

**DESCRIZIONE DI UN EPISODIO DI INFLUENZA DA VIRUS
PANDEMICO (A/H1N1) IN UN ALLEVAMENTO
SUINO DEL NORD ITALIA**

***PANDEMIC INFLUENZA VIRUS (A/ H1N1) OUTBREAK IN PIG FARM
IN NORTH OF ITALY***

ZANONI MG, GRADASSI M., MORENO MARTIN A., CATELLI A. , SALOGNI C.,
SOZZI E., FONI E., CORDIOLI P., ALBORALI L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Suino, Influenza, H1N1, virus pandemico
Key words: Pigs, Influenza, H1N1, pandemic virus

RIASSUNTO

Il virus dell'influenza suina (SIV) è causa di patologia respiratoria acuta ed è un importante patogeno che concorre all'eziologia del complesso respiratorio del suino (PRDC). Questo lavoro descrive il primo episodio di infezione da virus influenzale tipo A H1N1 ceppo pandemico in un allevamento di riproduttori. Le manifestazioni cliniche erano grave prostrazione ed agalassia soprattutto in scrofe che avevano partorito da 3-7 giorni. Le nidiate si presentavano disomogenee e i suinetti apparivano dimagriti e disidratati. Il danno che ha coinvolto anche le intere nidiate delle scrofe colpite è stato quantificato in un aumento delle perdite in sala parto e un'a riduzione delle performance delle scrofe in termini di aumento di mortalità e riduzione della fertilità.

ABSTRACT

The swine influenza virus (SIV) frequently causes acute respiratory disease in pigs worldwide and is an important pathogen in the porcine respiratory disease complex (PRDC). The first H1N1 pandemic outbreak in sow farm in Italy is described in this paper. The main clinical signs were depression and agalactia in sows during the first week after farrowing. Different weights were observed in litters and piglets showed wasting and dehydration. The loss interested litters and were quantified in increased mortality in farrowing units, performance reduction in sows consisting in enhanced mortality and fertility rate reduction.

INTRODUZIONE

I virus influenzali di tipo A, membri della famiglia Orthomyxoviridae, sono pleomorfi a RNA a singola catena, dotati di envelope, distinti in sottotipi virali in base alle caratteristiche antigeniche delle glicoproteine esterne emoagglutinine (H1-H16) e neuroaminidasi (N1-N9). Attualmente sono endemici nella popolazione suina in Europa i tre sottotipi virali H1N1 (classico ed "avian like"), H3N2 (c.d. "human like") ed H1N2 ("human avian reassortant"). In Italia l'infezione da virus influenzale interessa prevalentemente la categoria produttiva dello svezzamento ed il sistema di allevamento da riproduzione a ciclo aperto.

La significativa presenza di vari agenti patogeni della patologia respiratoria SIV-associata, avvalorata l'ipotesi che il virus dell'influenza suina possa ricoprire un ruolo protagonista nell'evoluzione della sindrome PRDC. In episodi di patologia respiratoria il virus influenzale è risultato essere associato a PRRSV nel 65,3%, ad agenti batterici nel 58,7%, a PCV2 nel 34% ed a *M. hyopneumoniae* nel 9,3% (Gradassi et al., 2009) La natura dei virus influenzali del suino differisce nelle diverse regioni geografiche ed è in continua evoluzione; questo ha importanti riflessi sulla diagnosi e sul controllo dell'infezione, che non possono quindi prescindere da una continua sorveglianza epidemiologica; è essenziale infatti l'impiego di ceppi specifici quali antigeni per la messa a punto e di vaccini e di strumenti diagnostici (Van Reeth, 2007). Nel 2009 si è verificata una pandemia influenzale sostenuta da un ceppo A (H1N1) che contiene geni di derivazione suina, aviaria e umana e che ha interessato inizialmente il Centro-Nord America coinvolgendo successivamente altri continenti. Il nuovo virus pandemico è in grado di infettare il suino sia in condizioni sperimentali che di campo come evidenziato in Canada, Argentina, Australia e successivamente anche in Europa causando una sindrome respiratoria lieve (Hofshagen et al 2009; OIE, 2009)

Il nuovo virus ha caratteristiche antigeniche e genetiche che lo distingue dai ceppi H1N1 circolanti in Europa e in Italia. L'infezione da virus influenzali è presente dal 1976 in Italia e attualmente la maggior parte degli allevamenti suini risulta coinvolta. Tre sono i sierotipi presenti negli allevamenti nazionali: H1N1, H3N2, H1N2, frutto di riassortimenti complessi e ancora da chiarire nei loro dettagli, ma sicuramente avvenuti nel suino, probabilmente tra virus umani, aviari e suini (Barigazzi et al.2003; Luppi et al,2007; Moreno Martin et al.2008). L'influenza suina si manifesta con forme cliniche evidenti ma più spesso con forme asintomatiche responsabili di danni zootecnici ad oggi difficilmente quantificabili. Le infezioni da SIV si manifestano comunemente sotto forma di focolai caratterizzati da un quadro respiratorio acuto, a rapida insorgenza ed evoluzione, e da sintomi clinici quali febbre, anoressia, perdita di peso, letargia, scolo nasale ed oculare, tosse e dispnea. L'influenza suina può sfociare in importanti perdite economiche che non si misurano in relazione al tasso di mortalità, generalmente inferiore all'1%, ma piuttosto in base alla perdita di produttività in termini di riduzione dell'incremento ponderale, perdita di peso e costo dei trattamenti sostenuti. È noto che il SIV, indipendentemente dal sottotipo coinvolto, ha un ruolo attivo e primario nell'evoluzione della patologia respiratoria: è infatti in grado da solo, quale unico agente causale, di determinare una forma clinicamente manifesta. Tale virus è capace di replicare attivamente all'interno delle cellule epiteliali dell'intero tratto respiratorio, quindi a livello della mucosa nasale, delle amigdale, della trachea e dei polmoni. Proprio per tale abilità può essere considerato un "door-opener" per altre infezioni respiratorie batteriche e virali tipiche del suino e si inserisce bene nell'evoluzione di una sindrome respiratoria multifattoriale cronica quale la PRDC (Porcine Respiratory Disease Complex) (Thacker et al., 2001 ; Van Reeth *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 2005; Wang e Lu., 2008). Scopo di questo lavoro è di descrivere un episodio di influenza suina che ha interessato i riproduttori e i suinetti in sala parto, verificato nel 2009 in un allevamento del nord Italia con particolare riguardo agli aspetti zootecnici ed ai reperti che hanno permesso la diagnosi definitiva con l'isolamento per la prima volta di H1N1 pandemico nel suino in Italia

MATERIALI E METODI

Sintomatologia e dati produttivi

L'episodio si è verificato in un allevamento del nord Italia di 1264 scrofe di razza pura in produzione a rimonta esterna che prevedeva lo spostamento di suinetti di 6-10 Kg in

svezzamenti esterni. Nel novembre 2009 è comparsa una sintomatologia che coinvolgeva soprattutto le sale parto caratterizzata da una forma enterica nei suinetti di 5-10 giorni di vita con diarrea e bassa mortalità e da abbattimento ed ipertermia nelle scrofe.

Dopo la raccolta di un'anamnesi remota e recente è stata eseguita in diversi sopralluoghi una accurata indagine clinica che ha consentito di seguire settimanalmente l'evoluzione della situazione. Al fine di valutare l'impatto della malattia sulla produttività aziendale sono stati raccolti ed elaborati i dati zootecnici riferiti ai mesi di novembre, dicembre 2009 e gennaio 2010 in cui vi è stata sintomatologia e confrontati a quelli relativi allo stesso periodo del 2008/09.

Prelievo campioni

In due momenti diversi sono stati consegnati in laboratorio 9 suinetti sottoscrofa deceduti in allevamento ed appartenenti a differenti nidiate problema.

Nelle sale parto interessate sono state selezionate 4 scrofe con sintomatologia ed ipertermia e sottoposte a prelievo di campione di sangue e tamponi nasali.

Inoltre sono stati prelevati campioni di sangue da scrofe in diverse fasi di gravidanza e poste in unità produttive differenti e da suinetti di età diverse. Alcune scrofe sono state controllate a distanza di 28 giorni per valutare la siero conversione.

Indagini di laboratorio

I suinetti sono stati sottoposti ad esame anatomico patologico e sono stati prelevati organi quali polmone, fegato, milza, rene, ed intestino ed utilizzati per esame batteriologico al fine di procedere all'isolamento dei principali patogeni batterici respiratori ed enterici. Inoltre sono stati testati per la ricerca di PRRSV, PCV2 *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante RT-PCR, multiplex PCR e PCR rispettivamente (Calsamiglia et al, 1999; Quadrani et al, 1999; Suarez et al 1994). In particolare sono stati preparati omogenati dei polmoni dei suinetti e riuniti in due pool di 4 animali ciascuno e il soggetto con evidenti lesioni polmonari è stato esaminato in singolo.

I tamponi nasali sono stati sottoposti a screening per la ricerca di virus influenzale A mediante RT-PCR (5). I campioni positivi successivamente sono stati testati per la ricerca

Tutti i campioni sono stati sottoposti a screening tramite tecnica Real Time RT-PCR gene-matrice per la ricerca del genoma virale di influenza virus tipo A (Spackman et al., 2002).

A partire dalle matrici risultate positive a tale esame si è proceduto alla ricerca di H1N1 pandemico mediante RT-PCR (rt RT-PCR), in accordo con le procedure CDC (CDC,2009) e all'isolamento virale con le metodiche finalizzate, che prevedono l'inoculazione del campione in uova embrionate e colture cellulari (Gradassi et al. 2009) L'isolamento e l'identificazione di ceppi batterici responsabili di setticemia e-o polmonite è stato possibile per mezzo delle procedure di routine di coltura batterica e tipizzazione. L'esame sierologico è stato eseguito mediante test immunoenzimatico di tipo ELISA e test di Inibizione dell'emoagglutinazione (HI). Per l'identificazione degli anticorpi nei confronti della nucleoproteina di tipo A (NPA), è stato impiegato un test immunoenzimatico di tipo ELISA competitiva, utilizzando un anticorpo monoclonale (Mab) anti-NPA ATCC HB65 (De Boer al.,1990) e il virus parzialmente purificato adsorbito alla piastra. I sieri sono stati esaminati diluiti 1/10 e 1/20. La ricerca di anticorpi sottotipo-specifici è stata eseguita tramite test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando gli antigeni suini sottotipo H1N1, H3N2, H1N2, H1N1 pandemico e l'antigene umano H1N1 pandemico, secondo metodica standardizzata (Kendall et al.1982; OIE 2008).

RISULTATI

Sintomatologia e dati produttivi

Nei dati raccolti dall'allevatore per costruire una precisa anamnesi remota e recente spiccava il riferimento ad una sindrome enterica "anomala" con scarsa risposta ai normali trattamenti antibiotici associata ad una anoressia delle scrofe. Nel corso del sopralluogo è stata messa in evidenza sintomatologia che interessava la nidiata sia a carico dei suinetti che delle scrofe. In particolare erano interessate le sale parto con parti più recenti dove i suinetti avevano dai 3-15 giorni di vita. La sintomatologia interessava il 30-50 % delle scrofe che, pur con gravità diversa, presentava un comportamento anomalo soprattutto nei confronti della nidiata. Nelle sale parto con suinetti prossimi allo svezzamento non era presente sintomatologia e l'aspetto dei suinetti e delle scrofe era pressoché normale.

Le manifestazioni cliniche più evidenti nelle scrofe erano rappresentate da grave prostrazione, agalassia, animali in stazione o in decubito sternale con dispnea-polipnea, alcuni con respiro a bocca aperta e spesso con anoressia confermata dalla presenza di abbondante alimento nella mangiatoia. Inoltre erano presenti scoli vaginali biancastri soprattutto nelle scrofe che avevano partorito da 3-7 giorni. Si constatava ipertermia (39,5-40,5°C) in alcune delle scrofe con sintomatologia senza per altro che vi fossero alterazioni della consistenza delle feci. Gli animali ammalati presentavano uno stato di nutrizione scadente a partire dalla seconda settimana dal parto fino ad apparire emaciati nelle fasi finali della lattazione. Le nidiata si presentavano disomogenee e molti suinetti stavano raggruppati a mutuo contatto, addossati alla scrofa e spesso erano visibili animali dimagriti e disidratati. La mortalità totale dei suinetti durante la lattazione era aumentata fino a toccare il 20 % per 3 settimane.

Di seguito vengono riportati i grafici dei valori dei principali parametri produttivi riferiti al trimestre (novembre-dicembre e gennaio) del 2008/09 e 2009/10. Inoltre sono evidenziati i dati medi annuali 2008 e 2009 dell'azienda.

Figura 1 . Numero nati totali, numero nati vivi e numero svezzati 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10

Figure 1 . Total born, born alive and weaned piglets in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10

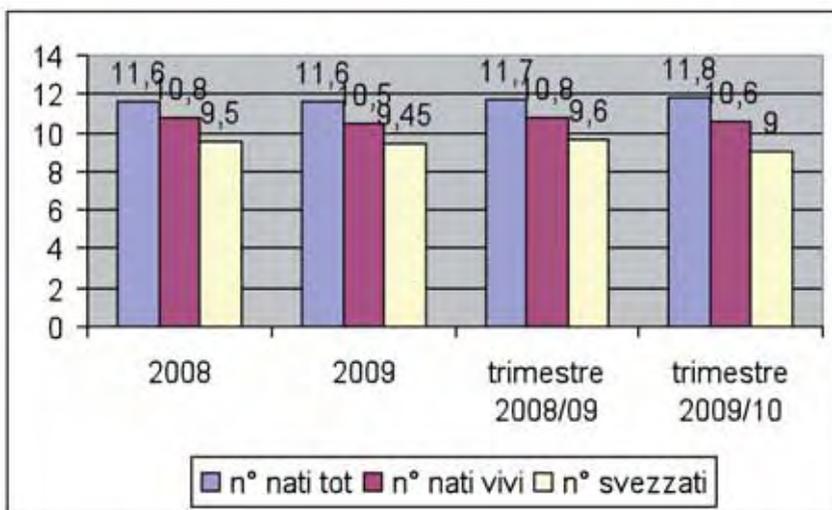


Figura 2. % di scrofe riformate e fertilità nel 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10

Figure 2. % replacement and fertility in sows in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10

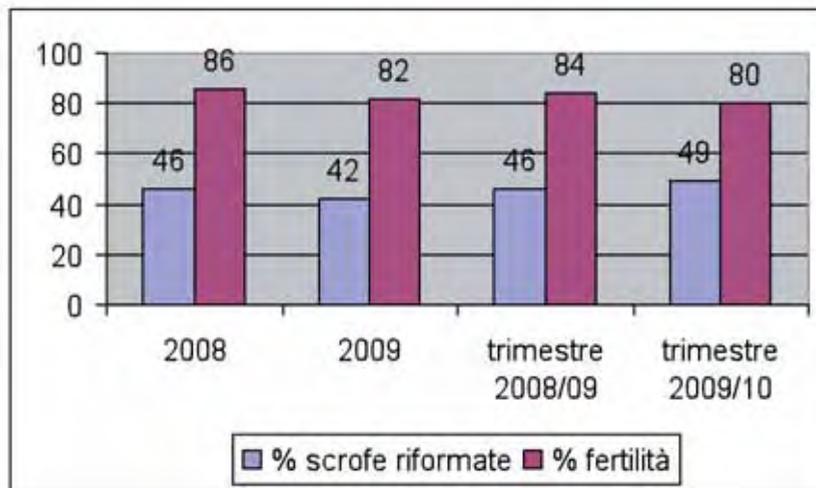
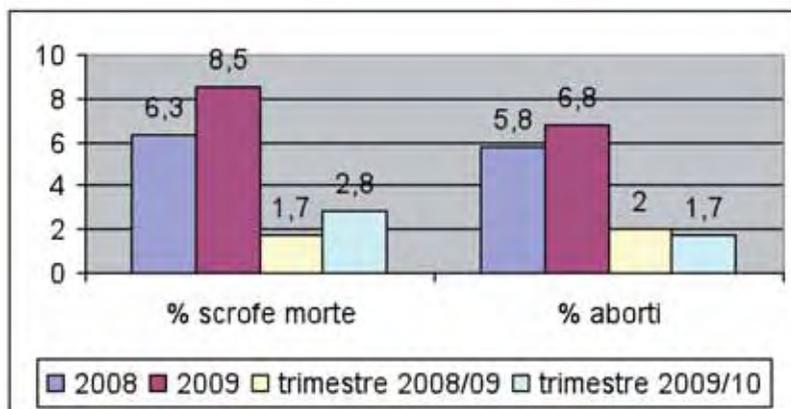


Figura 3. % di mortalità delle scrofe e di aborti nel 2008, 2009, trimestre 2008/09 e trimestre 2009/10

Figure 3. % sow mortality and abortions in 2008, 2009, November-January 2008/09 and 2009/10



Esami di laboratorio

L'esame anatomico-patologico ha evidenziato in 8 soggetti enterite catarrale mentre il n 9 presentava una polmonite lobulare con aree di epatizzazione localizzati soprattutto ai lobi apicali.

I polmoni dei suinetti 1-4 appartenenti al pool n 1 e il polmone del suinetto con lesioni polmonari sono risultati positivi per virus influenzale tipo A H1N1 ceppo pandemico. PRRSV ceppo Europeo è stato evidenziato nel pool 1 mentre il pool 2 e il soggetto 9 sono risultati negativi.

Le indagini per ricerca PCV2, *M.hypopneumoniae* e patogeni batterici sono risultate negative. I sieri prelevati in fase acuta non presentavano titoli anticorpali nei confronti dei classici sottotipi influenzali del suino. I campioni prelevati dopo 28 giorni dalla dimostrazione del virus presentavano un risultato positivo all'Elisa NpA e avevano titoli variabili da 1/20 a 1/160 in HI nei confronti del virus pandemico.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le infezioni da SIV si manifestano sotto forma di focolai caratterizzati da un quadro respiratorio acuto, a insorgenza ed evoluzione rapida, e spesso con forme asintomatiche responsabili di danni zootecnici ad oggi difficilmente quantificabili.

Nell'episodio descritto l'infezione da virus influenzale ha interessato soprattutto le scrofe durante le prime fasi della lattazione causando letargia anoressia e agalassia con conseguente danno all'intera nidiata. Il peggioramento delle performance delle scrofe e dei suinetti unitamente all'aumento dei costi sostenuti per i trattamenti hanno portato a danni economici importanti. La valutazione dei parametri produttivi paragonati ai valori degli stessi tre mesi dell'anno precedente hanno permesso di quantificare i danni zootecnici del periodo problema soprattutto in un aumento delle perdite medie in sala parto (0,6 suinetti in meno), delle scrofe perse o per riforma (+ 3,5 %) o per la mortalità (48 scrofe morte nel trimestre 2008/09 rispetto alle 29 nel trimestre 2009 /10) e una riduzione della fertilità (- 4%) per l'aumento dei ritorni.

Nelle indagini virologiche precedenti negli allevamenti del Nord Italia ad oggi sono stati dimostrati tre sottotipi virali H1N1, H3N2 e H1N2, in ordine di prevalenza (Luppi et al., 2007; Barigazzi e Donatelli, 2003).

Questo lavoro riporta il primo isolamento con caratterizzazione genomica di H1N1v in un allevamento suino italiano. La sequenziazione e l'analisi filogenetica di A/Sw/It/290271/09 conferma una elevata similitudine del genome del ceppo isolato nell'episodio descritto al H1N1 pandemico. Le indagini virologiche effettuate mediante il prelievo di tamponi nasali non hanno consentito di dimostrare la presenza di virus influenzale nel personale dell'allevamento al momento della diagnosi nei suini. Pur non potendo escludere altre vie di infezione, l'ipotesi della trasmissione a partire da personale affetto da influenza nelle settimane precedenti rimane una delle più probabili. Il programma di monitoraggio per l'influenza suina eseguito dall'IZSLER da molti anni ha permesso di caratterizzare i ceppi di virus influenzali circolanti negli allevamenti della Pianura Padana e di individuare la circolazione di H1N1 pandemico nel novembre 2009. La continuazione e l'implementazione delle indagini nelle forme respiratorie di suine permetterà di verificare nel tempo la diffusione del virus pandemico negli allevamenti.

L'isolamento di PRRSV in un pool di polmoni di suinetti in assenza di sintomatologia riproduttiva nelle scrofe conferma il fatto che il l'associazione del virus influenzale sia un evento frequente negli ultimi anni nei suinetti in svezzamento negli allevamenti italiani (Gradassi et al.,2009)

BIBLIOGRAFIA:

1. Barigazzi G., Donatelli I. (2003): Swine influenza in Italy. Veterinary Research Communication, 27: 93-99.
2. Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J Vet Diagn Invest. 1999; 11: 246-251.
3. Centers for Disease Control and Prevention, CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1), rev 2 (6 October 2009). Available from <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>
4. De Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "An ELISA for detection of antibodies

- against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species". Arch. Virol. 115, 47-61
5. Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S., Allan G.M. (2004): Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*, 98: 159-163.
Mancini D.A.P., Mendonca R.M.Z.; Dias A.L.F., Mendonca R.Z., Pinto J.R. (2005): Co-infection between *influenza virus* and flagellated bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 47: 275-280.
 6. Gradassi M., Sozzi E., Zanoni M., Salogni C., Cordioli P., Alborali L.(2009) Il virus influenzale suino (SIV) e le principali associazioni virali, batteriche e da Mycoplasma – Hyopneumoniae in 150 episodi di patologia respiratoria nel suino Atti SIPAS 2009 - XXXV :229-241.
 7. Hofshagen M, Gjerset CEr, Tarpai A, Brun E, Dannevig B, Bruheim T et al. Pandemic influenza A (H1N1) v: human to pig transmission in Norway?. *Euro Surveill.* 2009; 14(45):pii 19406.
 8. 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.
 9. Luppi A., Barbieri I., Moreno A.M., Lelli D., Sozzi E., Zanoni M.G., Fiorentini L., Alborali L., Cordioli P. (2007): Caratterizzazione genetica delle emoagglutinine e neuroaminidasi di virus influenzali suini circolanti nel Nord Italia nel periodo 1998-2006. Atti Sipas , XXXIII, 231-242.
 10. Moreno Martin A, Barbieri I, Chiapponi C, Foni E, Sozzi E, Canelli E, Luppi A, Cordioli P. Genetic characterization of H1N1 and H1N2 swine influenza viruses isolated in Italy in 1998-2007... Second annual meeting EPIZONE (Network of Excellence for Epizootic Disease Diagnosis and Control) "Need for Speed", 4-6 June 2008, Brescia (Italy), 2008a, abstract p99. Available from <http://www.epizone.net>.
 11. OIE World Animal Health Information Database: follow up report [online database]. Influenza A H1N1, Canada: report n.1, 11-6-09, Argentina: report n.1, 01-07-09, England: report n.1, 25.09.09, Norway: report n.1, 13-10-09, China: report n.1, 13-11-09. Available from <http://www.oie.int/wahis>
 12. Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea, S. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(12): 3917-3924. .
 13. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL.. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3256-60.
 14. Suárez P., Zardoya R, Prieto C, Solana A, Tabarés E., Bautista JM, Castro JM. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol* 1994;135: 89-99.
 15. Thacker E.L., Thacker B.J., Janke B.H. (2001): Interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and swine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 2525-2530.
 16. Van Reeth K., Nauwynck H., Pensaert M. (1996): Dual infection of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or *swine influenza virus*: a clinical and virological study. *Veterinary Microbiology*. 48: 325-335.
 17. Van Reeth K. (2007): Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.*, 38: 243-260.
 18. Wang K., Lu C. (2008): *Streptococcus suis* type 2 culture supernatant enhances the infection ability of the *Swine Influenza virus* H3 subtype in MDCK cells. *Berl. Munch. Tierarztz Wochenschr.*, 121: 198-202.
 19. World Organisation for Animal Health (OIE) (2008). – Swine Influenza, Chapter 2.8.8. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th Ed. OIE, Paris.