

ELEVATA VARIABILITÀ GENETICA DI VIRUS INFLUENZALE SUINO IN UNA DELIMITATA AREA DELLA PIANURA PADANA

HIGH GENETIC VARIABILITY OF SWINE INFLUENZA VIRUS IN A CONFINED AREA OF NORTHERN ITALY

FONI E.¹, CHIAPPONI C.¹, BAIONI L.¹, MERENDA M.¹, MANDALARI C.¹, LUPPI A.¹
RUGNA G.¹, TAMBA M.¹, PELLACINI M.², FORLENZA J.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di riferimento OIE per influenza suina; ²Medico Veterinario

Parole chiave: virus influenza A, suino, variabilità genetica

Key words: influenza A virus, swine, genetic variability

Riassunto

Il virus dell'influenza A suina (SIAV) circola attivamente nella popolazione suina italiana e i sottotipi H1avN1, H1huN2hu, H3N2 and H1N1pdm sono riscontrati con maggior frequenza anche se occasionalmente vengono isolati stipiti riassortanti (*r*). Sono stati condotti accertamenti virologici e biomolecolari nei confronti di SIAV su 3 allevamenti, per complessive 5 unità produttive, in una delimitata area del Nord Italia. Complessivamente sono stati isolati 35 sottotipi di SIAV da cui sono stati selezionati 17 SIAV per la caratterizzazione genetica. Nell'allevamento a ciclo aperto A, 4 SIAV sono stati isolati, 2 SIAV sono stati caratterizzati come virus H1N2*r* appartenenti al lineaggio Papenburg circolante in Germania mentre 2 SIAV sono risultati virus H1N1 pdm riassortanti con virus H1huN2hu circolanti nella popolazione suina italiana. Nell'allevamento di suini all'ingrasso B sono stati caratterizzati 4 SIAV riferibili al sottotipo H1avN1, mentre 2 isolati sono stati caratterizzati come H1huN2hu e, gli ultimi 2 come stipiti riassortanti H1avN2sw. Nell'allevamento a ciclo chiuso C (C1, C2 e C3 le tre unità produttive) è stata identificata la circolazione dei sottotipi H1avN1, H1huN2, H3N2, H1avN2*r* ed anche di uno stipite H1N2*r* riferibile al lineaggio Papenburg. Questo studio, se pur condotto su un numero limitato di aziende che circoscrivono un' area geografica ridotta, ha messo in evidenza una elevata variabilità nella composizione genetica dei SIAV coinvolti.

Abstract

Swine influenza A virus (SIAV) circulates actively in the Italian pig population and mainly subtypes H1avN1, H1huN2hu, H3N2 and H1N1pdm are detected, but also reassortant (*r*) strains are occasionally isolated. Considering a limited number of herds (n. 5) in a confined area of North Italy a high genetic variability of SIAVs was detectable. Farm A: a farrow to feeder farm, farm B: a finishing pig farm and farm C: a farrow to finish farm (C1, C2 and C3). Virological and biomolecular investigations for SIAV were performed and 17 isolates were selected for genetic studies. A: 4 H1N2 SIAVs were obtained. Genetic studies characterized 2 H1N2*r* pdm strains (German Papenburg lineage) and 2 H1N2*r* pdm strains showing H1N1pdm internal genes but HA and NA clustering with H1huN2hu Italian SIAV. B: 8 SIAVs were isolated. Four strains were characterized as H1avN1, 2 strains as H1huN2hu while 2 strains showed to be *r* strains H1avN2sw. C: 10 SIAVs belonging to different genetic lineages were detected: H1avN1, H1huN2hu,

H3N2, H1avN2_r and also H1N2_r strain clustering with the German lineage. The study underlines the increasing genetic diversity of Italian SIAVs even in a limited number of herds and even in those that did not introduce animals, in confined area of North Italy. Continuous surveillance of SIAV infections should be further reinforced to provide a baseline for updating and interpreting the role of SIAV in zoonotic events and to focus on relatedness to currently used vaccines.

INTRODUZIONE

L'influenza suina è annoverata tra le patologie che compongono il complesso delle patologie respiratorie del suino (PRDC) e considerata causa di perdite economiche per l'allevamento. L'infezione da virus dell'influenza A nel suino (SIAV), oltre ad avere importanti ripercussioni sanitarie, gioca anche un ruolo importante nella ecologia del virus influenzale 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 RNA del virus influenzale 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 del SIAV in tutto il mondo, anche se nel virus influenzale suino il drift antigenico, contrariamente a quanto avviene per i virus umani, è quello meno frequentemente osservato (Brown, 2013). Pertanto anche se i sottotipi a circolazione enzootica nella popolazione suina di tutti i continenti sono H1N1, H1N2 e H3N2, la loro origine, le loro caratteristiche antigeniche e genetiche sono molto diverse nelle varie aree geografiche e per di più all'interno di queste subiscono ulteriori evoluzioni nel tempo. Ne consegue a riguardo uno scenario estremamente complesso e in continua evoluzione (Vincent et al., 2014).

Lo scenario italiano si caratterizza con la circolazione dei sottotipi: H1N1 di origine aviaria a diffusione europea (H1avN1), H3N2 originato da riassortimento di virus umani e suini (H3N2) anche questo rappresentativo dei virus H3N2 circolanti in Europa, ed infine, H1N2 riassortante di virus di origine umana e suina (Chiapponi et al., 2014a). Quest'ultimo presenta infatti i geni interni derivanti da H1avN1 ma HA di origine umana e NA derivante da virus influenzale H3N2 umano circolante alla fine anni 90 (H1huN2hu). Questo sottotipo H1huN2hu circolante nei nostri allevamenti è inoltre caratterizzato da una doppia delezione nella regione HA1 (Moreno et al., 2013; Chiapponi et al., 2014a) ed è andato man mano soppiantando il virus H1N2 di tipo europeo che invece mostrava una NA di un virus influenzale circolante nei suini in Regno Unito molti anni prima della stabilizzazione del sottotipo H3N2 negli anni '80 (Marozin et al., 2002; Zell et al., 2008). A partire dal 2009 si è osservata anche la circolazione del sottotipo H1N1 pdm (Moreno et al., 2010) che attualmente sembra essersi stabilizzato con una incidenza del 25% nell'ambito degli isolati sottotipo H1N1. Nell'ambito di questo scenario c'è da considerare la registrazione di numerosi eventi di riassortimento, 6,8% nell'ambito del sottotipo H1N1 ma 39,1% nell'ambito del sottotipo H1N2 (Chiapponi et al., In press 2015).

MATERIALI E METODI

Nell'ambito della attività diagnostica routinaria dei laboratori IZSLER sul territorio sono stati monitorati nel tempo in concomitanza con l'insorgenza di sintomatologia respiratoria tre unità produttive della filiera suina delle province di Modena e Reggio Emilia.

Allevamento A: allevamento ciclo aperto circa 900 scrofe, rimonta interna, commercializza suinetti di 30Kg. Non veniva praticata vaccinazione nei confronti di SIAV. Da Novembre 2013 per un anno sono stati registrati 15 conferimenti di tamponi nasali e/o polmoni per accertamenti diagnostici nei confronti di agenti di malattia respiratoria, complessivamente sono stati esaminati 34 campioni, la sintomatologia interessava esclusivamente suinetti di 20-25 Kg.

Allevamento B: Allevamento di produzione suino pesante Sito 2 (da 6Kg a 50Kg) e Sito 3 (da 50Kg fino alla macellazione), distanti 3,2 Km l'uno dall'altro. I suinetti vengono introdotti a gruppi di 400 soggetti a flusso continuo nelle strutture dell'allevamento da un unico fornitore. Non veniva eseguita vaccinazione nei confronti di SIAV. Da Luglio 2013 a tutto il 2014 sono stati conferiti 8 set di campioni per un totale di 46 tra tamponi nasali e tessuto polmonare. Nell'anno 2013 erano colpiti da forma respiratoria soggetti all'ingrasso e, nel 2014, i soggetti del Sito 2 di circa 40 kg.

Allevamento C: Allevamento costituito da una unità produttiva di 750 scrofe a ciclo chiuso (C1), una unità di produzione scrofette (C2) e una unità produttiva di finissaggio (C3) dei suini maschi provenienti da C2, nella quale vengono eseguite introduzioni anche di suini di provenienza diversa. Campioni diagnostici per diagnosi di affezione respiratoria sono stati conferiti con una certa alternanza negli anni. Nel 2009 sono stati eseguiti accertamenti nella unità C1 (soggetti di 20-30kg) e C2 (mortalità in scrofe). Nel 2010 si è iniziato a vaccinare le scrofe della unità produttiva C1. Nel 2011 si è osservata insorgenza sintomi respiratori prima in soggetti all'ingrasso e poi in lattoni nel ciclo chiuso C1. Nel 2012 sono state nuovamente colpite le scrofette in C2, mentre nel 2014 sono riscontrati casi di mortalità in soggetti all'ingrasso nella unità C3. Complessivamente sono stati esaminati 39 campioni diagnostici in 14 conferimenti successivi.

I campioni sono stati sottoposti ad accertamenti batteriologici e virologici appropriati seguendo le informazioni relative alla storia clinica e in base alle lesioni anatomopatologiche osservate. Tutti i campioni sono stati comunque processati ed esaminati per la ricerca del virus influenza suina. Complessivamente sono stati esaminati 119 campioni di tamponi nasali e/o polmoni con tecnica di Real-Time PCR per la ricerca di virus influenzale tipo A. I campioni positivi sono stati quindi sottoposti ad isolamento virale come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2010).

Una selezione di stipiti di SIAV isolati è stata sottoposta ad analisi genetica tramite sequenziamento genomico completo mediante sequenziatore MiSeq (illumina) (Chiapponi et al., 2014b). Le sequenze genetiche ottenute sono state allineate mediante il software ClustalW (Larkin et al., 2007) con sequenze di virus influenzali suini di riferimento presenti in GenBank e sequenze di isolati presso l'IZSLER. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il metodo Maximum likelihood con il software IQTREE (Minh et al., 2013) e sono stati graficamente condensati mediante MEGA5 (Tamura et al., 2011). Sulla base della segregazione nell'albero filogenetico, ad ogni segmento genico virale è stato attribuito un genotipo: av-like, pdm, hu-like, sw-H3 per HA e av-like, hu-H3N2, sw-H3N2 per NA.

RISULTATI

Allevamento A: Dagli accertamenti virologici eseguiti sui 15 conferimenti pervenuti al laboratorio è stata riscontrata positività tramite Real Time PCR in 5 conferimenti (Marzo-Giugno 2014). L'analisi virologica condotta sui singoli campioni ha portato all'isolamento di 4 SIAV. Due di questi isolati (Marzo e Maggio) A/sw/It/79523/2014 e A/sw/It/124953/2014 sono stati caratterizzati come sottotipo H1pdm N2sw, ovvero virus H1N1pdm riassortante per la presenza di NA di origine suina e riferibili al lineaggio Papenburg cui appartengono SIAV frequentemente isolati negli allevamenti tedeschi (Lange et al., 2013). Di contro gli altri 2 isolati (Maggio e Giugno) A/sw/It/143711/2014 e A/sw/It/150383/2014 sono stati identificati geneticamente come H1N2 riassortanti pandemici in quanto presentavano i geni interni riferibili a virus H1N1pdm, ma HA di origine umana e NA di origine suina riconducibili agli antigeni caratterizzanti i virus sottotipo H1huN2hu circolanti nella popolazione suina italiana (Tab. 1, Fig. 1).

Allevamento B: I primi conferimenti da questa azienda provenivano dal Sito 3 nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre 2013 ed erano rappresentati da gruppi di tamponi nasali. Dai tamponi conferiti nel mese di Luglio sono stati isolati 6 stipiti virali riferibili a sottotipo H1avN1 tramite tipizzazione biomolecolare con test PCR multiplex; uno stipite A/sw/It/191002/2013 è stato selezionato per lo studio genetico che ne ha confermato la correlazione con il gruppo di SIAV H1avN1. Dai 5 tamponi nasali conferiti in Agosto sono stati riscontrati 4 campioni positivi tramite Real Time PCR e, tramite tipizzazione biomolecolare, si sono caratterizzati 2 stipiti SIAV H1avN1 e 1 H1huN2. In uno dei tamponi è stata inoltre dimostrata la presenza contemporanea dei due sottotipi. Per genotipizzazione sono stati selezionati lo stipite A/sw/It/198930-1/2013 e lo stipite A/sw/It/198930-3/2013 (Tab. 1). L'analisi genetica ha reso possibile inquadrarli rispettivamente come H1avN1 e H1huN2hu e pertanto assimilabili ai sottotipi più frequentemente riscontrati nei nostri allevamenti. Anche il virus isolato dai campioni di Settembre 2013, A/sw/It/244504-1/2013, è stato caratterizzato come H1avN1. A distanza di un anno dai campioni conferiti dal Sito 2 sono stati isolati 10 SIAV da tamponi nasali (Ottobre 2014) e 1 SIAV da polmone (Dicembre 2014). Sono stati selezionati rispettivamente lo stipite A/sw/It/281230/2014 e A/sw/It/333140/2014 che sottoposti ad analisi filogenetica sono risultati stipiti H1N2 riassortanti per HA (di origine aviare) e per NA (di origine suina), questi virus hanno quindi una NA diversa da NA degli stipi italiani che ha origine umana (Tab.1, Fig. 1).

Allevamento C: Nel 2009 sono stati interessati da sintomatologia respiratoria a distanza di qualche mese la struttura a ciclo chiuso (C1), interessati i soggetti di 20-30 kg, e la struttura per la produzione di scrofette C2, rispettivamente sono stati isolati 2 stipiti di SIAV sottotipo H1avN1 (A/sw/It/7189/2009) e un SIAV H1huN2hu (A/sw/It/199144/2009). Nel 2011 i sintomi si presentano di nuovo nella struttura C1, ma in questo caso sono coinvolti prima i soggetti all'ingrasso e poi i lattoni. Da questo episodio sono stati isolati 3 SIAV tutti tipizzati come H3N2, lo stipite identificativo di questo episodio è A/sw/It/171855/2011. Nel 2012 da tamponi nasali prelevati da scrofette in magronaggio nella struttura C2 si è riscontrato l'isolamento di 4 SIAV che l'analisi filogenetica ha inquadrato come stipiti H1N2 riassortanti per antigene HA di origine aviare H1N1, lo stipite identificativo di questo focolaio è A/sw/It/224721-3/2012. Da polmoni di suini all'ingrasso della struttura C3 nel settembre 2014 è stato isolato uno stipite virale, A/sw/It/246087/2014 riferibile a virus appartenenti al lineaggio tedesco "Papenburg" (Tab. 1, Fig. 1).

Tabella 1. Virus sottoposti ad analisi genetica, origine, mese del prelievo e caratterizzazione genetica del genoma virale.

virus	Allevamento	Mese prelievo	PB1, PB2, PA, NP, M, NS	HA	NA	sottotipo
A/swine/Italy/79523/2014	A	Mar 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw
A/swine/Italy/124953/2014	A	Mag 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw
A/swine/Italy/143711/2014	A	Mag 2014	PDM	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu r pdm
A/swine/Italy/150383/2014	A	Giu 2014	PDM	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu r pdm
A/swine/Italy/191002/2013	B	Lug 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/198930-1/2013	B	Ago 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/198930-3/2013	B	Ago 2013	AV-LIKE	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu
A/swine/Italy/244504/2013	B	Sett 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/281230/2014	B	Ott 2014	AV-LIKE	AV-LIKE	SW-H3N2	H1avN2sw
A/swine/Italy/333140/2014	B	Dic 2014	AV-LIKE	AV-LIKE	SW-H3N2	H1avN2sw
A/swine/Italy/7189/2009	C1	Gen 2009	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/199144/2009	C2	Ago 2009	AV-LIKE	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu
A/swine/Italy/171855/2011	C1	Lug 2011	AV-LIKE	SW-H3	SW-H3N2	H3N2
A/swine/Italy/224721/2012	C2	Sett 2012	AV-LIKE	AV-LIKE	HU-H3N2	H1avN2hu
A/swine/Italy/246087/2014	C3	Sett 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw

DISCUSSIONE

Le unità produttive considerate in questo studio sono situate in un'area piuttosto limitata, se si considera l'ampiezza del territorio su cui i laboratori IZSLER svolgono il monitoraggio sanitario dell'allevamento suino. Infatti considerando la disposizione geografica di questi allevamenti sul territorio si osserva come essi delimitano un poligono di 388 Km² sul quale insistono complessivamente 63 allevamenti da ingrasso e 20 allevamenti da riproduzione, per un numero complessivo di circa 90.000 capi, pari ad una densità di circa 220 suini per Km². Gli allevamenti considerati al massimo distano fra di loro poco più di 26 km (Fig. 2). Questo studio è stato condotto considerando l'insieme

delle ricerche eseguite per influenza nel corso della attività diagnostica di routine per la diagnosi eziologica di forme respiratorie in suini di varie età e in diverse tipologie. Pur operando in questo ristretto ambito territoriale, con un numero limitato di aziende, operando sull'input della casualità di insorgenza della sintomatologia e con un numero limitato di conferimenti (n. 37) è stato possibile registrare non solo un consistente numero di isolamenti di SIAV (n. 35), ma soprattutto una elevata variabilità della composizione genica degli stipiti virali. Nell'allevamento A è stata evidenziata infatti la circolazione di due virus riassortanti pandemici di cui uno caratterizzato dal riassortimento con antigeni esterni HA e NA riportabili ai virus influenzali italiani sottotipo H1huN2hu e l'altro ad uno stipite sovrapponibile a quello diffuso negli allevamenti tedeschi (lineaggio "Papenburg") lo stesso virus è stato anche isolato nell'ingrasso C3 (Fig. 1) che comunque dista 26 Km da A. (Fig. 2). Va puntualizzato che da analisi genetiche eseguite su una selezione di 117 virus effettuata su complessivi 324 SIAV ottenuti da 5228 campioni esaminati (Chiapponi et al., In press 2015) gli unici SIAV riferibili a Papenburg sono i 3 descritti in questo studio. Nell'allevamento B invece nel corso di un solo anno è stata osservata la circolazione del sottotipo H1avN1 e di due riassortanti del sottotipo H1N2 (Fig.1).

Nel caso dell'allevamento B la continua introduzione di animali può aver senz'altro rivestito ruolo primario nel facilitare il rimescolamento genico, mentre questo aspetto non è riscontrabile, come evento determinante, nell'allevamento A, C1 e C2, essendo questi allevamenti che non introducono suini, in ciascuno di questi sono infatti circolati, rispettivamente, 2 e 3 lineaggi diversi. Del resto la trasmissibilità di SIAV attraverso le correnti di aria, almeno fino a 2,1 km è stata recentemente dimostrata (Corzo et al., 2013).

CONCLUSIONI

Lo studio conferma che negli allevamenti suini emiliani vi è una continua introduzione e circolazione, anche contemporanea di più stipiti di SIAV. Questo riscontro è stato evidenziato anche in due allevamenti che non introducevano animali vivi, a conferma dell'ipotesi di diffusibilità del SIAV per via aerea anche a distanza ragguardevole. Il riscontro in quest'area di SIAV appartenenti a lineaggio tedesco "Papenburg" potrebbe essere ricondotto alla vicinanza degli allevamenti considerati allo snodo autostradale modenese che rappresenta un punto cruciale degli scambi commerciali tra Europa centro-settentrionale e l'Italia sia di suini vivi che delle loro carni. La marcata variabilità dei SIAV circolanti negli allevamenti sottolinea anche la necessità di porre massima attenzione nella interpretazione dei dati sierologici di screening sulla circolazione di SIAV nei nostri allevamenti; la cross reattività generata da circolazione di riassortanti infatti potrebbe determinare quadri non ben definiti. In questo scenario non va inoltre dimenticata l'opportunità di monitorare nel tempo l'adeguatezza dei vaccini correntemente utilizzati nei nostri allevamenti. La possibilità di affiancare alla attività di sorveglianza passiva programmi di sorveglianza attiva ben definiti nel tempo e nello spazio potrebbe garantire migliori risultati nella mappatura dei vari lineaggi di SIAV circolanti. Questa attività darebbe maggiore garanzia anche riguardo alla possibilità di evidenziare precocemente la circolazione di stipiti influenzali che potrebbero avere acquisito potenziali capacità patogene per le altre specie, in particolare per l'uomo.

Fig.1. Alberi filogenetici condensati dei segmenti HA-H1, NA-N1 e NA-N2 ottenuti dall'allineamento delle sequenze dei virus dello studio con sequenze virali presenti in Genbank o di isolati IZSLER.

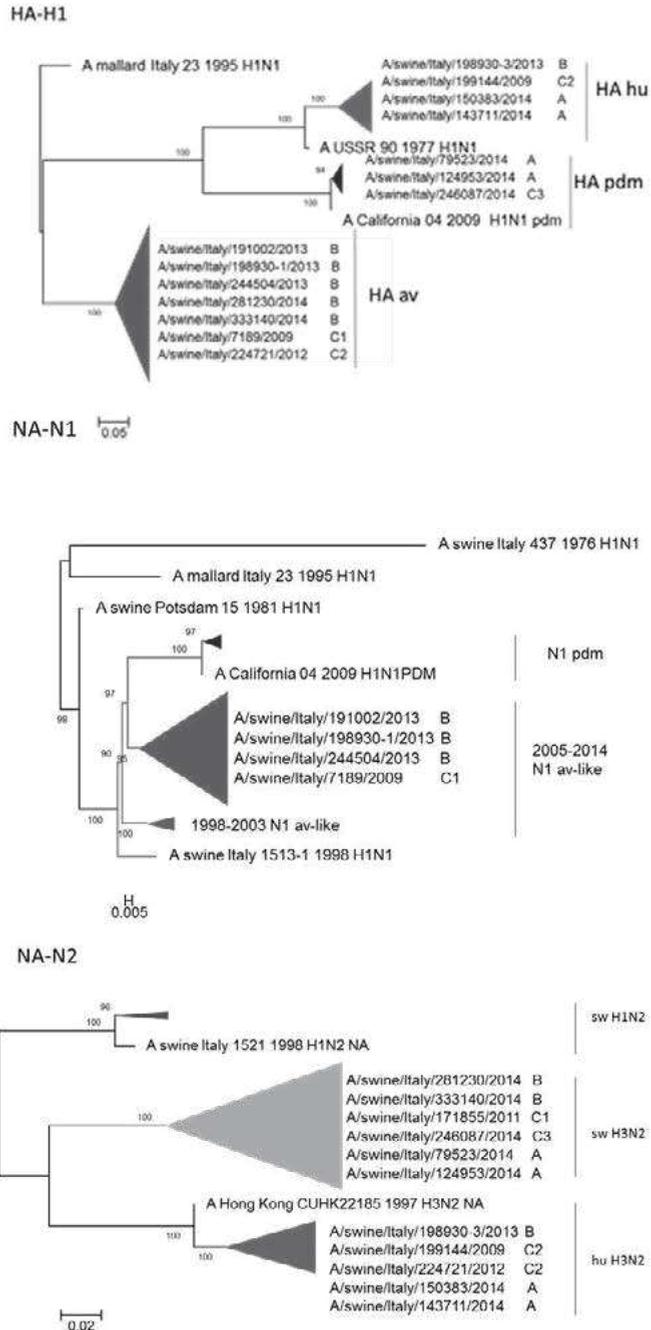
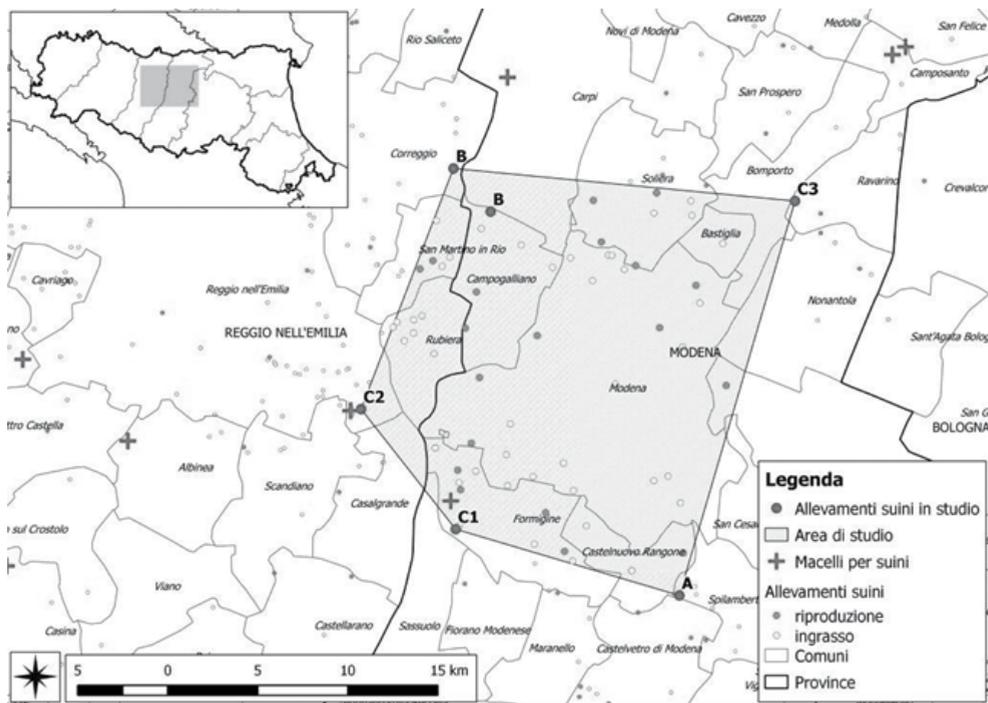


Fig. 2. Mappa della regione interessata dallo studio



RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Sig.ra Roberta Manfredi per l'eccellente supporto tecnico. Lo studio è stato parzialmente finanziato dal Progetto di Ricerca Corrente PRC2012002.

BIBLIOGRAFIA

- Brown, I.H., (2013). History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370: 133-146.
- Cheung, T.K., Poon, L.L., (2007). Biology of influenza A virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102: 1-25.
- Chiapponi, C., Baioni, L., Moreno, A., Alborali, G. L., Lelli, D., Luppi, A., Faccini, S., Vaccari, G., Boni, A., Zaccaria, G. and Foni, E. (In press 2015). Genetic variability of swine influenza viruses in Italy: 2009-2014. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases ISERPDP 2015, June 2015.
- Chiapponi, C., Moreno, A., Baioni, L., Luppi, A., Faccini, S. and Foni, E. (2014a). Genetic characterization of Italian swine influenza viruses : 2011-2013. *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*, June 8 - 11, Cancun, Mexico, 315.
- Chiapponi, C., Baioni, L., Luppi, A., Moreno, A., Castellan, A., Foni, E., (2014b). Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Vet. Microbiol.* 174: 9-15.
- Chiapponi, C., Zanni, I., Garbarino, C., Barigazzi, G., Foni, E., (2010). Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza

A viruses. *J. Virol. Methods* 163: 162-165.

Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., (2013). Airborne detection and quantification of swine influenza A virus in air samples collected inside, outside and downwind from swine barns. *PLoS One* 8: e71444.

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.

Lange, J., Groth, M., Schlegel, M., Krumbholz, A., Wiczorek, K., Ulrich, R., Koppen, S., Schulz, K., Appl, D., Selbitz, H.J., Sauerbrei, A., Platzer, M., Zell, R., Durrwald, R., (2013). Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. *Vet. Microbiol.* 167: 345-356.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Marozin, S., Gregory, V., Cameron, K., Bennett, M., Valette, M., Aymard, M., Foni, E., Barigazzi, G., Lin, Y., Hay, A., (2002). Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J. Gen. Virol.* 83: 735-745.

Minh, B.Q., Nguyen, M.A., von Haeseler, A., (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30: 1188-1195.

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.

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.

Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., (2006). Swine influenza. 9th edn, Blackwell Publishing Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds),.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Vincent, A., Awada, L., Brown, I., Chen, H., Claes, F., Dauphin, G., Donis, R., Culhane, M., Hamilton, K., Lewis, N., Mumford, E., Nguyen, T., Parchariyanon, S., Pasick, J., Pavade, G., Pereda, A., Peiris, M., Saito, T., Swenson, S., Van Reeth, K., Webby, R., Wong, F., Ciacci-Zanella, J., (2014). Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public. Health.* 61: 4-17.

Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., Durrwald, R., (2008). Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Arch. Virol.* 153: 2085-2092.

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.