

**INDAGINE SIEROLOGICA NEI CONFRONTI DEI SOTTOTIPI  
H1N1, H1N2 E H3N2 DEL VIRUS INFLUENZALE IN  
ALLEVAMENTI SUINI ITALIANI AFFETTI DA SINDROME  
RESPIRATORIA NELL'ANNO 2009**

***SEROPREVALENCE OF H1N1, H1N2, H3N2 INFLUENZA VIRUS IN  
ITALIAN PIG FARMS AFFECTED BY RESPIRATORY  
DISORDERS IN 2009***

FONI E<sup>1</sup>.; ZANNI I<sup>1</sup>.; CHIAPPONI C.<sup>1</sup>.; LEOTTI G<sup>2</sup>.; VILA T<sup>3</sup>.

*1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini"  
Sezione di Parma; 2) Merial Italia, Milano; 3) Merial S.A.S., Lione, Francia*

**Parole chiave:** influenza suina, H1N1, H1N2, H3N2, sierologia

**Key words:** swine influenza, H1N1, H1N2, H3N2, serology

**Riassunto.** Una indagine sierologica nei confronti dei virus influenzali suini H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 e H3N2 A/sw/Gent/1/84 è stata condotta tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione su 500 sieri suini, raccolti nel corso dell'anno 2009, provenienti da 25 allevamenti prevalentemente situati nel Nord Italia che avevano presentato, circa tre settimane prima, sintomi clinici di affezione respiratoria. I risultati hanno permesso di verificare che il 44% degli allevamenti presentava anticorpi nei confronti del sottotipo H1N1, il 32% nei confronti del sottotipo H3N2, mentre nei riguardi del sottotipo H1N2 si è osservata risposta anticorpale diversificata a seconda che nella prova venisse utilizzato lo stipite di referenza A/sw/It/1521/98 o lo stipite di recente isolamento A/sw/It/284922/09. Si conferma l'importanza della attività di sorveglianza epidemiologica della circolazione dei virus influenzali nella popolazione suina e dello studio delle caratteristiche antigeniche e genetiche dei virus influenzali isolati da focolai di forme respiratorie, anche al fine di poter mantenere l'aggiornamento degli stipiti utilizzati come reagenti nelle prove sierologiche. Per quanto riguarda i dati relativi alla positività sierologica nei confronti del virus vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 i risultati, con solo un allevamento positivo, confermano una scarsa capacità di diffusione di questo stipite nei nostri allevamenti.

**Abstract.** A serological survey on 500 swine sera, collected from 25 Italian farms (16 farrow to finish, 4 fattening and 5 multi site herds) that had been affected with acute respiratory clinical signs, was performed submitting the samples to inhibition of haemoagglutination test against swine influenza strains: H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemic A/sw/Italy/290271/09, H3N2 A/sw/Gent/1/84. Globally 76% of farms tested were positive for at least one swine influenza virus, in particular 44% of the farms were positive to H1N1 subtype, 32% were positive to H3N2 subtype, while as regards H1N2 subtype the results showed 20% of positivity to the reference strain A/sw/It/1521/98, but 56% of positive response was detected if the recent reassortant Italian strain A/sw/It/284922/09 was used in the test. This observation suggests that the use of updated strains, adapted to the local epidemiological situation is a major asset for improving the accuracy of swine influenza surveillance programmes. Only one of the tested herds showed antibodies against vH1N1Pandemic A/sw/Italy/290271/09 strain.

## INTRODUZIONE

I virus influenzali appartengono alla famiglia *Orthomixoviridae*, all'interno del quale si possono trovare tre generi : A, B e C. Gli stipiti vengono distinti in sottotipi in base alle caratteristiche degli antigeni di superficie, l'emoagglutinina (HA) e la neuroaminidasi (NA), antigeni coinvolti in modo determinante nei processi di infezione a livello delle cellule bersaglio e nella stimolazione del sistema immunitario. Nella specie suina l'evoluzione clinica è determinata dalle caratteristiche intrinseche del sottotipo virale, dalla situazione immunitaria di popolazione, ma anche dall'intervento di infezioni secondarie e dalle condizioni di allevamento. L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina (SIV) ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina italiana di tre diversi sottotipi H1N1, H3N2, H1N2. Negli ultimi anni, è stata osservata una discreta stabilità antigenica e genetica per i sottotipi H1N1 e H3N2, mentre per il sottotipo H1N2 è stata documentata una variabilità genetica (Moreno A.M., 2009). Inoltre nel corso del 2009 è stata accertata, se pur limitata a due focolai, la circolazione del virus "A H1N1 Pandemic 2009" anche nell'allevamento suino italiano (Moreno A.M., 2010). La concomitante presenza della circolazione dei tre sottotipi nella popolazione suina italiana è già stata documentata negli anni passati sia da dati epidemiologici virologici (Foni E., 2010) che dalla disamina di dati sierologici (Van Reeth K. 2008). Studi più recenti, condotti in allevamenti francesi, hanno inoltre dimostrato, proprio per il sottotipo H1N2, come sia possibile rilevare una variabilità di risposta a seconda dello stipite virale utilizzato (Foni E. 2010a) e anche come questa diversa risposta anticorpale possa essere statisticamente significativa (Foni E., 2010b). Alla luce di queste valutazioni, è stato ritenuto opportuno aggiornare le conoscenze riguardo alla risposta sierologica nei confronti dell'influenza suina in allevamenti intensivi italiani che avevano presentato disordini a livello respiratorio, in particolare si è ritenuto opportuno valutare la risposta anticorpale sia nei confronti degli stipiti considerati di riferimento per i virus influenzali suini italiani, ma anche nei confronti del virus pandemico H1N1 e nei confronti di un recentissimo stipite del sottotipo H1N2.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo Maggio 2009-Dicembre 2009 sono stati presi in considerazione 25 allevamenti suini, situati per la maggior parte nelle regioni del Nord Italia, nei quali non veniva praticata la vaccinazione nei confronti dei virus influenzali. In particolare si sono considerati 16 allevamenti da riproduzione a ciclo chiuso, 4 allevamenti all'ingrasso e 5 allevamenti multisito (2 unità in svezzamento e 3 in finissaggio). In questi allevamenti, nei quali erano stati osservati segni clinici di sindrome respiratoria, sono stati eseguiti prelievi di sangue a tre settimane dalla loro insorgenza. In particolare negli allevamenti a ciclo chiuso sono stati prelevati 10 campioni di sangue dalle scrofe e 10 dai suini all'ingrasso, mentre nelle altre tipologie di allevamento sono stati prelevati 20 campioni. In totale sono stati raccolti 500 campioni di sangue. I campioni di siero sono poi stati sottoposti a ricerca di anticorpi, tramite reazione di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) (Van Reeth K., 2008) nei confronti dei virus influenzali: H1N1 A/sw/Finistere/2899/82, H1N2 A/sw/It/1521/98, H1N2 A/sw/It/284922/09, vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09, H3N2 A/sw/Gent/1/84. I risultati ottenuti sono stati valutati secondo i seguenti canoni: ciascun siero è stato considerato positivo nei confronti del virus testato se presentava titolo  $\geq 1:20$ , ciascun allevamento era valutato positivo nei confronti della valenza considerata se almeno due sieri presentavano un titolo  $\geq 1:20$ . Per evitare interpretazioni errate legate a cross reattività di uno stesso siero nei confronti di 2 sottotipi diversi, il campione veniva considerato non positivo nei confronti di un determinato sottotipo qualora il valore assunto presentasse una differenza maggiore di 3 diluizioni a confronto con il valore presentato per l'altro sottotipo.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica hanno permesso di osservare che 19 allevamenti (76%) presentavano risposta sierologica positiva nei confronti di almeno un sottotipo di virus influenzale suino. In particolare, come mostrato nella tabella 1, il 44 % degli allevamenti presenta positività anticorpale nei confronti del sottotipo H1N1 e il 32 % delle aziende presenta positività nei confronti del sottotipo H3N2. Per quanto riguarda il sottotipo H1N2 si è osservata una dicotomia nella risposta a seconda che si considerino i titoli nei confronti dello stipite di riferimento A/sw/It/1521/98 (20%) o dello stipite più recente A/sw/It/284922/09 (56%). Inoltre, come mostrano i dati raccolti nella tabella 2, l'utilizzo nella reazione sierologica del sottotipo di recente isolamento ha permesso di evidenziare un maggior numero di sieri che rispondevano a più alto titolo.

Ancora una volta si conferma l'importanza della sorveglianza epidemiologica della circolazione degli stipiti influenzali nell'allevamento suino per poter mantenere il monitoraggio di eventuali variazioni antigeniche di ceppi isolati da focolai di forme respiratorie, al fine di poter poi procedere ad un doveroso e continuo aggiornamento dei virus utilizzati nelle prove sierologiche che altrimenti rischiano di non fornire quadri fedeli dell'epidemiologia dell'infezione.

Confrontando questi dati sierologici con quelli ottenuti in anni precedenti (Van Reeth K. 2008), si può notare un certo decremento della percentuale di positività degli allevamenti nei confronti del sottotipo H1N1 che negli anni 2003 era vicina all'83%. Considerando che dal 2003 ad oggi, la circolazione del sottotipo H1N1 non ha manifestato segni di decremento (Foni E. 2010c), si profila la necessità di ulteriori studi di approfondimento per la definizione delle caratteristiche genetiche dei virus influenzali sottotipo H1N1, al fine di verificare che, se pur minime, le variazioni subite da questo sottotipo negli ultimi anni non evocino nell'animale infetto una risposta anticorpale che possa non essere adeguatamente svelata dall'utilizzo di stipiti di riferimento storici e quindi ormai datati.

I dati raccolti per quanto riguarda lo stipite vH1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/09 confermano la ridotta capacità di diffusione di tale virus negli allevamenti anche quando gli stessi siano localizzati in aree ad alta densità di allevamenti suini intensivi, come è il caso della maggior parte dei 25 allevamenti qui considerati.

**Tabella 1:** *Esiti indagine sierologica nei confronti di virus influenzale suino in 25 allevamenti italiani tramite IEA.*

<b>Stipite</b>	<b>N° allevamenti positivi/testati</b>	<b>% positività</b>
H1N1 A/sw/Finistere/2899/82	11/25	44%
H1N2 A/sw/Italy/1521/98	5/25	20%
H1N2 A/sw/Italy/284922/09	14/25	56%
H3N2 A/sw/Gent/1/84	8/25	32%
v H1N1Pandemico A/sw/Italy/290271/2009	1/25	4%

**Tabella2** : Confronto fra i titoli anticorpali ottenuti in IEA utilizzando due stipti di virus influenzale suino. sottotipo H1N2.

Titolo IEA	<20	20	40	80	160	320	640	Totale
H1N2 sw/Italy/1521/98	483	13	3	1	0	0	0	500
H1N2 sw/Italy/284922/09	373	42	46	28	9	1	1	500

**RINGRAZIAMENTI** : Si ringraziano la Dr.ssa Ana Maria Moreno Martin per aver fornito lo stipte A/sw/Italy/290271/2009 e tutti i Medici Veterinari che hanno partecipato alla raccolta dei campioni per la realizzazione di questo studio di campo.

### BIBLIOGRAFIA

a Foni E., Bublot M., Chiapponi C., Herin J.B., Joisel F. , Perreul G., Zanni I., Vila T.(2010) Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European symposium on Porcine Health Management 26-28 May Hannover, Germany, p. 104.

b Foni E., Garbarino C., Chiapponi C. (2010) “Serological investigation on convalescent sera from swine influenza outbreaks in Northern Italy” 1<sup>st</sup> Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) 15-17 September 2010 Lelystad, The Netherlands.

c Foni E., Chiapponi C, Sozzi E, Barbieri I, Moreno AM, Merenda M, Luppi A, Alborali L, Cordioli P (2010) “Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia”. Atti Convegno SIPAS 36 - p 159-166

Moreno A., Barbieri I, Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Alborali L., Cordioli P. (2009) “Virus influenzali suini H1N2 in Italia: presenza di ceppi riassortanti”. Atti XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

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. May 5;4:52-6.

Van Reeth K., Brown I.H., Dürrwald R., Foni E., Labarque G., Lenihan P., Maldonado J., Markowska-Daniel I., Pensaert M., Pospisil Z., Koch G. (2008) “Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003”. Influenza Other Respiratory Viruses. May; 2 (3):99-105.