

# IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENOTIPI EUROPEI DEL VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN ITALIA TRA IL 2013 E 2016

## *IDENTIFICATION OF NOVEL EUROPEAN SWINE INFLUENZA GENOTYPES IN ITALY BETWEEN 2013 AND 2016*

FUSARO<sup>1</sup> A., ZAMPERIN<sup>1</sup> G., MILANI<sup>1</sup> A., SCHIVO<sup>1</sup> A., MONNE<sup>1</sup> I., CAVICCHIO<sup>1</sup> L., VIO<sup>1</sup> D., SCHIAVON<sup>1</sup> E., GIORGIUTTI<sup>2</sup> M., CASTELLAN<sup>2</sup> A., MION<sup>1</sup> M., BEATO<sup>1</sup> M.S.

<sup>1</sup>Izsv, viale dell'università 10, Legnaro 35020, Padova, Italy; <sup>2</sup>Private Veterinary Consultants

**Parole chiave:** influenza suina, genotipi

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

### **Riassunto**

La sorveglianza passiva condotta nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia tra il 2013 e il 2016 ha identificato un totale di sette allevamenti virologicamente positivi al virus dell'influenza suina (SIV), localizzati in nove differenti comuni di 4 diverse province. In alcuni allevamenti ripetuti focolai respiratori si sono registrati.

Il consorzio europeo per la sorveglianza di virus influenzali suini (European Surveillance Network for influenza in pigs – ESNIP) ha caratterizzato geneticamente i virus circolanti nei Paesi aderenti al consorzio tra 2009 e 2013, creando una classificazione univoca (Watson et al., 2015). In totale, a seguito della caratterizzazione di 290 virus, venticinque genotipi sono stati identificati e identificati da A a W.

Nel presente lavoro il genoma completo di 14 virus identificati tra il 2013 e il 2016 in Veneto e Friuli Venezia Giulia è stato caratterizzato mediante Illumina MiSeq, per identificare i genotipi circolanti nel suddetto territorio.

L'analisi filogenetica ha identificato due virus pandemici (A(H1N1)pdm09), 5 virus human-like H1N2 (H1<sub>hu</sub>N2) e 5 avian-like H1N2 (H1<sub>av</sub>N2), 1 avian-like H1N1 (H1<sub>av</sub>N1) e 1 virus di sottotipo H3N2. In totale sono stati identificati 6 differenti genotipi, secondo la recente classificazione, tra cui 1 mai identificato e segnalato in Europa precedentemente.

La sorveglianza e l'identificazione dei genotipi circolanti consente di individuare la presenza di nuovi genotipi o l'introduzione di nuovi genotipi in Paesi e aree precedentemente indenni. Considerando il potenziale zoonosico di questi virus tale attività si dimostra necessaria per monitorare l'emergenza di virus con potenziale pandemico.

### **Abstract**

Passive surveillance for Swine Influenza virus (SIV) in northeastern Italy (Veneto and Friuli Venezia Giulia regions) carried out between 2013 and 2016 identified a total of seven infected farms in nine different municipalities covering 4 neighbouring provinces. In some farms repeated respiratory outbreaks were observed over the investigated period.

Watson et al. (2015) have recently described 25 different SIV genotypes in Europe (A-W). To explore the genetic characteristic of the SIVs circulating in the area of investigation in Italy, we isolated and genetically characterized the complete genome of 14 viruses collected from seven different farms using the Illumina MiSeq.

Topology of the maximum likelihood phylogenetic trees identified two pandemic H1N1 (A(H1N1)pdm09), 5 human-like H1N2 (H1<sub>hu</sub>N2) and 5 avian-like H1N2 (H1<sub>av</sub>N2) subtypes, 1 avian-like H1N1 (H1<sub>av</sub>N1) and 1 H3N2. A total of 6 different genotypes were identified according to the Watson's classification (2015). Interestingly, a novel genotype

which had never been identified in Europe before was detected and belonged to the H1N2 subtype.

Continued surveillance is necessary for detection of new or newly introduced genotypes that may pose a potential public health risk and therefore their persistence in pigs should be monitored closely.

## **INTRODUZIONE**

L'influenza suina è una infezione respiratoria causata da virus appartenenti ai sottotipi H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1 pandemico. Tali sottotipi sono ulteriormente classificati in base al lineaggio genetico del gene dell'emoagglutinina (HA). Si identificano in tal modo virus Euroasian avian-like H1N1, human-like H1N2 e H1N1 di lineaggio pandemico. Un importante studio condotto dal consorzio Europeo "European Surveillance Network of 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 genetica univoca per i virus influenzali suini circolanti in Europa. Tale classificazione, indipendentemente dal sottotipo 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) appare predominante in Italia, o il genotipo D (human-like H1N2) principalmente circolante in Danimarca.

Nel presente lavoro sono stati isolati e caratterizzati geneticamente 14 virus influenzali suini identificati attraverso sorveglianza passiva tra il 2013 e il 2016 nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia Giulia. I virus sono stati identificati in 7 diversi allevamenti distribuiti su un totale di 9 comuni e 4 provincie confinanti per le due regioni. Si riportano i dati dell'analisi filogenetica, tenendo conto della recente classificazione genetica, mostrano una alta diversità genetica e la circolazione di molteplici genotipi nelle due regioni oggetto di studio.

La caratterizzazione genetica ed eventualmente quella antigenica dei virus influenzali suini, consente di identificare i virus principalmente circolanti e di migliorare le attività di sorveglianza e controllo di questa importante infezione respiratoria.

## **MATERIALI E METODI**

A seguito di sintomatologia respiratoria sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, tamponi nasali di animali sintomatici. Per un singolo caso, a seguito di necropsia è stato inviato un polmone. I tamponi o organi sono stati processati mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo A, diretta verso il gene della proteina di matrice (M) (Hoffman et al., 2010). I campioni positivi sono stati tipizzati per identificare il gene HA e della neuraminidasi (NA) con una multiplex RT-PCR (Chiapponi et al., 2012). Tutti i campioni positivi mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo sono stati isolati mediante isolamento virale in colture cellulari.

I tamponi nasali sono stati stemperati in 2 ml di MEM (Sigma), contenente 0,5% di Albumina bovina e HEPES buffer e 1% di antibiotici e lasciati a 37°C overnight. Una aliquota è stata utilizzata per l'estrazione di RNA virale mediante kit commerciale (High Pure RNA Isolation Kit, Roche), e la rimanente parte è stata utilizzata per l'isolamento virale utilizzando un monostrato confluyente al 75% di cellule MDCK-SIAT trattate con l'1% di tripsina TPCK (WHO, 2002).

I virus isolati sono stati nuovamente caratterizzati mediante RT-PCR come sopra descritto e il loro intero 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 Best-fit general time reversible (GTR) per descrivere il tasso di sostituzione nucleotidica tra i siti con una distribuzione gamma dello stesso (con 4 gradi di variazione  $G_4$ ) e l'algoritmo SPR sviluppato in PhyML (Guindon e Gascuel, 2003). La robustezza di ogni nodo dell'albero filogenetico è stata stabilita con valore bootstrap di 100 repliche.

## RISULTATI

In totale sono stati identificati i seguenti virus: 2 virus appartenenti al lineage pandemico A(H1N1)pdm09, 5 virus human-like H1N2 (H1<sub>hu</sub>N2), 5 virus avian-like H1N2 (H1<sub>av</sub>N2), 1 avian-like H1N1 (H1<sub>av</sub>N1) and 1 H3N2.

I 14 virus identificati appartengono a 6 differenti genotipi in base alla classificazione di Watson (Watson et al., 2015). Più precisamente i genotipi identificati, sono A, B, D, F, P e un genotipo, denominato "novel", non identificato precedentemente (Beato et al., 2016). Il genotipo P identifica i due virus di lineage interamente pandemico H1N1. I virus pandemici sono stati identificati in Friuli nel 2014 e in Veneto nel 2016.

Il genotipo F e Novel posseggono la stessa HA (Human-like) e sono entrambi virus di sierotipo H1N2. I virus del genotipo A e D, posseggono la stessa HA (avian-like) ma NA differenti, rispettivamente N1 e N2. Il virus di genotipo B invece appartiene al sierotipo H3N2.

Due virus del genotipo F human-like H1N2, sono stati identificati in Veneto nelle province di Verona nel 2015. Cinque virus appartenenti al genotipo D, sono stati identificati dal 2013 al 2015 nelle province di Padova, Treviso e Pordenone. L'unico virus del genotipo A, avian-like H1N1 (H1<sub>av</sub>N1) è stato identificato nella provincia di Udine nel 2014. Il genotipo B, H3N2, è stato identificato nella provincia di Padova nel 2014. Il genotipo Novel avian-like H1N2 (H1<sub>av</sub>N2) è stato invece identificato in una sola provincia nel 2013 e 2014. Questo genotipo si distingue dal genotipo F in quanto ha acquisito il gene M da virus pandemici, ed è l'unico genotipo non appartenente al lineage pandemico, tra quelli identificati nel quale si è osservato questo tipo di riassortimento.

## DISCUSSIONI

La presenza del genotipo F in Italia è stata già descritta sin dal 2003 (Moreno et al., 2013; Watson et al., 2015), e i dati generati confermano che tale genotipo continua a circolare nel nostro Paese, sebbene nel periodo di studio la sua presenza sia stata identificata nelle province di Verona e Padova.

Molteplici invece sono state le identificazioni del genotipo D, avian-like H1N2 (H1<sub>av</sub>N2), ovvero in 3 province Padova, Pordenone e Treviso nel 2013, 2015 e 2016. La circolazione del genotipo D è stata principalmente segnalata in Danimarca (Watson et al., 2015). Le relazioni commerciali nel settore suinicolo tra Italia e Danimarca potrebbero far ipotizzare una introduzione del genotipo attraverso questa modalità, ma non è possibile stabilire se i casi individuati siano nuove introduzioni o se il genotipo D è stato introdotto precedentemente nel Nord-Est Italia e solo ora identificato e quindi segnalato.

Il genotipo Novel, fino ad ora è stato segnalato solo in Italia e la sua circolazione è stata identificata in un solo allevamento a ciclo aperto nella provincia di Treviso tra il 2013 e 2014. Tale genotipo ha una interessante caratteristica ovvero quella di aver acquisito il gene M dal virus pandemico A(H1N1)pdm09. Tale simile fenomeno è stato anche osservato per i genotipi M e N rispettivamente H1<sub>av</sub>N1 e H3N2 (Watson et al. 2015), in China (genotipo) (Sw/HK/NS2378/12-like) (Liang et al. 2014), ma anche in America identificato come H3N2 variante (A(H3N2)v) in grado di infettare l'uomo (Wong et al. 2012; Nelson et al. 2012, Kitikoon et al. 2012).

L'acquisizione del gene M è stata associata inoltre ad una aumentata capacità di trasmissione dei virus influenzali suini in furetto (Lakdawala et al. 2011) e criceto (Chou et al. 2011).

## CONCLUSIONI

Lo studio del genoma completo dei virus influenzali suini identificati tramite sorveglianza passiva in Nord-Est Italia tra il 2013 e il 2016 ha permesso di generare dei dati preliminari sui genotipi circolanti. La diversità di genotipo identificati (6) dimostra la variabilità dei virus influenzali e la necessità di una continua sorveglianza e caratterizzazione. Mancanti sono ancora i dati sulle caratteristiche antigeniche di tali virus e sulle correlazioni antigeniche tra questi e i vaccini disponibili. Inoltre sono assenti dati sulla virulenza di questi genotipi e sulla diversa capacità di trasmissione degli stessi.

Una sorveglianza attiva con campionamenti longitudinali intra allevamento consentirebbe sicuramente di acquisire maggiori dati che consentirebbero di formulare ipotesi più precise sulla dinamica di introduzione, infezione e riassortimento e in particolar modo consentirebbero di mappare in maniera più precisa la circolazione dei genotipi.

La sorveglianza delle sindromi respiratorie nel suino è di primaria importanza al fine di identificare la circolazione di virus con potenziale zoonosico o con caratteristiche tali.

## BIBLIOGRAFIA

- Chiapponi C., Moreno A., Barbieri I., Merenda M., Foni E., (2012) “Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2”. *J Virol Methods* 184, 117-120.
- Chou Y.Y., Albrecht R.A., Pica N., Lowen A.C., Richt J.A., Garcia-Sastre A., Palese P., Hai R., (2011) “The M segment of the 2009 new pandemic H1N1 influenza virus is critical for its high transmission efficiency in the guinea pig model”. *J Virol* 85, 11235-11241.
- Guindon S., Gascuel O., (2003) “A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood”. *Syst Biol* 52, 696-704.
- 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.
- Liang H., Lam T.T., Fan X., Chen X., Zeng Y., Zhou J., Duan L., Tse M., Chan C.H., Li L., Leung T.Y., Yip C.H., Cheung C.L., Zhou B., Smith D.K., Poon L.L., Peiris M., Guan Y., Zhu H., (2014) “Expansion of genotypic diversity and establishment of 2009 H1N1 pandemic-origin internal genes in pigs in China”. *J Virol* 88, 10864-10874.
- 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.
- Wong K.K., Greenbaum A., Moll M.E., Lando J., Moore E.L., Ganatra R., Biggerstaff M., Lam E., Smith E.E., Storms A.D., Miller J.R., Dato V., Nalluswami K., Nambiar A., Silvestri S.A., Lute J.R., Ostroff S., Hancock K., Branch A., Trock, S.C., Klimov A., Shu B., Brammer L., Epperson S., Finelli L., Jhung, M.A. (2012) "Outbreak of influenza A (H3N2) variant virus infection among attendees of an agricultural fair, Pennsylvania, USA, 2011". *Emerg Infect Dis* 18, 1937-1944.