

CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS INFLUENZALI DI TIPO A ISOLATI DA EPISODI DI INFLUENZA IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD - ITALIA NEGLI ANNI 2017-2020

CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A VIRUSES ISOLATED DURING SWINE INFLUENZA'S OUTBREAKS IN ITALY, 2017-2020

CHIAPPONI C., PROSPERI A., MORENO A., FACCINI S., ALBORALI G.L., BAIONI L., GABBI V., MANFREDI R., TORREGGIANI C., LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-OIE
Reference Laboratory for swine influenza*

Parole chiave: Virus influenza tipo A, suino

Key words: Influenza A, swine

ABSTRACT

Swine IAVs of H1N1, H3N2 and H1N2 subtypes are enzootic in pigs globally, with regionally genetic and antigenic differences. During 2017-2020, 6355 swine IAV outbreaks involving 1448 farms in Northern Italy have been confirmed by RT-PCR for M gene. 666 IAV positive samples were further subtyped by multiplex RT-PCR. 409 positive samples were genetically characterized by full genome sequencing, assigning each virus to its lineage and genotype. The farm prevalence of the different subtypes was: H1N1 40.6% (36.1% H1avN1 and 4.5% H1N1pdm09), 45.7% H1N2 and 12.6% H3N2. In 6 farms (0.9%), two strains co-circulating in the same outbreak were detected. The genetic characterization of the sequenced strains showed that the H1N1 subtypes were of avian-like origin (83,5%) and H1N1pdm09 (13,3%), with a little percentage of reassortant strains (internal genes of pdm09 origin). The H1N2 subtype was the most variable with the circulation of 13 genotypes. The Italian H1N2 (hu-like) was detected in 42,3% of the samples, but in the 57,7% of the detected cases viruses were reassortant H1N2 (pdm09 and av-like internal genes). The H3N2 was confirmed as a stable subtype.

In the last three years high genetic variability was observed in the swine IAVs circulating in Italy. The importance of IAV monitoring is enhanced by the economic impact of swine Influenza in the Porcine Respiratory Disease Complex, but also considering the pig's role as a mixing vessel, generating potentially zoonotic viruses.

RIASSUNTO

I virus influenzali endemici nei suini (swIAV) appartengono ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2, e presentano differenze genetiche ed antigeniche in base all'origine geografica degli isolati. Nel periodo 2017-2020 sono stati confermati, con RT-PCR per il gene M, 6355 focolai di swIAV, in 1448 allevamenti suini del Nord Italia. Fra questi, 617 campioni positivi sono stati tipizzati mediante multiplex RT-PCR. Inoltre 409 campioni positivi sono stati sequenziati. A livello di azienda, la prevalenza dei sottotipi è stata: 40,6% H1N1 (36,1% H1avN1 e 4,5% H1N1pdm09), 45,3% H1N2 e 12,2% H3N2. In 6 aziende (0,9%) sono stati rilevati due ceppi co-circolanti nello stesso focolaio. Il sottotipo H1N1 maggiormente rappresentato è risultato essere quello di origine av-like (83,5%), seguito da H1N1pdm09 (13,3%), con una piccola percentuale di ceppi riassortanti (geni interni di origine pdm09). Il sottotipo H1N2 è risultato il più variabile, con la circolazione di 13 diversi genotipi. H1N2 (hu-like) è stato rilevato nel 42,3% dei campioni, ma nel 57,7% dei casi i virus erano riassortanti (geni interni

pdm09 e av-like). H3N2 si è confermato il sottotipo più stabile. Negli ultimi tre anni è stata osservata un'elevata variabilità genetica negli swIAV in Italia. L'importanza del monitoraggio di questi virus è legata all'importanza economica dell'influenza come patogeno nell'ambito del Complesso Respiratorio del suino, ma anche al ruolo del suino come serbatoio per virus potenzialmente zoonotici.

INTRODUZIONE

L'influenza suina è un'importante patologia fra quelle che compongono il complesso PRDC, e può causare significative perdite economiche. L'influenza suina acuta è causata da virus influenzale di tipo A (swIAV), è caratterizzata da un breve periodo di incubazione (1-3 giorni) e si manifesta con febbre, inappetenza, inattività e difficoltà respiratorie. Possono essere osservate congiuntivite, secrezione nasale e starnuti e la morbilità raggiunge rapidamente quasi il 100% del gruppo. La mortalità è bassa e di solito non supera l'1%. Generalmente gli animali guariscono da 5 a 7 giorni dopo l'insorgenza della sintomatologia.

L'infezione da swIAV, oltre ad avere importanti ripercussioni sanitarie, gioca anche un ruolo importante nella ecologia dei virus influenzali, in quanto questa specie è suscettibile alla infezione da parte di virus influenzali aviari ed umani, ed è in grado di trasmetterli ad altre specie (Olsen et al., 2006; Kuntz-Simon and Madec, 2009; Zell et al., 2013).

Il genoma del virus influenzale A è costituito da 8 segmenti di RNA e viene convenzionalmente identificato a seconda delle caratteristiche delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) (Cheung and Poon, 2007). La peculiare costituzione del genoma di IAV è alla base della sua marcata variabilità antigenica. L'emergenza di un nuovo virus influenzale A può realizzarsi grazie a diversi meccanismi: la trasmissione inter-specie, le mutazioni antigeniche (*drift*) e il riassortimento genetico, dovuto allo scambio di geni tra due o più virus influenzali, anche originati da specie diverse. Nel corso del tempo tutti e tre questi meccanismi hanno condizionato l'evoluzione degli IAV in tutto il mondo, anche se in swIAV il *drift* antigenico, contrariamente a quanto avviene per i virus umani, è quello meno frequentemente osservato (Brown, 2013).

Dopo la pandemia influenzale del 2009, quattro lineaggi di virus swIAV sono diventati enzootici nella popolazione suina europea, vale a dire: H1N1 di origine aviaria o avian-like (H1avN1), H1N1 di origine pandemico 2009 (H1N1pdm09), H1N2 di origine umana o human-like (H1huN2) e H3N2 human-like (H3N2), con frequenze relative che variano da paese a paese (Watson et al., 2015). A partire dal 2009, anche in Italia si è osservata la circolazione del sottotipo A(H1N1)pdm09 (Moreno et al., 2010) e di numerose tipologie di riassortanti di questo stipite con i sottotipi endemici europei (Watson et al., 2015; Chiapponi et al., 2017).

Scopo di questo studio è di riportare informazioni aggiornate sugli swIAV isolati durante focolai di influenza suina in Italia nell'ultimo quadriennio (2017-2020).

MATERIALI E METODI

Nel periodo 2017-2020 tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare sono stati raccolti da suini affetti da forme cliniche respiratorie in 1448 allevamenti nel Nord Italia, per un totale di 6355 focolai, e testati per swIAV con metodica RT-PCR real-time così come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2017).

Da questi, 617 campioni, provenienti da altrettante aziende positive, sono stati ulteriormente caratterizzati per determinare il sottotipo virale presente tramite tecnica molecolare multiplex end point RT-PCR (LeBlanc et al., 2009; Chiapponi et al., 2010). Una selezione di 409 campioni è stata geneticamente caratterizzata tramite sequenziamento del genoma completo mediante NGS.

Per l'analisi genetica, il genoma è stato analizzato suddiviso nei singoli 8 segmenti genetici

per swIAV. Il lineaggio di ciascun segmento è stato determinato mediante analisi in Blast verso i virus influenzali swIAV presenti in GenBank. I vari genotipi di swIAV scaturiti dalla diversa combinazione di geni sono stati numerati progressivamente così come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2017). Le sequenze geniche sono state allineate con ClustalW usando MEGA10 (Kumar et al., 2018). Gli alberi filogenetici dei segmenti genici sono stati ottenuti con metodo maximum-likelihood (ML) nel software IQ-TREE 0.9.6 con analisi di bootstrap di 1000 campioni (Trifinopoulos et al., 2016).

RISULTATI

La tipizzazione di 617 campioni, da altrettante aziende positive per swIAV, in RT-PCR multiplex ha evidenziato che, nei quattro anni considerati, il sottotipo H1N2 è stato quello maggiormente rilevato, con una percentuale del 45,7%, seguito dal sottotipo H1N1 con 40,6% (diviso in 36,1% H1avN1 e 4,5% H1N1pdm09) e da H3N2 (12,6%). In 6 allevamenti (0,9%) sono stati rilevati due ceppi circolanti contemporaneamente nello stesso focolaio (Tabella 1). Nel 2020 è stato osservato un incremento di aziende positive per H1N1pdm09 (15%), mentre le rilevazioni di aziende positive per H3N2 si sono portate al 5%.

L'analisi approfondita, eseguita con i dati di sequenziamento, è riassunta in tabella 2. La combinazione dei segmenti genici di ciascun virus è stata identificata con numerazione progressiva e è stata calcolata la percentuale di ciascun genotipo per ogni sottotipo. E' stato così possibile osservare che fra i virus H1N1 circolano emoagglutinine di tre cluster genetici diversi e definiti, sulla base del progenitore genetico, come: HA av-like, HA hu-like e pdm09. Come neuraminidasi sono stati individuati due cluster descritti come av-like e pdm09. A questo si deve aggiungere che diverse combinazioni di geni interni di origine av-like e pdm09 hanno dato origine ai 7 genotipi diversi riscontrati per H1N1. Per quanto riguarda il sottotipo H1N2, si sono osservati due lineaggi di geni per emoagglutina (hu-like e av-like), tre per neuraminidasi, due di origine suina e una di origine umana (hu-like-SCOTL_94, sw-H3N2-GENT-84, hu-like -Hong-Kong-1997_H3N2) e due per geni interni (av-like e pdm09). E' interessante sottolineare come nel caso di focolai sostenuti da ceppi H1N2, si siano osservate 13 combinazioni genetiche diverse. Per il sottotipo H3N2 infine si è rilevata la circolazione di un solo tipo di emoagglutina di origine suina, di un solo tipo di neuraminidasi N2 (sw-H3N2-GENT-84) e di geni interni di origine aviare. Unica eccezione è stato l'isolamento di un virus H3N1 che rappresenta un episodio sporadico di riassortimento di geni codificanti per proteine di superficie per il sottotipo H3.

Tabella 1. Percentuali di identificazione dei diversi sottotipi mediante RT-PCR multiplex negli anni considerati

Table 1. Identification percentages of the different IAV subtypes by multiplex RT-PCR in the years 2017-2020

Ceppo Anno	H1N1	H1N2	H3N2	H3N1	H1N1 pdm09	Misti	Totale tipizzati
2017	41,9%	40,9%	15,1%	0,0%	0,5%	2,2%	186
2018	36,6%	47,9%	12,4%	0,7%	0,7%	0,0%	153
2019	32,6%	44,7%	17,4%	0,8%	4,5%	0,0%	132
2020	31,1%	48%	5,4%	0,0%	13,5%	2%	146
tot	36,1%	45,7%	12,6%	0,3%	4,5%	0,7%	617

Tabella 2. Identificazione progressiva e prevalenza dei vari genotipi all'interno di ciascun sottotipo sequenziato. Sono stati evidenziati i genotipi maggiormente circolanti per ciascun sottotipo. H1AV: H1 av-like; H1HU: H1 hu-like.

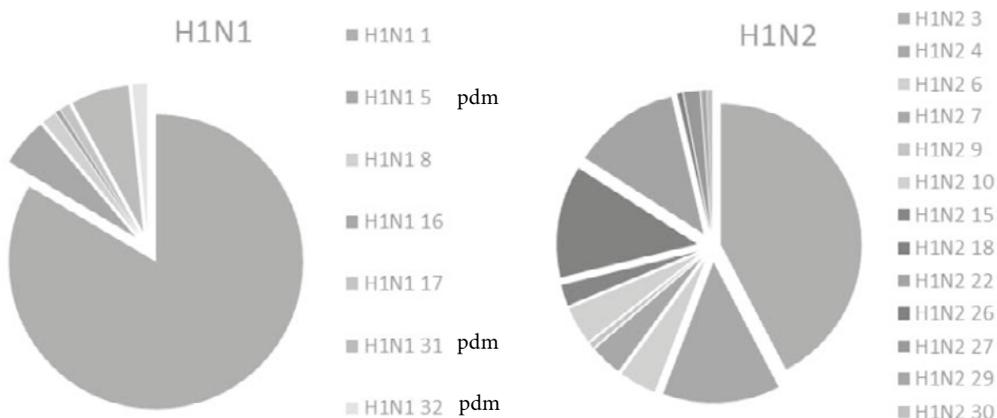
Table 2 Progressive identification and prevalence of genotypes belonging to each IAV subtype sequenced. The most frequently identified genotypes are evidenced in grey. H1AV: H1 av-like; H1HU: H1 hu-like.

SOTTOTIPO	genotipo	%	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
H1N1	1	83,5	H1AV	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	8	1.6	H1AV	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	PDM09	AV-LIKE
	16	0.5	H1HU	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	17	1.1	H1AV	AV-LIKE	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
	5 (H1N1 pdm 09)	5.3	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
	31 (H1N1 pdm 09)	6.4	PDM09	AV-LIKE	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	AV-LIKE
	32 (H1N1 pdm 09)	1.6	PDM09	AV-LIKE	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
H1N2	3	42,3	H1HU	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	4	13,5	H1AV	SW-H3N2-GENT-84	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	6	4,3	H1AV	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	7	3,7	H1HU	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
	9	0,6	PDM09	SW-H3N2-GENT-84	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
	10	4,3	H1HU	SW-H3N2-GENT-84	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	15	2,5	H1AV	SW-H1N2-SCOLTAND/1992	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	18	12,9	H1AV	SW-H3N2-GENT-84	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09
	22	12,3	H1AV	SW-H3N2-GENT-84	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	PDM09	AV-LIKE
	26	0,6	H1AV	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	PDM09	AV-LIKE
	27	1,8	H1HU	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	PDM09	AV-LIKE
	29	0,6	H1HU	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	PDM09	PDM09	AV-LIKE
	30	0,6	PDM09	HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
H3Nx	2	98,3	SW-H3	SW-H3N2-GENT-84	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE
	28	1,7	SW-H3	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE

Il sottotipo H1N1 per la maggior parte dei virus sequenziati risulta essere di tipo av-like (83,5%), seguito dal sottotipo H1N1pdm09 (13,3% in totale) identificato coi genotipi 5 (5,3%), e i riassortanti 31 (6,4%) e 32 (1,6%), questi ultimi di nuova introduzione. Seguono genotipi riassortanti (geni interni di origine pandemica) che circolano con percentuali tra 1 e 2%. Il sottotipo H1N2 risulta il più variabile, con la circolazione di 13 diversi genotipi. I virus H1N2 italiani hu-like sono rilevati nel 42,3% dei campioni, ma in un totale del 57,7% dei casi rilevati i virus H1N2 hanno origine riassortante (geni interni pandemici e aviari). Il sottotipo H3 si è confermato essere il più stabile, con la sola segnalazione di un virus riassortante H3N1 (genotipo 28).

Figura 1. Rappresentazione grafica delle prevalenze dei diversi genotipi per ciascun sottotipo H1N1 e H1N2 influenzale rilevato.

Figure 1. Graphic representation of the genotype prevalence for each H1N1, H1N2 IAV subtype detected.



DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Negli ultimi tre anni è stata osservata una crescente variabilità genetica negli swIAV circolanti in Italia. Il sottotipo H1huN2 è il più diffuso tra i sottotipi virali e quello geneticamente più variabile e soggetto a riassortimento. L'importanza del monitoraggio della variabilità genetica di swIAV è rafforzata dall'importanza economica dell'influenza nel suino, come agente eziologico di PRDC, ma anche dal ruolo svolto dal suino come *mixing vessel*, in grado di favorire il riassortimento e la genesi di nuovi virus potenzialmente zoonotici. Gli aspetti più interessanti dell'epidemiologia di swIAV nei nostri allevamenti scaturiscono però dall'analisi genetica eseguita su 409 stipti selezionati. Infatti gli stipti appartenenti ai tre sottotipi sono stati a loro volta ascritti a ben 22 genotipi diversi, in base all'attribuzione dei lineaggi per ciascun segmento genico considerato (figura 1). Per quanto riguarda gli H1avN1 (genotipo1) si è osservata una consistente circolazione di stipti di origine Centro-nord Europea (Danimarca, Olanda, Germania). E' rilevante inoltre l'aumentata circolazione di H1N1 con emoagglutinina di origine pandemica con la comparsa nel 2020 di genotipi riassortanti (genotipo31 6,4% e genotipo32 1,6%) La variabilità genetica più accentuata si osserva nell'ambito del sottotipo H1N2; si configura infatti la presenza di 13 genotipi diversi (Figura1). Si conferma presente sul territorio il genotipo3 H1huN2, con HA derivata dal

ceppo di riferimento A/swine/Italy/4675/2003 hu-like (Watson et al., 2015). A questo virus tuttavia si affiancano in numeri crescenti dei genotipi riassortanti, sia di origine italiana (3,7% con il genotipo7) sia di origine europea (12,9% con il genotipo18 e 12,3% con il genotipo22) con emoagglutinina di origine aviaria H1avN2 e geni interni di origine A(H1N1)pdm09. I geni di origine pandemica infatti circolano con maggiore frequenza come geni codificanti per proteine interne al virus, contribuendo a generare nuove combinazioni di riassortanti.

Come inizialmente osservato a partire dal 2015 (Chiapponi et al., 2017), possiamo documentare la consistente circolazione e incidenza nell'ambito degli isolati complessivi di virus nord europei. Tale osservazione trova ragione nella valutazione della entità delle introduzioni in Italia di suini vivi da paesi quali Olanda, Danimarca e Germania negli ultimi tre anni. Questa concomitante esposizione a diversi swIAV aumenta la probabilità di coinfezioni, favorendo il riassortimento dei genomi, portando alla nascita di nuovi virus. Alcuni stipiti riassortanti sono identificati sporadicamente, ma talvolta possono adattarsi nella popolazione suina, e negli ultimi anni sono stati evidenziati localmente esempi di nuovi swIAV circolanti. In conclusione, la diversità genetica e antigenica degli swIAV nella popolazione suina europea è notevolmente aumentata negli ultimi anni, sollevando dubbi sulle conseguenze future, e sulle potenziali ripercussioni sulla salute umana. I nuovi virus possono avere un impatto enorme sulla sanità animale, poiché possono potenzialmente avere una maggiore patogenicità, possono essere difficilmente identificabili mediante gli strumenti diagnostici classici e possono sfuggire alla protezione conferita dai vaccini attualmente presenti in commercio. Inoltre, anche le implicazioni per la salute pubblica devono essere attentamente considerate, poiché gli swIAV hanno un potenziale zoonotico, come verificatosi nel corso dell'ultima pandemia del 2009, dovuta a un virus multi-riassortante di origine suina. Pertanto, oggi, una delle principali sfide è comprendere meglio l'evoluzione dei virus influenzali all'interno delle popolazioni suine, attraverso il monitoraggio dei virus circolanti ed un costante aggiornamento delle metodiche diagnostiche e degli strumenti impiegati, anche nel rispetto del concetto di *One Medicine - One Health*.

Lo studio è stato eseguito in parte con finanziamento Ricerca Corrente Progetto PRC2018009

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, I.H., (2013). History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370: 133-146.
2. Cheung, T.K., Poon, L.L., (2007). Biology of influenza A virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102: 1-25.
3. Chiapponi, C., Ebranati, E., Pariani, E., Faccini, S., Luppi, A., Baioni, L., Manfredi, R., Carta, V., Merenda, M., Affanni, P., Colucci, M.E., Veronesi, L., Zehender, G., Foni, E., (2017). Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy during 2010-2015. *Zoonoses Public. Health.* .
4. Chiapponi, Chiara, Barbieri, Ilaria and Foni, Emanuela. (2010). MULTIPLEX RT-PCR FOR RAPID SUBTYPING OF HEMAGGLUTININ GENE OF ITALIAN SWINE INFLUENZA VIRUS. *Proceedings of the 1st Congress of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD), 2010.*
5. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
6. Kuntz-Simon, G., Madec, F., (2009). Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public. Health.* 56: 310-325.

7. LeBlanc, J.J., Li, Y., Bastien, N., Forward, K.R., Davidson, R.J., Hatchette, T.F., (2009). Switching gears for an influenza pandemic: validation of a duplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection and confirmatory identification of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 47:3805-3813.
8. Moreno, A., Di Trani, L., Alborali, L., Vaccari, G., Barbieri, I., Falcone, E., Sozzi, E., Puzelli, S., Ferri, G., Cordioli, P., (2010). First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol. J.* 4: 52-56.
9. Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., (2006). Swine influenza Straw BE .:
10. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44: W232-5.
11. 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., Hjulsager, 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.
12. Zell, R., Scholtissek, C., Ludwig, S., (2013). Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370: 29-55.