, incluso l'uomo. Il virus dell'influenza A è composto da 8 segmenti genici di RNA a singolo filamento negativo. A causa della natura segmentata del genoma i fenomeni di riassortimento genico sono molto frequenti e questo tipo di fenomeno porta ad un incremento significativo della variabilità genotipica e fenotipica del virus. Le proprietà antigeniche del virus sono determinate da due glicoproteine di membrana, l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), e in base a queste vengono classificati i diversi ceppi del virus. Gli eventi di riassortimento genico possono cambiare la combinazione degli HA ed NA esistenti portando alla generazione di nuovi genotipi, con caratteristiche fenotipiche nuove e sconosciuti da un punto di vista immunologico all'uomo. Tutto ciò è alla base delle ondate pandemiche che ciclicamente si sono verificate a livello globale. I virus appartenenti ai sierotipi H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1 pandemico sono quelli che abitualmente si riscontrano nella popolazione suina. Tali sierotipi sono meglio classificati in base al lineaggio genetico del gene dell'HA. Si identificano in tal modo virus Euroasian avian-like H1N1, human-like H1N2 e H1N1 pandemico. Un importante studio condotto dal consorzio Europeo "European Surveillance Network on Influenza in pigs" (ESNIP) ha caratterizzato geneticamente l'intero genoma di 290 virus identificati tramite sorveglianza passiva e attiva in 14 Paesi Europei tra il 2009 e il 2013. La caratterizzazione genetica di questi virus ha consentito di stabilire una classificazione univoca per i virus influenzali suini circolanti in Europa. Tale classificazione, indipendentemente dal sierotipo ha evidenziato l'esistenza di 25 genotipi (A-W) (Watson et al., 2015). Alcuni genotipi sono principalmente circolanti in alcuni Paesi come ad esempio il genotipo F (human-like H1N2) è predominante in Italia, o il genotipo D (human-like H1N2) principalmente circolante in Danimarca. Nel presente lavoro sono stati isolati e caratterizzati geneticamente 33 virus influenzali suini identificati attraverso sorveglianza passiva tra il 2013 e il 2017 nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia Giulia.

## MATERIALI E METODI

Nell'ambito della sorveglianza sindromica respiratoria sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, tamponi nasali e in un singolo caso, a seguito di necropsopia, è stato inviato un polmone. I tamponi nasali sono stati stemperati in 2 ml di MEM (Sigma Aldrich), 0,5% di Albumina e HEPES buffer addizionato con 1% di antibiotici. La stessa soluzione (500 $\mu$ l) è stata utilizzata per l'omogeneizzazione di 20-40 mg di tessuto. Da tutti i campioni è stato estratto l'RNA mediante kit commerciale: High Pure RNA Isolation Kit (Roche) per i tamponi, High Pure RNA Tissue Kit (Roche), per i tessuti. Questi sono quindi stati testati mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo A, avente come target il gene della proteina di matrice (M) (Hoffmann et al., 2010). I campioni positivi sono stati tipizzati mediante Real Time multiplex RT-PCR (Henritzi et al., 2016) in grado di differenziare i diverse genotipi del gene HA e NA. Una aliquota dello stemperato dei campioni positivi, a seguito di un incubazione a 37°C per 2 ore, è stata utilizzata per l'isolamento virale ottenuto mediante infezione di un monostrato confluyente di cellule MDCK-SIAT trattate con l'1% di tripsina TPCK (WHO Manual on animal influenza, 2002). I virus isolati sono stati nuovamente caratterizzati mediante RT-PCR come sopra illustrato e il loro genoma è stato sequenziato mediante Illumina MiSeq come precedentemente descritto (Monne et al., 2014). L'analisi filogenetica è stata condotta, per ognuno degli otto geni di ciascun virus, generando degli alberi basati sul metodo della massima verosimiglianza (ML), utilizzando il modello di sostituzione nucleotidica general time reversible (GTR) con una distribuzione gamma (con 4 gradi di variazione  $\Gamma_4$ ), in PhyML (Guindon e Gascuel, 2003). La robustezza di ogni nodo dell'albero filogenetico è stata stabilita con il calcolo dei valori bootstrap (100 repliche).

## RISULTATI

Nel presente studio sono stati individuati 33 virus, 24 in Veneto e 12 in Friuli Venezia Giulia, in un periodo compreso tra il 2013 e il 2017, in particolare nelle provincie di Padova, Treviso, Pordenone e Udine. Sono stati coinvolti 8 comuni nella provincia di Padova, 3 nella provincia di Treviso, 4 nella provincia di Pordenone, 1 nella provincia di Udine. In totale sono stati identificati i seguenti sottotipi: 8 H1N1, 23 H1N2, 2 H3N2. I virus H1 qui identificati appartengono a 4 differenti lineaggi: 1B.1.2.2 (human like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1) pdm09), 1C.2 e 1C.2.1 (avian like H1N1 e avian like H1N2) in base ad una recente classificazione (Anderson et al., 2016). L'analisi filogenetica dell'intero genoma (8 segmenti genici) ha evidenziato la presenza di 8 differenti genotipi, di cui 6 - A, B, D, F, P e T - precedentemente descritti in Europa (Watson et al., 2015) e 2 - X e Y - descritti per la prima volta in Italia. I due nuovi genotipi identificati sono stati generati dal riassortimento del genotipo F e T coinvolgendo rispettivamente i geni M e NS. In dettaglio il genotipo X, rispetto al genotipo F presenta il gene M del lineaggio pandemico. Il genotipo Y rispetto al genotipo T presenta il gene NS di origine Eurasian avian like (Tabella 1). La circolazione del genotipo X è stata riscontrata per la prima volta in Italia e quindi Europa, già a fine del 2013, contrariamente il genotipo Y è stato identificato nel 2017 e non in eventi precedenti. I due nuovi genotipi sono stati riscontrati solo nella provincia di Treviso. I genotipi A, D, F e P hanno circolato in maniera estesa nell'area considerata negli ultimi 3 anni, contrariamente i rimanenti genotipi sono stati rilevati solo in alcune aziende e solo per un breve periodo di tempo. Il genotipo T, la cui circolazione in Italia non era stata segnalata fino ad oggi, è stato identificato in due aziende del Friuli Venezia Giulia nel 2017. I virus appartenenti a questo genotipo (Tabella 1) clusterizzano separatamente rispetto agli altri virus Europei appartenenti al sottotipo avian like H1 (1C.2.), ciò potrebbe suggerire che siano stati generati a seguito di fenomeni di riassortimento indipendenti tra virus del lineaggio pandemico e virus appartenenti a lineaggio 1C.2.

**Tabella 1.** Genotipi identificati nelle regioni del Veneto e Friuli Venezia Giulia tra il 2013 e il 2017.  
**Table 1.** Identified genotypes in Veneto and Friuli Venezia Giulia regions between 2013 and 2017.

Sottotipo Subtype	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	NS	M	Genotipo Genotype
H1N2	1B.1.2.2	N2							X
H1N2	1B.1.2.2	N2							F
H1N2	1C.2	N2							D
H1N1	1C.2.1	N1							A
H3N2	H3	N2							B
H1N1	1A.3.3.2	N1							P
H1N2	1C.2	N2							D
H1N2	1C.2.	N2							Y
H1N2	1C.2.	N2							T
H3N2	H3	N2							B

Classificazione di Watson dei genotipi di influenza suina circolanti in Europa:

Watson classification of different swine influenza strains circulating in Europe:

	A(H1N1)pdm09
	A/swine/Scotland/410440/1994-like H1huN2
	Eurasian avian-like H1avN1
	A/swine/Italy/4675/2003-like N2
	A/swine/Gent/1/1984-like H3N2

## DISCUSSIONI

La presenza del genotipo F in Italia è stata descritta sin dal 2003 (Moreno et al., 2013; Watson et al., 2015), e il presente studio conferma la presenza di tale genotipo nel territorio. In una area geografica non particolarmente vasta, come quella oggetto del presente studio, sono stati identificati molteplici genotipi circolanti (8) e due eventi di riassortimento responsabili della genesi di due nuovi genotipi (X e Y). La circolazione di genotipi (X, Y, P e T) contenenti il gene M appartenente al lineage A(H1N1)pdm09, il quale è stato precedentemente associato ad una aumentata trasmissibilità virale in modelli animali quali il furetto e il criceto (Kitikoon et al., 2012; Lakdawala et al., 2011), potrebbe rappresentare un potenziale rischio per la sanità pubblica, pertanto la loro circolazione dovrebbe essere monitorata attentamente.

## CONCLUSIONI

Lo studio del genoma completo dei virus influenzali suini identificati tramite sorveglianza passiva nel Nord-Est Italia tra il 2013 e il 2017, ha permesso di caratterizzare la costellazione genetica dei virus circolanti nel territorio. L'identificazione di una molteplicità di varianti genetiche sottolinea l'importanza di applicare adeguati piani di monitoraggio per l'influenza suina nell'area coinvolta nell'indagine. Ulteriori indagini volte a caratterizzare le proprietà antigeniche, la cross-reattività con i vaccini disponibili, la virulenza e l'efficacia di replicazione/trasmissione in modelli animali distinti dei ceppi virali qui descritti sono necessarie al fine di monitorare l'adeguatezza dei sistemi di controllo implementati attualmente e di poter prontamente identificare l'emergenza di virus con potenziale zoonosico.

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson T.K., Macken C.A., Lewis N.S., Scheuermann R.H., Van Reeth K., Brown I.H., Swenson S.L., Simon G., Saito T., Berhane Y., Ciacci-Zanella J., Pereda A., Davis C.T., Donis R.O., Webby R.J., Vincent A.L. (2016) "A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses." *mSphere*. 1(6), e00275-16.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol*. 52(5), 696-704.
- Henritzi, D., Zhao, N., Starick, E., Simon, G., Krog, J.S., Larsen, L.E., Reid, S.M., Brown, I.H., Chiappon, C., Foni, E., Wacheck, S., Schmid, P., Beer, M., Hoffmann, B., Harder, T.C. (2016) "Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs." *Influenza Other Respir Viruses*. 10(6), 504-517.
- Hoffmann, B., Harder, T., Lange, E., Kalthoff, D., Reimann, I., Grund, C., Oehme, R., Vahlenkamp, T.W., Beer, M. (2010) "New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples." *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 123, 286-292.
- Kitikoon, P., Vincent, A.L., Gauger, P.C., Schlink, S.N., Bayles, D.O., Gramer, M.R., Darnell, D., Webby, R.J., Lager, K.M., Swenson, S.L., Klimov, A. (2012) "Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011." *J. Virol*. 86, 6804-6814.
- Lakdawala, S.S., Lamirande, E.W., Suguitan, A.L., Jr., Wang, W., Santos, C.P., Vogel, L., Matsuoka, Y., Lindsley, W.G., Jin, H., Subbarao, K. (2011) "Eurasian-origin gene segments contribute to the transmissibility, aerosol release, and morphology of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus." *PLoS Pathog*. 7, e1002443.

- Monne, I., Fusaro, A., Nelson, M.I., Bonfanti, L., Mulatti, P., Hughes, J., Murcia, P.R., Schivo, A., Valastro, V., Moreno, A., Holmes, E.C., Cattoli, G. (2014) "Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor." *J. Virol.* 88, 4375-4388.
- Moreno, A., Gabanelli, E., Sozzi, E., Lelli, D., Chiapponi, C., Ciccozzi, M., Zehender, G., Cordioli, P. (2013) "Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses." *Vet. Res.* 44, 112-9716-44-112.
- Nelson, M.I., Vincent, A.L., Kitikoon, P., Holmes, E.C., Gramer, M.R. (2012) "Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans 2009-2011." *J. Virol.* 86, 8872-8878.
- Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsgager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Durrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dan, A., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., ESNIP3 Consortium, Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P. (2015), Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J. Virol.* 89, 9920-9931.
- WHO, (2002). Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1.