

# STUDIO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS INFLUENZALE TIPO A, B, C E D NEGLI ALLEVAMENTI SUINI NEL NORD ITALIA. CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS CIRCOLANTI NEGLI ANNI 2016-2018.

## ***STUDY ON THE CIRCULATION OF INFLUENZA VIRUS TYPE A, B, C AND D IN PIG FARMS IN NORTHERN ITALY. CHARACTERIZATION OF CIRCULATING VIRUSES IN THE YEARS 2016-2018***

CHIAPPONI C.<sup>1</sup>, PROSPERI A.<sup>1</sup>, FACCINI S.<sup>1</sup>, MORENO A.<sup>1</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>, MERENDA M.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, AMORICO A.<sup>2</sup>, BAIONI L.<sup>1</sup>, ZANNI I.<sup>1</sup>, MANFREDI R.<sup>1</sup>, GABBI V.<sup>1</sup>, FONI E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;* <sup>2</sup>*Veterinaria Gruppo Martini s.p.a.*

**Parole chiave:** Virus influenza tipo A e D

**Key words:** Influenza A and D virus

### **RIASSUNTO**

Lo studio si è proposto di indagare attraverso metodiche biomolecolari la circolazione di virus influenzali IAV, IBV, ICV e IDV negli allevamenti suini del Nord-Italia (2016-2018), al fine di poter meglio comprendere l'epidemiologia di queste infezioni nei suini. Per quanto riguarda IBV e ICV, non è stata riscontrata circolazione di questi due tipi influenzali nonostante l'elevato numero dei campioni esaminati (n. 4960). Nell'ambito della sorveglianza attiva virologica su 28 allevamenti è stata riscontrata positività per IDV in una azienda (3,5%), mentre il monitoraggio sierologico ha evidenziato positività in 3/13 siti. Dai campioni diagnostici conferiti in corso di affezioni respiratorie si è osservata positività per IDV su 8 delle 595 aziende esaminate (1,3%). La sorveglianza attiva per IAV nei suini ha dato esito positivo nel 28,5% degli allevamenti, mentre nell'ambito dell'attività diagnostica la percentuale di positività registrata è stata del 31,9%. Tra i IAV sequenziati sono stati evidenziati 14 genotipi diversi. I dati raccolti in questo studio dimostrano una bassa prevalenza di IDV nelle aziende esaminate, dimostrando che la scarsa capacità diffusiva dell'infezione. Per quanto riguarda IAV invece lo studio ne conferma l'importanza nell'insorgenza delle forme respiratorie del suino, con una marcata circolazione endemica nella popolazione. Infine lo studio filogenetico dei ceppi di IAV ha evidenziato eventi di riassortimento che sono correlabili a introduzioni in Italia di IAV dal Nord-Europa.

### **ABSTRACT**

The aim of the study has been to investigate the circulation of influenza A, B, C and D virus (IAV, IBV, ICV and IDV) among pig herds in Northern Italy (2016-2018) using biomolecular techniques, in order to better understand the epidemiology of these infections in the Italian swine population.

IBV and ICV circulation was not observed despite the high number of the examined samples (n.4960). The active surveillance on 28 herds showed the IDV circulation only in one farm (3.5%), while 3/13 herds resulted serologically positive. Diagnostic samples collected in cases of respiratory disease were found positive for IDV in 8 of the 595 herds examined (1.3%). IAV was detected in 28.5% of herds (8 out of 28) during active surveillance, while

diagnostic activity on respiratory disease affected herds showed positivity for IAV in 306 of the 959 examined herds (31.9%). Among the sequenced IAVs, 14 different genotypes were detected. The data collected in this study allow us to consider a low positivity for IDV in the swine population, showing the poor diffusive abilities of the infection. Regarding IAV the study confirms its importance in the porcine respiratory disease complex, showing also a marked endemic circulation in the swine population. The phylogenetic study of the IAV detected in the study highlighted reassortment events, which track swine IAV introductions from North-Europe to Italy.

## INTRODUZIONE

I virus influenzali A, B and C (IAV, IBV, ICV) appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae* e sono responsabili di affezioni respiratorie nell'uomo. IAVs sono in grado di infettare anche varie specie di mammiferi e le specie aviarie. IBV è considerato un agente stagionale di infezioni nell'uomo in similitudine con IAV, mentre ICV causa lievi infezioni respiratorie delle prime vie aeree. Recentemente è stato dimostrato che IBV è in grado anche di infettare sia suini che mammiferi acquatici. ICV è stato isolato da suino in Cina ed è risultato geneticamente correlato a ICV umano (7, 25), e ne è stata dimostrata anche la trasmissibilità fra uomo e suino (11). Nel 2011 in Oklahoma un *Orthomyxovirus* riferibile a ICV (*C/swine/Oklahoma/1334/2011*) (*C/OK*) è stato isolato da suini affetti da forma respiratoria (9). Studi successivi hanno dimostrato la presenza e la circolazione di virus *C/OK-like* anche in bovini in USA, Cina e Francia (5, 8), e analisi genetiche hanno dimostrato che le particelle virali *C/OK-like* sono geneticamente distinte da ICV di origine umana, codificando un nuovo genere nell'ambito della famiglia *Orthomyxoviridae*, il virus influenza D (IDV). Recentemente una indagine esplorativa sulla circolazione di questo supposto nuovo genere in un limitato numero di campioni diagnostici (tamponi e polmoni) da suini e bovini (150 per specie), ha messo in evidenza la presenza di IDV negli allevamenti italiani, geneticamente simile allo stipite di riferimento *C/swine/Oklahoma/1334/2011*. Anche allargando le ricerche a livello internazionale si può affermare che poche e frammentarie sono le informazioni sulla origine e sulla circolazione di questo virus nella popolazione suina. Inoltre, a fronte di una ampia disponibilità di dati epidemiologici nei confronti di IAV nella specie suina in Italia, nulle sono le conoscenze sulla eventuale circolazione nell'ambito di questa specie di altri virus influenzali come IBV e ICV. L'influenza suina è annoverata tra le patologie che compongono il complesso delle patologie respiratorie del suino (PRDC), ed è considerata causa di perdite economiche per l'allevamento suino. 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 (12, 20, 26). 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 emagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) (3). 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 (*shift*) dovuto allo scambio di geni tra due o più virus influenzali, anche originati da specie diverse (2). 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 (22). 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 (24). Quest'ultimo presenta infatti i geni interni derivanti da H1avN1 ma ha 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 (16), ed è andato man mano soppiantando il virus H1N2 di tipo europeo, che invece mostrava una NA di un virus influenzale circolante nei suini nel Regno Unito molti anni prima della stabilizzazione del sottotipo H3N2 avvenuta negli anni '80 (13, 27). A partire dal 2009 si è osservata anche la circolazione del sottotipo A(H1N1)pdm09 (17) e di numerose tipologie di riassortanti di questo stipite con i sottotipi endemici in Europa (4, 24). Studi recenti hanno messo in evidenza la frequente introduzione di virus di origine umana in popolazioni suine negli Stati Uniti e in Brasile (1, 18, 19). Vista l'alta variabilità dei virus influenzali di tipo A è importante monitorare la circolazione dei virus influenzali fra specie diverse e la possibilità di trasmissione di questi virus tra animali e uomo e viceversa.

## MATERIALI E METODI

**Campionamento.** Nel periodo 2016-2018 sono stati raccolti 4960 campioni (tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare) da suini appartenenti a 959 allevamenti delle Regioni Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, affetti da forme cliniche respiratorie.

Nello stesso periodo, nell'ambito del programma previsto dall'attività di sorveglianza attiva, sono stati monitorati con cadenza quadrimestrale 28 allevamenti delle Regioni Lombardia ed Emilia Romagna. Per questa attività di monitoraggio sono stati campionati, mediante tampone nasale, quattro diverse tipologie produttive: scrofe, suinetti sottoscrofa, svezzati e magroni, per un totale di 503 campioni. Sempre nell'ambito della sorveglianza attiva campioni di sangue appartenenti a 173 scrofe sono stati prelevati in 13 allevamenti.

**Test molecolari e virologici.** Specifici *primers* di sequenziamento sono stati disegnati per mettere a punto e/o migliorare i test diagnostici in PCR per la rilevazione di IBV, ICV, IDV da campioni clinici animali. Al fine di potere amplificare più virus influenzali a partire da RNA estratto da matrici biologiche, la metodica di rilevazione di IDV in real-time PCR descritta da Faccini *et al* 2017 (6) è stata modificata e implementata. Sono stati selezionati ulteriori combinazioni di *primers* e sonde in grado di rilevare in modo specifico ICV e IBV (14, 23) come *multiplex Reverse transcriptase real-time PCR*.

I campioni biologici di origine suina (tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare), provenienti da sorveglianza sia attiva che passiva, sono stati quindi testati per la presenza di IDV, IBV, ICV con la metodica sopra descritta e per IAV come descritto in precedenza (4). I campioni risultati positivi (IAV e IDV) sono stati inoculati su colture cellulari ai fini dell'isolamento virale. Una selezione di campioni positivi è stata sottoposta a sequenziamento dell'intero genoma con tecnica NGS Illumina (4). In breve, l'intero genoma è stato analizzato suddiviso nei singoli 8 segmenti genetici per IAV e 7 segmenti per IDV. Il lineaggio di ciascun segmento è stato determinato mediante analisi in Blast verso i virus influenzali IAV e IDV presenti in GenBank. I vari genotipi di IAV scaturiti dalla diversa combinazione di geni sono stati numerati progressivamente così come descritto in precedenza (4, 21) e sono state eseguite analisi filogenetiche (15).

**Indagine sierologica.** Nell'ambito delle attività previste da sorveglianza attiva per IDV i campioni di sangue sono stati esaminati per la ricerca di anticorpi nei confronti di virus Influenza D con tecnica HI (8).

## RISULTATI

**Indagine virologica.** I risultati della sorveglianza virologica attiva e passiva sono riportati in Tabella 1. E' stata riscontrata positività per IDV in una soltanto delle 28 aziende esaminate nell'ambito dei prelievi di sorveglianza attiva (3,5%), mentre nei campioni diagnostici conferiti per accertamenti in corso di affezioni respiratorie in allevamento si è osservata positività su 8 delle 595 aziende esaminate (1,3%). Le prove di isolamento su colture cellulari, a partire dai campioni risultati positivi in PCR per IDV, hanno permesso l'isolamento di 4 ceppi di IDV, due dei quali sono stati sequenziati completamente. Dal punto di vista filogenetico questi virus risultano correlati a IDV isolati da bovino sul nostro territorio, delineando quello che può essere considerato un cluster genetico a sé stante.

Per quanto riguarda gli altri tipi influenzali oggetto dell'indagine, a fronte di un totale di 4960 campioni suini esaminati, non è stata rilevata alcuna positività nei confronti di IBV e ICV, mentre la sorveglianza attiva ha messo in evidenza la presenza di IAV nel 28,5% degli allevamenti oggetto di indagine (8 aziende positive su 28), mentre quella passiva ha evidenziato una positività del 31,9% (306 aziende positive su 959) (Tabella 1). L'incidenza dei vari sottotipi ottenuta sia con la sorveglianza attiva che quella passiva, è riportata in Tabella 1.

Una selezione di 157 campioni positivi appartenenti ai vari sottotipi di IAV sono stati sottoposti ad analisi genetica, che ha permesso, in base al lineaggio di appartenenza di ciascun segmento genico, di classificare in 14 genotipi diversi i virus IAV circolanti negli allevamenti suini del Nord Italia. L'analisi delle combinazioni dei segmenti genici rilevate è stata riassunta nella Figura 1.

I ceppi H3N2 si confermano il sottotipo più conservato ed inoltre non è stato possibile evidenziare eventi di riassortimento genetico con altri sottotipi.

Anche fra i ceppi del sottotipo H1N1 non sono stati evidenziati ceppi riassortanti nel 2017, mentre nel 2018 è stato rilevato solo un ceppo con gene M derivato dal virus A(H1N1)pdm09. Tuttavia è stato possibile osservare la circolazione di stipiti con segmenti genici simili a quelli circolanti in Nord Europa, evidentemente introdotti con la movimentazione di animali e in aumento come presenza sul territorio italiano.

Il sottotipo H1N2 si è rivelato il più variabile e complesso come combinazione di geni con più del 50% dei ceppi appartenenti ad un genotipo riassortante, che si discosta dal classico genotipo italiano che ha circolato fino circa al 2010. Solo grazie al sequenziamento integrale del genoma è stato possibile evidenziare segmenti di origine A(H1N1)pdm09 come geni interni di sottotipi H1N2. L'utilizzo di virus di riferimento, isolati da varie nazioni europee e non, per la costruzione di alberi filogenetici ha permesso di visualizzare un flusso di geni che rispecchia la localizzazione geografica. All'interno di questi gruppi sono stati posizionati i geni codificanti per le emoagglutinine dei sottotipi H1N1 e H1N2 appartenenti ai virus italiani suini dello studio (Figure 2a e 2b).

**Analisi sierologiche.** Nell'ambito della sorveglianza attiva sono stati esaminati i sieri di scrofe per IDV tramite metodo di inibizione dell'emoagglutinazione. Solo 3 allevamenti dei 13 monitorati hanno presentato soggetti con anticorpi nei confronti di IDV, e complessivamente i sieri con reattività erano 5/173 (2,8%), inoltre tali positivi presentavano titoli anticorpali molto bassi (1:20 e 1:40).

**Tabella 1.** Risultati della sorveglianza virologica attiva e passiva per IAV e IDV in campioni suini. Sono riportate le percentuali di circolazione di ciascun sottotipo virale IAV. **Table 1.** Summary of results of active and passive virological surveillance for IAV, and IDV in swine farms. Percentages of circulation of each IAV subtype are shown.

SORVEGLIANZA	AZIENDE ESAMINATE	AZIENDE POSITIVE	POSITIVITA'	%	%	%	%	%	%
			per aziende %	H1N1	H1N2	H3N2	H3N1	H1N1 PDM09	Non tipizzati
ATTIVA IAV	28	8	28,5	17,6	58,8	11,8	0,0	5,9	5,9
PASSIVA IAV	959	306	31,9	29,5	29,0	13,6	0,3	2,2	25,3
ATTIVA IDV	28	1	3,5	/	/	/	/	/	/
PASSIVA IDV	595	8	1,3	/	/	/	/	/	/

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le numerose analisi eseguite nel corso dello studio permettono di affermare una assenza di circolazione di virus IBV e ICV negli allevamenti suini italiani. In realtà, se il dato non ci stupisce per quanto riguarda ICV, vista la scarsa circolazione anche nell'uomo, ci si sarebbe potuto aspettare un qualche riscontro di positività per IBV, visto la discreta percentuale di casi accertati nell'uomo nelle ultime 4 stagioni influenzali (17%), come riportato dall'Istituto Superiore di Sanità. Per quanto riguarda invece l'infezione da IDV i dati raccolti in questo studio ci permettono di considerare che negli allevamenti suini se pur presente (positività nell'1,4% delle 623 aziende esaminate), rappresenta una infezione con scarse capacità diffusive: 12 campioni positivi su 4960 esaminati (0,2%). Uno studio simile condotto nello stesso periodo in Germania ci fornisce dati ulteriormente contenuti per quanto riguarda IDV, 1 solo campione positivo su 4033 esaminati, mentre per IBV sono state osservate due positività sullo stesso numero di casi esaminati, soltanto con prove biomolecolari, senza possibilità di isolamento virale (10). Per quanto invece riguarda IAV lo studio conferma invece la pesante incidenza del virus influenzale nell'insorgenza delle forme respiratorie del suino: 31,9% di positività delle aziende esaminate (n.959). Tuttavia questo valore si abbassa di poco (28,5%) qualora si vada a testare per la circolazione di IAV periodicamente, in questo caso 3 volte/anno, gli allevamenti, indipendentemente dalla presenza o meno di forme respiratorie. E questo anche se il numero di osservazioni è alquanto ridotto: 84 ingressi in allevamento (n. 28). Questa osservazione conferma la circolazione endemica di virus influenzale nella popolazione suina senza che si presentino forme cliniche apprezzabili. In particolare modo è interessante notare la maggiore circolazione di sottotipo H1N2, che è stato rilevato nel 58,8% dei casi positivi (Tabella 1). Per quanto riguarda l'incidenza dei vari sottotipi da forme respiratorie, si è osservato che il 29% è rappresentato da H1N2, il 29,5% da H1N1, il 13,6% da H3N2 e il 2,2% da A(H1N1)pdm09 (Tabella 1). Il 25% circa dei positivi IAV è risultato non tipizzabile tramite metodica PCR Multiplex e per l'approfondimento del genotipo si è ricorso alla sequenza del genoma totale.

Gli aspetti però più interessanti dell'epidemiologia di IAV nei nostri allevamenti suini scaturiscono dall'analisi genetica eseguita su 157 stipiti selezionati. Infatti gli stipiti appartenenti ai tre sottotipi sono stati a loro volta ascritti a ben 14 genotipi diversi, in base all'attribuzione dei lineaggi per ciascun segmento genico considerato (Figura 1). Si osserva la stessa incidenza di H1N1 e H1N2 nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva. Per quanto riguarda gli H1N1 (genotipo 1) si è osservata una consistente circolazione di stipiti di origine Nord Europea, con geni simili a quelli di virus segnalati ad esempio in Olanda (Figura 2a).

La variabilità genetica più accentuata si osserva nell'ambito del sottotipo H1N2 per il quale

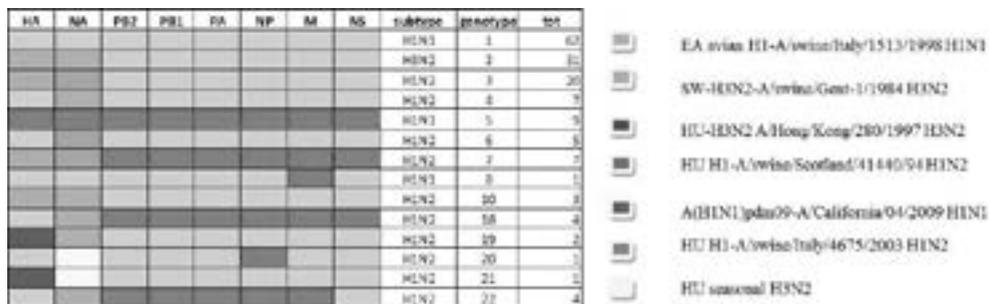
sono stati riscontrati 10 diversi genotipi (Figura 1). Si conferma presente sul territorio l'H1N2 genotipo 3, già descritto in passato, con HA derivata dal ceppo A/swine/Italy/4675/2003. A questo virus tuttavia si affiancano dei sempre maggiori genotipi riassortanti, sia di origine italiana (13% con il genotipo 7) sia di origine europea (7,4% con il genotipo 18 e 7,4% con il genotipo 22), con emoagglutinina di origine aviare e geni interni di origine A(H1N1)pdm09 (Figura 1, 2b).

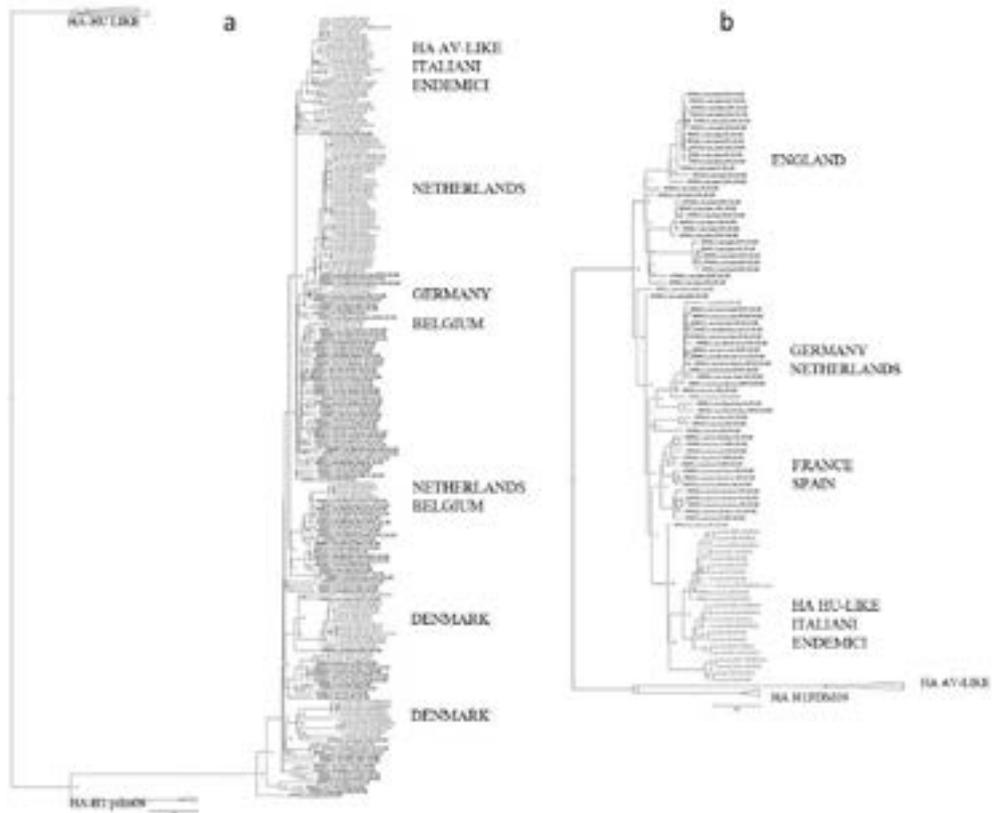
Questi dati confermano studi precedenti sulla presenza di stipiti riassortanti con virus Nord Europei (4), dimostrandone la crescente incidenza. Tale riscontro trova ragione nell'aumentata introduzione in Italia di suini vivi da altri paesi Europei negli ultimi tre anni: mentre è rimasta invariata l'introduzione in Italia dai maggiori produttori e fornitori di suini, quali Olanda e Danimarca, è aumentato di circa il 50% l'import da Spagna, Francia e Croazia, del 67% dalla Germania e addirittura dalla Polonia il valore delle importazioni di suini vivi è quadruplicato (fonte: <http://www.intracen.org/>).

Ancora una volta la circolazione di virus influenzali nel suino dimostra una elevata variabilità e frequenza di riassortimenti, che sono in grado di generare repentinamente stipiti geneticamente e antigenicamente nuovi per la popolazione suina così come per la popolazione umana. Alla luce dell'importanza dei virus influenzali nella PRDC del suino ed in ragione del loro potenziale zoonosico, conoscere e tracciare questa variabilità è alla base di una sorveglianza epidemiologica efficiente. Inoltre tale variabilità può limitare l'efficacia degli strumenti diagnostici routinari, nel caso in cui questi non siano opportunamente rivisti ed aggiornati, sfruttando le informazioni ottenute dalla sorveglianza attiva e passiva svolta sul nostro territorio nazionale.

**Figura 1.** Genotipi di IAV rilevati mediante sequenziamento NGS di 157 virus appartenenti ai tre sottotipi influenzali H1N1, H1N2, H3N2. I colori indicano il lineaggio attribuito al segmento genico considerato e le diverse combinazioni di geni rilevate nei virus sequenziati sono state nominate con numerazione progressiva.

**Figure 1.** IAV genotypes detected by NGS sequencing of 157 viruses (H1N1, H1N2, H3N2). Different lineages of genetic segments are described by different colors and their combinations are differentiated by numbering.





**Figura 2.** Albero filogenetico del gene codificante per HA, sottotipo H1 dei virus IAV sequenziati nel periodo 2016-2018 confrontati con virus italiani ed europei. a) particolare relativo al ramo H1 avian-like. b) particolare relativo al ramo H1 human-like. In rosso sono riportate le sequenze italiane. In blu virus di riferimento.

**Figure 2.** Phylogenetic tree of the gene encoding for HA, subtype H1, of the IAVs sequenced in the period 2016-2018 compared with Italian and European viruses. a) detail related to the avian-like H1 branch. b) detail related to the human-like H1 branch. The Italian sequences are shown in red whilst reference viruses are in blue.

**RINGRAZIAMENTI.** Lo studio è stato in parte finanziato da Ricerca Corrente Ministero della Salute PRC2015006

## BIBLIOGRAFIA

1. Bowman A.S., Nelson S.W., Page S.L., Nolting J.M., Killian M.L., Sreevatsan S., et al. (2014) Swine-to-human transmission of influenza A(H3N2) virus at agricultural fairs, Ohio, USA, 2012. *Emerg Infect Dis* Sep;20(9):1472-80.
2. Brown I.H. (2013) History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr Top Microbiol Immunol*;370:133-46.
3. Cheung T.K., Poon L.L. (2007) Biology of influenza A virus. *Ann NY Acad Sci* Apr;1102:1-25.
4. Chiapponi C., Ebranati E., Pariani E., Faccini S., Luppi A., Baioni L., et al. (2017) Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy

- during 2010-2015 Zoonoses Public Health.
5. Ducatez M.F., Pelletier C., Meyer G. (2015) Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. *Emerg Infect Dis* Feb;21(2):368-71.
  6. Faccini S., De Mattia A., Chiapponi C., Barbieri I., Boniotti M.B., Rosignoli C., et al. (2017) Development and evaluation of a new Real-Time RT-PCR assay for detection of proposed influenza D virus *J Virol Methods*. ;243:31-4.
  7. Guo Y.J., Jin F.G., Wang P., Wang M., Zhu J.M. (1983) Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol* Jan;64 (Pt 1)(Pt 1):177-82.
  8. Hause B.M., Collin E.A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., et al. (2014) Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* Mar 4;5(2):e00031-14.
  9. Hause B.M., Ducatez M., Collin E.A., Ran Z., Liu R., Sheng Z., et al. (2013) Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog* Feb;9(2):e1003176.
  10. Henritzi D., Hoffmann B., Wacheck S., Pesch S., Herrler G., Beer M., et al. (2018) A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. *Influenza Other Respir Viruses* Sep 28.
  11. Kimura H., Abiko C., Peng G., Muraki Y., Sugawara K., Hongo S., et al. (1997) Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs. *Virus Res* Apr;48(1):71-9.
  12. 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* Aug;56(6-7):310-25.
  13. Marozin S., Gregory V., Cameron K., Bennett M., Valette M., Aymard M., et al. (2002) Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol* Apr;83(Pt 4):735-45.
  14. Matsuzaki Y., Ikeda T., Abiko C., Aoki Y., Mizuta K., Shimotai Y., et al. (2012) Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts *J Clin Virol*. ;54(2):130-4.
  15. Minh B.Q., Nguyen M.A., von Haeseler A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* May;30(5):1188-95.
  16. Moreno A., Chiapponi C., Boniotti M.B., Sozzi E., Foni E., Barbieri I., et al. (2012) Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet Microbiol* May 4;156(3-4):265-76.
  17. Moreno A., Di Trani L., Alborali L., Vaccari G., Barbieri I., Falcone E., et al. (2010) First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol J* May 5;4:52-6.
  18. Nelson M.I., Stratton J., Killian M.L., Janas-Martindale A., Vincent A.L. (2015) Continual Reintroduction of Human Pandemic H1N1 Influenza A Viruses into Swine in the United States, 2009 to 2014. *J Virol* Jun;89(12):6218-26.
  19. Nelson M.I., Wentworth D.E., Das S.R., Sreevatsan S., Killian M.L., Nolting J.M., et al. (2016) Evolutionary Dynamics of Influenza A Viruses in US Exhibition Swine. *J Infect Dis* Jan 15;213(2):173-82.
  20. Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., Van Reeth K. (2006) Swine influenza ;*Straw BE*,.
  21. 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* Oct;28(10):2731-9.
  22. Vincent A., Awada L., Brown I., Chen H., Claes F., Dauphin G., et al. (2014) Review

- of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* Feb;61(1):4-17.
23. Ward C.L., Dempsey M.H., Ring C.J., Kempson R.E., Zhang L., Gor D., et al. (2004) Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement *J Clin Virol.* ;29(3):179-88.
  24. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T., Cotten M., Kelly M., et al. (2015) Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol* Oct;89(19):9920-31.
  25. Yuanji G., Desselberger U. (1984) Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol* Nov;65 ( Pt 11)(Pt 11):1857-72.
  26. 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.
  27. Zell R., Scholtissek C., Ludwig S. (2013) Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. *Swine Influenza*;370:29-55.