

| | | | |
|---|---|---------------------------------|---|
| Codice del progetto: IZS LER2018009RC | Titolo del progetto | Responsabile scientifico | Parole chiave |
| Data di avvio: 20/12/2018 | Studio qualitativo e quantitativo sulla evoluzione della variabilità antigenica di virus influenzali suini ed umani circolanti in Italia. | Dr.ssa Chiara Chiapponi | Virus influenza A, suino, caratterizzazione |

ABSTRACT

I virus influenzali di tipo A (IAV) infettano milioni di persone e animali ogni anno e occasionalmente causano pandemie nell'uomo. L'infezione da IAV nel suino ha importanti ripercussioni sanitarie ed economiche nella filiera produttiva di questa specie, che inoltre svolge un ruolo importante nell'ecologia del virus essendo suscettibile di infezione a IAV aviari ed umani, favorendo il riassortimento e la genesi di virus potenzialmente zoonotici. Il sistema immunitario può neutralizzare i virus influenzali riconoscendo gli antigeni di superficie del virus, emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA). L'immunità neutralizzante di IAV, sia nell'uomo che nei suini, è in gran parte diretta verso l'antigene HA che evolve per sfuggire al sistema immunitario. L'accumulo di piccole variazioni/mutazioni può comportare cambiamenti nell'HA tali che le infezioni precedenti o i vaccini possono non fornire più protezione contro il nuovo virus. Uno studio recente effettuato da noi su 104 IAV suini isolati in Nord Italia, ha messo in evidenza, oltre alla circolazione dei 4 sottotipi endemici H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1pdm09, la circolazione di numerosi genotipi riassortanti nei quali è ricorrente la presenza di geni H1N1pdm09. Approfondire le conoscenze sulle dinamiche di trasmissione dei virus influenzali tipo A e la circolazione di questi all'interno delle popolazioni animali appare fondamentale per delineare e proporre strategie efficaci per il rilevamento tempestivo di stipiti emergenti e potenzialmente zoonotici. Utilizzando la reattività crociata sierologica in saggi di inibizione dell'emoagglutinazione è possibile valutare la distanza antigenica fra diversi stipiti ed è possibile eseguire studi di mappatura cartografica. La messa a punto di reagenti e metodiche che permettano una sistematica attività di caratterizzazione antigenica degli isolati, rappresenta un punto critico per tenere sotto controllo la corrispondenza dei presidi vaccinali agli stipiti circolanti. Al di là delle informazioni genetiche rese disponibili in questi ultimi anni grazie alla metodiche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), poco è stato sinora fatto in termini di caratterizzazione antigenica di IAV suini ed umani italiani, né tantomeno questi dati sono stati elaborati in senso quantitativo e spaziale utilizzando metodi di mappatura cartografica. Questo studio si propone di approfondire la conoscenza della variabilità genetica ed antigenica recente ed attuale dei virus influenzali suini circolanti sul territorio italiano; costruire mappe antigeniche comprensive di stipiti suini ed umani per valutare la reattività crociata fra virus circolanti nei suini e virus stagionali umani ed individuare varianti antigenicamente significative; valutare la necessità di aggiornare metodiche e/o reagenti per la diagnostica virologica e sierologica di IAV suini.

- Anderson et Al. T (2016).A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses *mSphere* 1:Dec.
- Chiapponi, C. et Al (2017).Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy during 2010-2015 *Zoonoses Public. Health*.
- Lewis NS et Al. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses *Elife*. 2016;5.

STATO ATTUALE DEL PROGETTO

Metodologia

I campioni clinici suini pervenuti per accertamenti diagnostici nel corso dell'anno 2019 e risultati positivi per IAV con test molecolari (RT-PCR) per gene M sono stati sottoposti a preliminare tipizzazione mediante RT-PCR e ad isolamento virale. Al fine di ottenere un dato rappresentativo di una situazione aggiornata, sono state condotte analisi di sequenziamento del genoma completo tramite tecniche NGS su una selezione di campioni positivi pervenuti nel 2019 analizzati insieme a virus caratterizzati recentemente a partire dal 2017, per un totale di 590 campioni. L'analisi genetica del genoma è stata eseguita per ciascuno degli 8 segmenti genetici virali e ogni lineaggio è stato determinato mediante analisi in Blast verso i virus influenzali suini (swIAV) presenti in GenBank, per un totale di 291 virus. Le sequenze geniche dei virus 2019 sono state allineate con le sequenze presenti nel database IZSLER dal 2017 per influenza suina e con sequenze di riferimento presenti in Genbank. Gli alberi filogenetici dei segmenti genici sono stati ottenuti con metodo maximum-likelihood (ML). L'analisi dei virus H1 è stata effettuata utilizzando inoltre la nomenclatura descritta in precedenza dal link online fludb.org. Sulla base dei dati di tipizzazione presenti nel database IZSLER è stato predisposto un elenco di virus H1N1 e H1N2, suini da utilizzare per la produzione di sieri iperimmuni in pollo con cui si eseguiranno prove di caratterizzazione tramite inibizione dell'emoagglutinazione di isolati virali suini ed umani. I dati saranno utilizzati per generare mappe di cartografia antigenica di isolati italiani.

Risultati parziali

I dati fino ad oggi raccolti riguardano la variabilità genetica dei virus swIAV circolanti in Italia. La tipizzazione in RT-PCR multiplex ha evidenziato che il sottotipo H1N2 è stato quello maggiormente rilevato, con una percentuale del 36%, seguito dal sottotipo H1N1 (28%), da H3N2 (9,6%) e H1N1pdm09 nel 2% dei casi. Un 24% di campioni positivi è risultato non tipizzabile. L'analisi genetica dei 291 virus selezionati ha messo in evidenza che gli stipiti appartenenti ai tre sottotipi sono stati a loro volta ascritti a ben 18 genotipi diversi. I dati di sequenziamento hanno permesso di osservare che per i virus H1N1 circolano emoagglutinine di tre cluster genetici diversi e definiti, sulla base del progenitore genetico. Per i geni codificanti per neuraminidasi sono stati individuati due cluster. Inoltre, le diverse combinazioni di geni interni di origine *av-like* e pdm09 hanno dato origine ai 5 genotipi diversi riscontrati per H1N1. La variabilità genetica più accentuata si osserva nell'ambito del sottotipo H1N2, con la presenza di 11 genotipi diversi ottenuti da differenti combinazioni di: tre lineaggi di geni per emoagglutinina, due neuraminidasi e due di geni interni. Per il sottotipo H3N2 infine si è rilevata la circolazione di un solo tipo di emoagglutinina di origine suina, di un solo tipo di neuraminidasi N2 ed i geni interni di origine aviare. (Relazione intermedia presentata con nota Prot 2761 del 10.02.2020)