

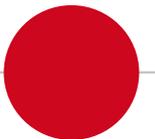
Nuovi genotipi dell'influenza suina in Italia 2013-2017

MARIA SERENA BEATO

LABORATORIO DI SIEROLOGIA E MALATTIE PIANIFICATE –SCT3

LABORATORIO DI VIROLOGIA DIAGNOSTICA – SCT3

MANTOVA, 1 MARZO 2019

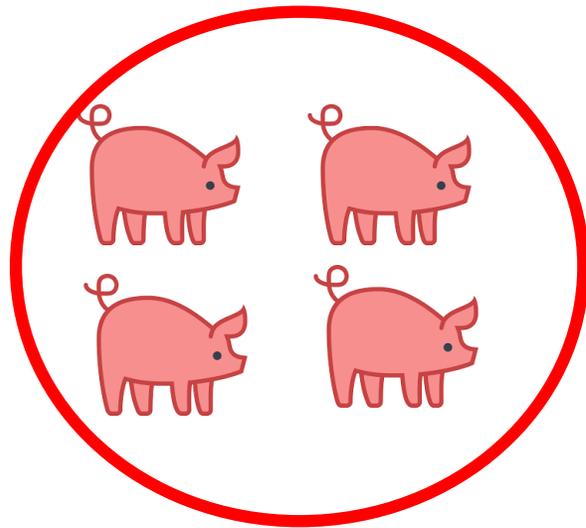
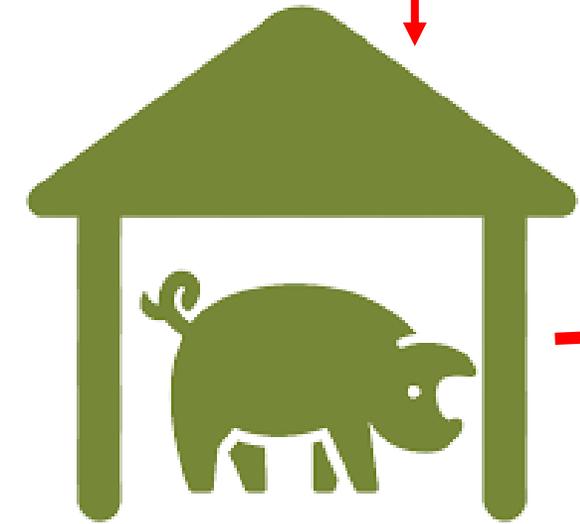


● La nostra storia.....

Period	Number of herds investigated	Number of Influenza A positive cases
2014	0	0
2015	21	4
2016	26	6
2017	51	19
2018	65	15
2014-2018	163	44

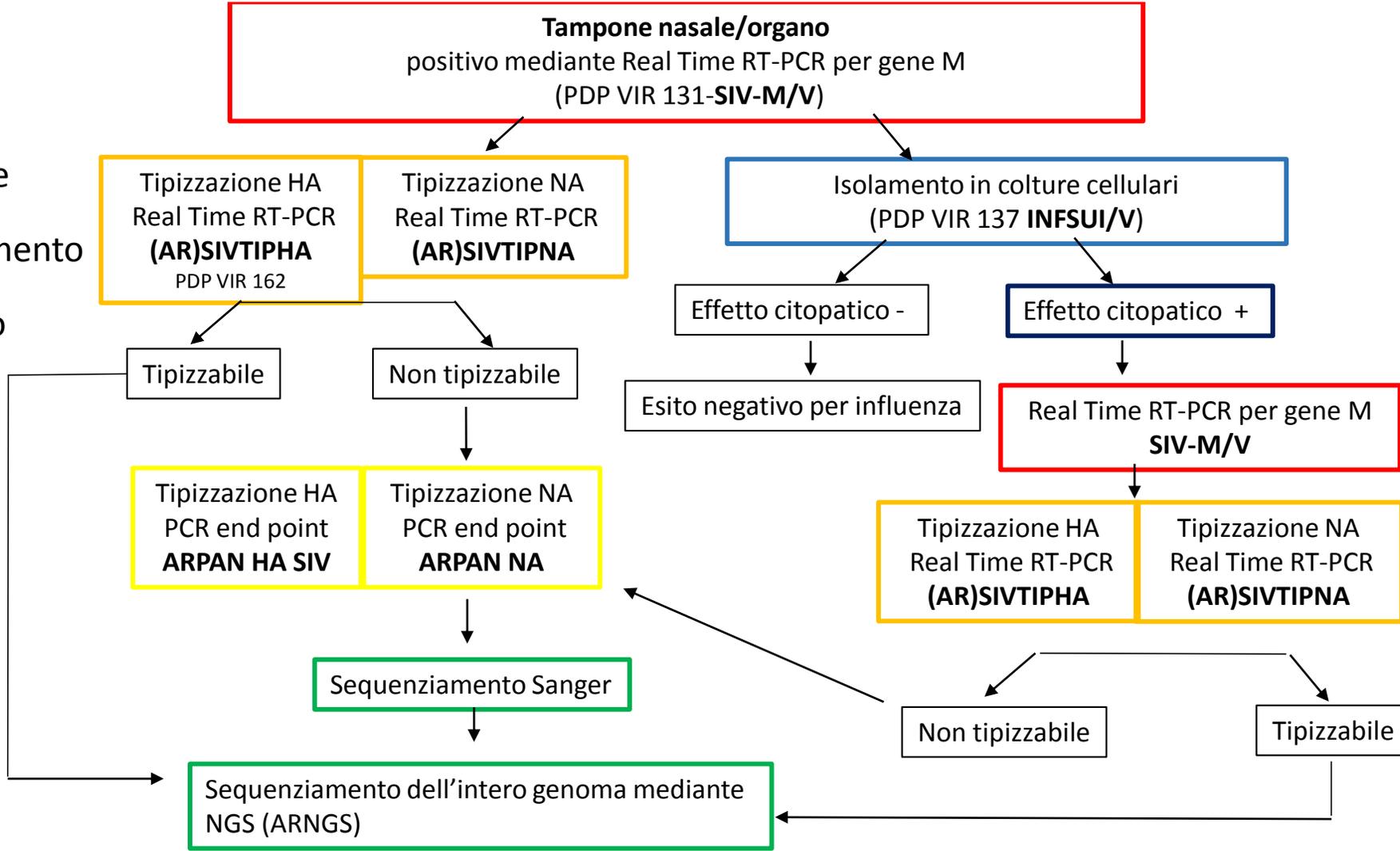
OFFLU: OIE AND FAO NETWORK ON ANIMAL INFLUENZA

INFO EPI, CAMPIONAMENTO E DIAGNOSI



● Algoritmo diagnostico

- Screening
- Tipizzazione
- Sequenziamento
- Isolamento



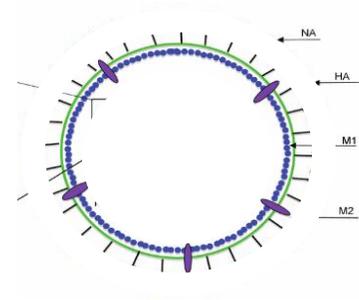
DIAGNOSTICA

RICERCA

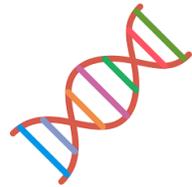
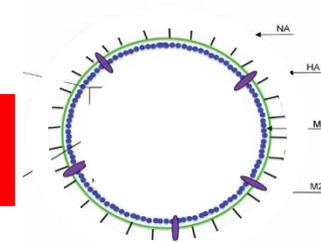
Algoritmo diagnostico



Campione diagnostico



Virus coltivato



 Screening

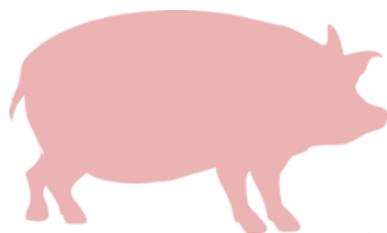
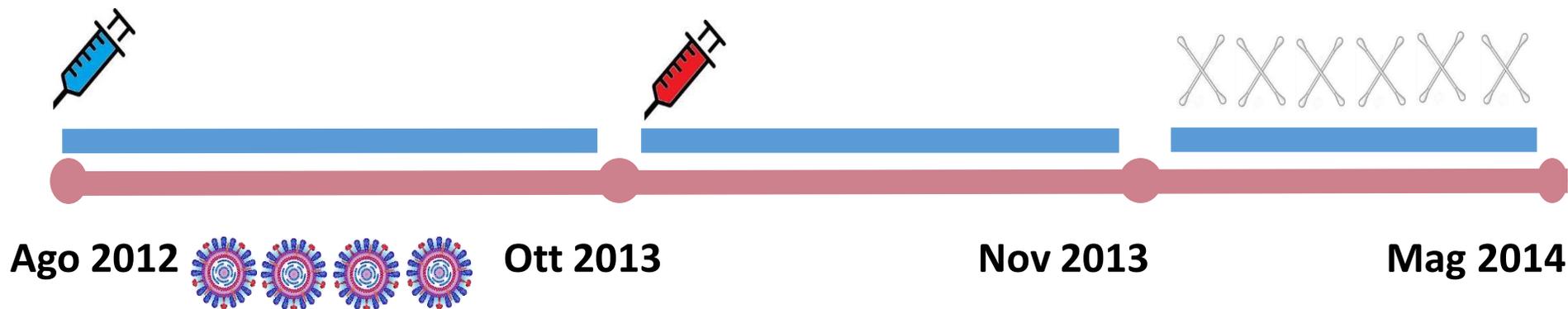
 Tipizzazione

 Sequenziamento

 Isolamento



«Caso Rivolo»



Vaccinazione con Gripovac



Sintomatologia respiratoria



Vaccinazione contro H1N1pdm



Campionamenti – tamponi nasali

Genotipi e riassortanti caratterizzati in 2 mesi nell'azienda Rivolo

ID campione	Data	PB2	PB1	PA	NP	MP	NS	HA	NA	Genotipo	Riassortante
9529-1	18-11-2013	EA	EA	EA	EA	A(H1N1) pdm09	EA	Scot/94	Italy/03	Novel	V1
9529-70	18-11-2013	EA	EA	EA	EA	A(H1N1) pdm09	EA	Scot/94	Italy/03	Novel	V2
11546-62	27-12-2013	EA	EA	EA	EA	EA	EA	Scot/94	Italy/03	F	
11546-65	27-12-2013	EA	EA	EA	EA	EA	EA	Scot/94	Italy/03	F	
50064-2	08-01-2014	EA	EA	EA	EA	A(H1N1) pdm09	EA	Scot/94	Italy/03	Novel	V3
50064-3	08-01-2014	EA	EA	EA	EA	A(H1N1) pdm09	EA	Scot/94	Italy/03	Novel	V3
50206-21	29-01-2014	EA	EA	EA	EA	EA	EA	Scot/94	Italy/03	F	
50206-28	29-01-2014	EA	EA	EA	EA	A(H1N1) pdm09	EA	Scot/94	Italy/03	Novel	V3

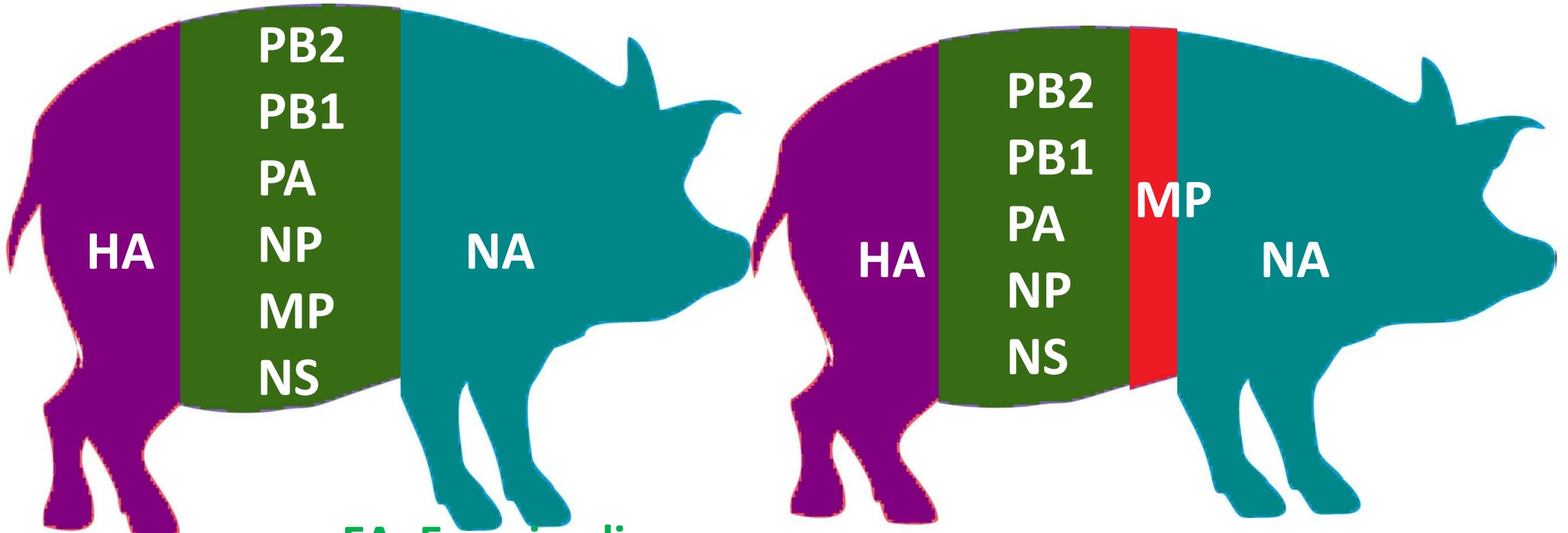
EA: Eurasian lineage (avH1)

Scot/94: A/swine/Scotland/410440/1994 (huH1)

Italy/03: A/swine/Italy/4675/2003 (N2)

Pdm: pandemic lineage (H1pdm)

● Genotipo F vs Novel o «X»



EA: Eurasian lineage

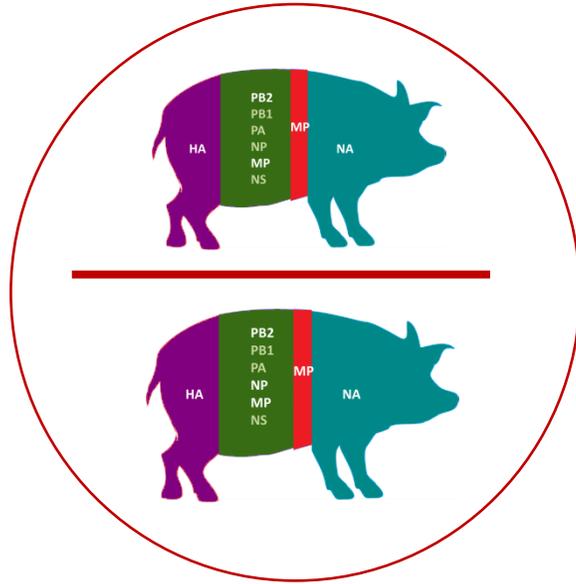
Scot/94: A/swine/Scotland/410440/1994 (H1)

Italy/03: A/swine/Italy/4675/2003 (N2)

Pdm: pandemic lineage

Genotipi e riassortanti caratterizzati in 2 mesi nell'azienda Rivolo

Novel o X – V1



Novel o X – V2

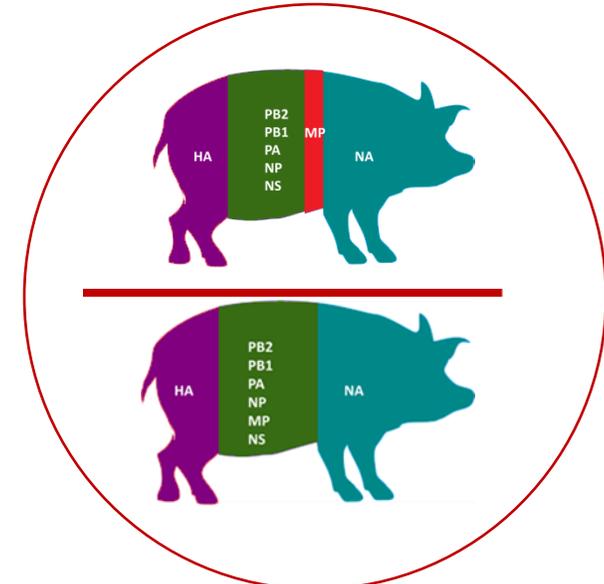


Nov 2013

Dic 2013

Gen 2014

Novel o X – V3



Genotipo F

Genotipo F

EA: Eurasian lineage

Scot/94: A/swine/Scotland/410440/1994 (H1)

Italy/03: A/swine/Italy/4675/2003 (N2)

Pdm: pandemic lineage

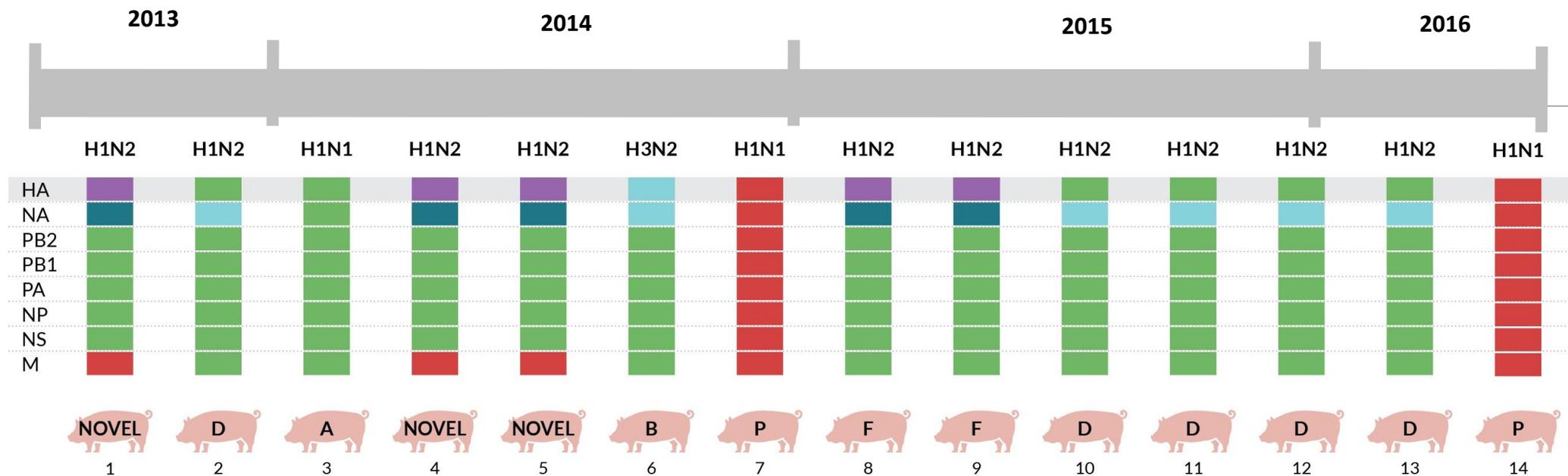
Quanto è diffuso il genotipo F e il Novel?



	Internal segments						External segments		Isolates analysed	
	PB2	PB1	PA	NP	MP	NS	HA	NA	Count	Percentage
A	■	■	■	■	■	■	■	■	85	29
B	■	■	■	■	■	■	■	■	38	13
C	■	■	■	■	■	■	■	■	26	9
D	■	■	■	■	■	■	■	■	13	5
E	■	■	■	■	■	■	■	■	11	4
F	■	■	■	■	■	■	■	■	8	3
G	■	■	■	■	■	■	■	■	5	2
H	■	■	■	■	■	■	■	■	3	1
I	■	■	■	■	■	■	■	■	2	<1
J	■	■	■	■	■	■	■	■	2	<1
K	■	■	■	■	■	■	■	■	2	<1
L	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
M	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
N	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
O	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
P	■	■	■	■	■	■	■	■	35	12
Q	■	■	■	■	■	■	■	■	22	8
R	■	■	■	■	■	■	■	■	13	5
S	■	■	■	■	■	■	■	■	3	1
T	■	■	■	■	■	■	■	■	2	<1
U	■	■	■	■	■	■	■	■	2	<1
V	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
W	■	■	■	■	■	■	■	■	1	<1
Undetermined									12	4
Total samples									290	100



Genotipi e riassortanti 2013-2016



6 Genotipi: A, B, D, F, P, NOVEL

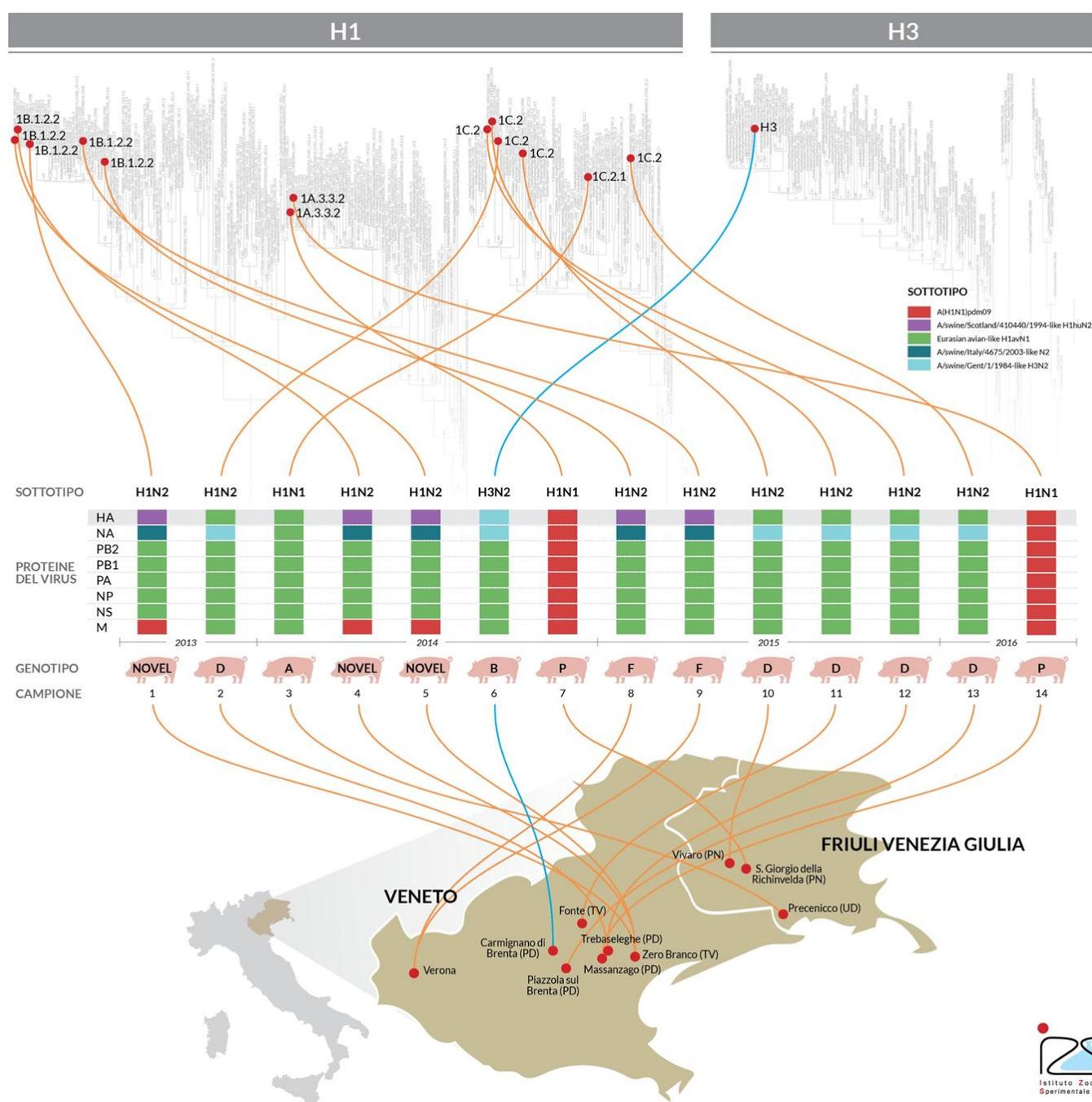
avH1N1 (A),
H3N2 (B),
avH1N2 (D),
huH1N2 (F),
H1N1p (P),
huH1N2 (NOVEL)

- A/swine/Scotland/410440/1994-like H1_uN2
- A(H1N1)pdm09
- Human seasonal-like N2
- A/swine/Gent/1/1984-like H3N2
- Eurasian avian-like H1_uN1
- A/swine/Italy/4675/2003-like N2

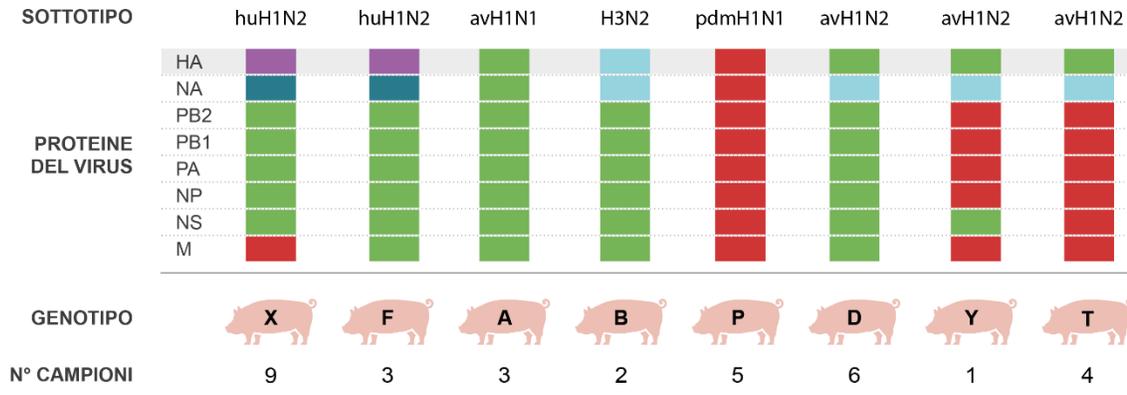


Classificazione H1 (Anderson et al., 2016)

avH1: 1C
huH1: 1B
H1pdm: 1A

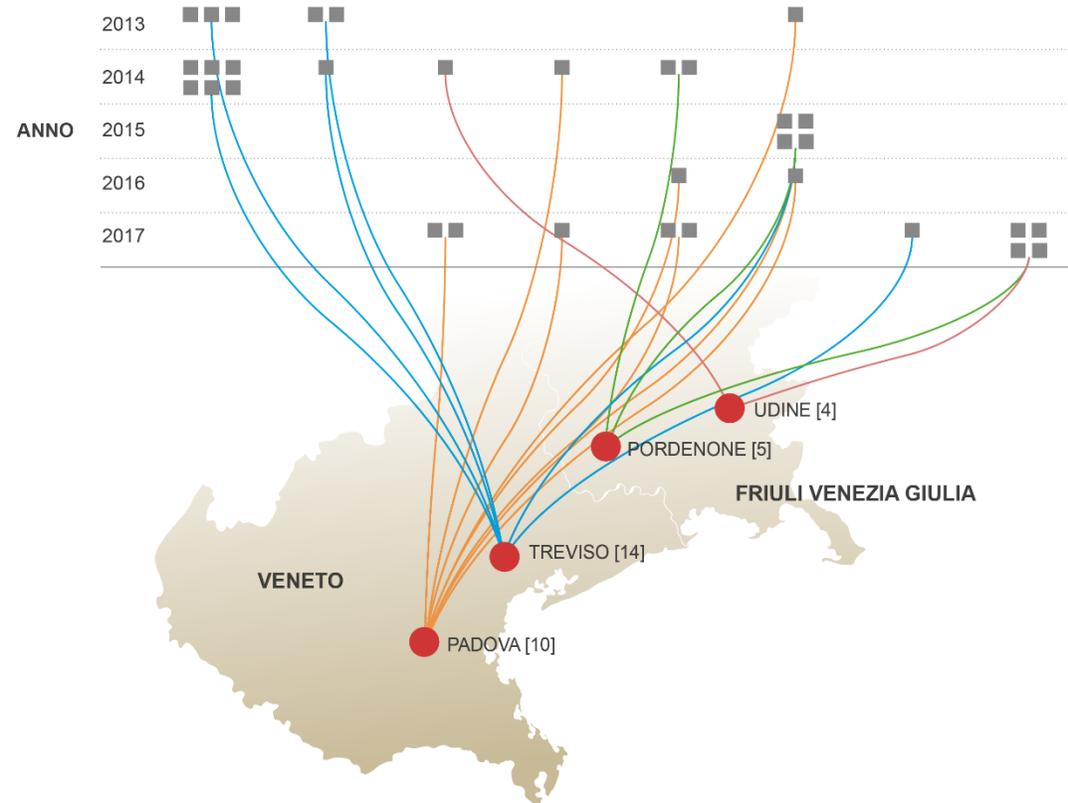


Genotipi influenza suina circolanti in Veneto e Friuli Venezia Giulia 2013-2017

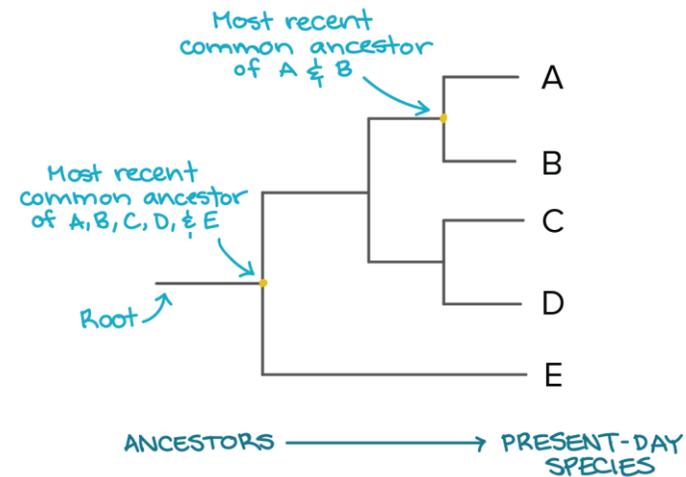
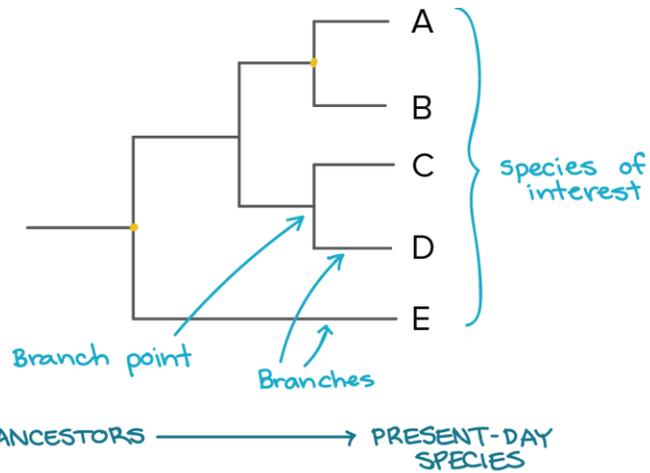
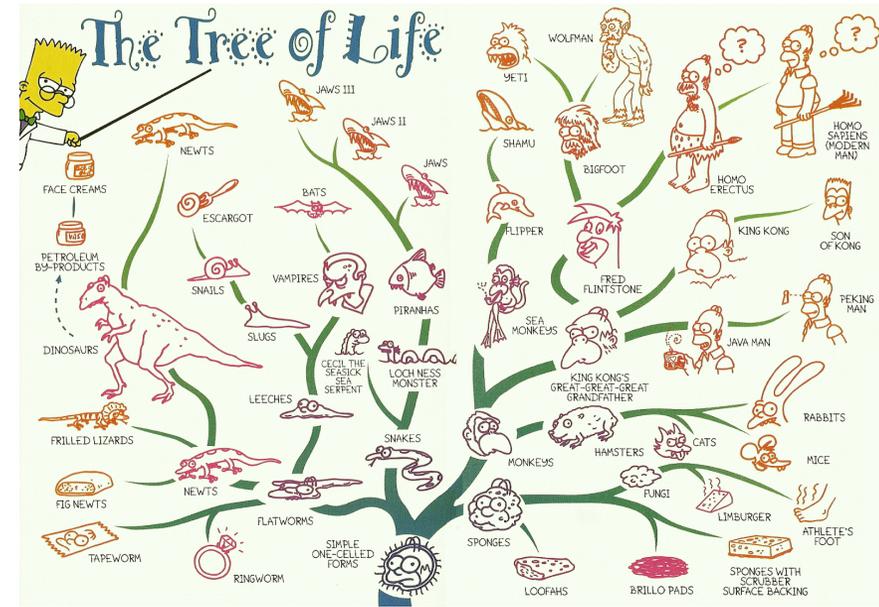


Nel 2017 identificati 2 nuovi genotipi

Y e T



Un po' di filogenesi.....chi è il padre?



Hu H1 - 1B

2011-2016

2013-2016

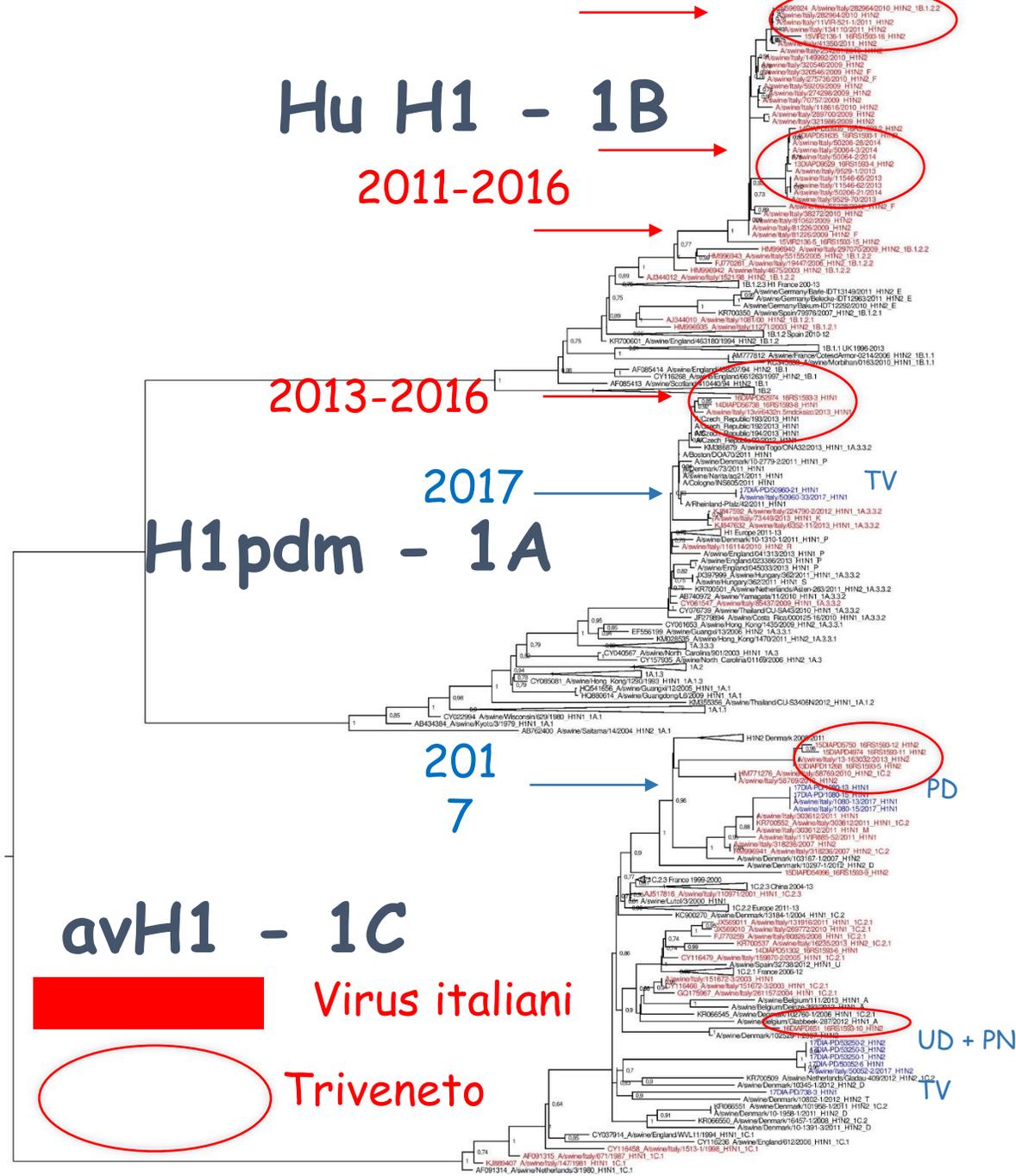
2017

H1pdm - 1A

avH1 - 1C

Virus italiani

Triveneto

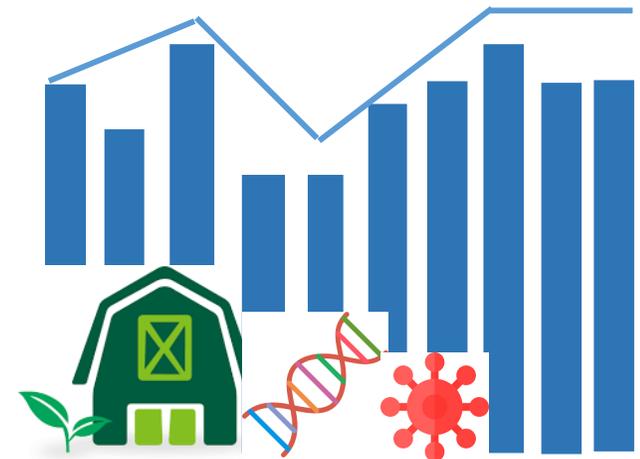
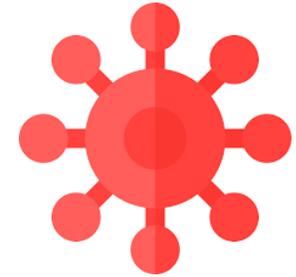




Cosa non sappiamo

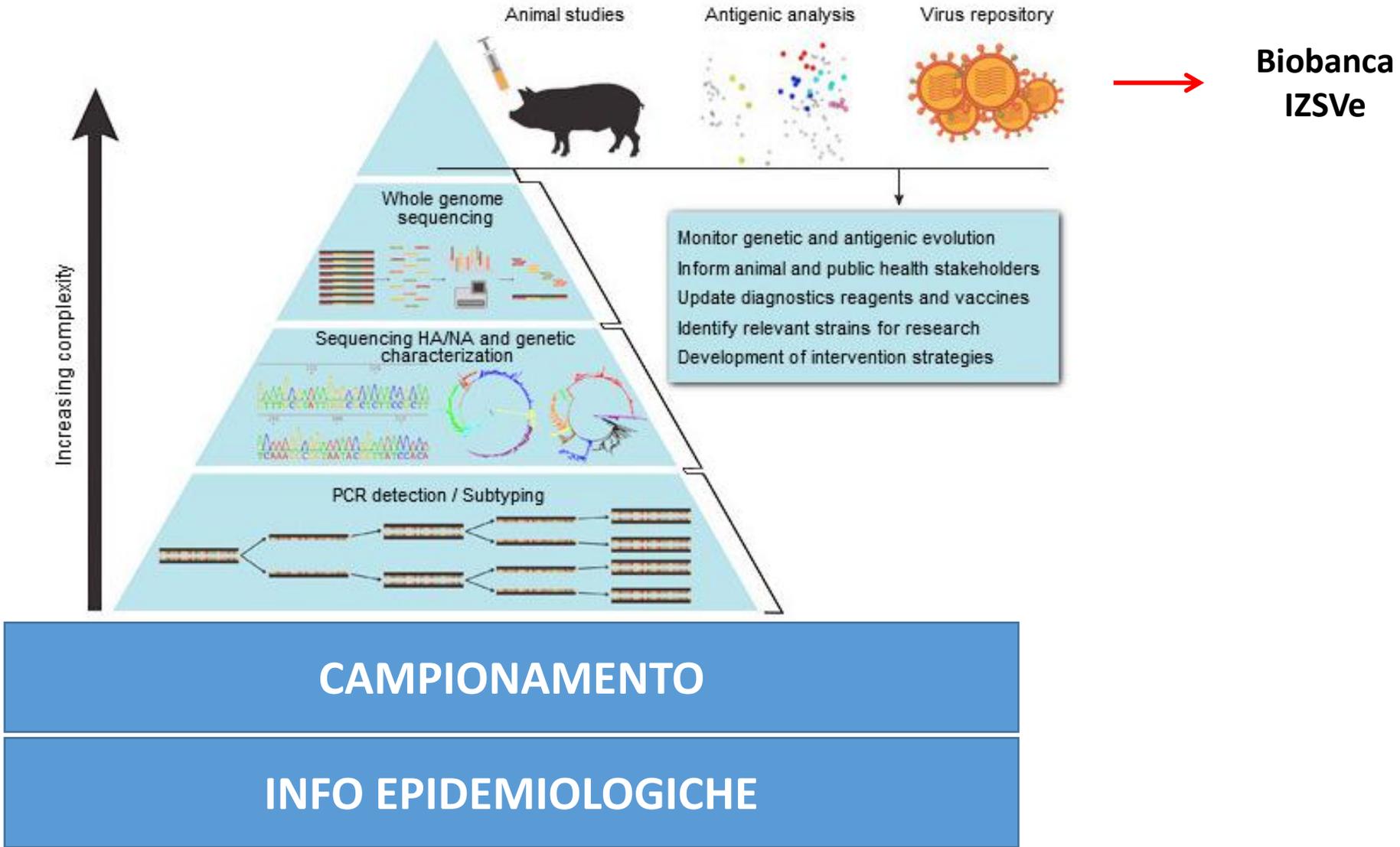


- Quale è la patogenicità dei nuovi genotipi?
- Quali sono le caratteristiche antigeniche dei genotipi identificati?
- Quanti e quali altri genotipi «nuovi» stanno circolando?
- Quale copertura vaccinale esiste nei confronti dei nuovi genotipi?
- Quali sono le relazioni tra genotipo e altri fattori come tipologia di allevamento e flussi?
- Quale è la vera diffusione dei genotipi identificati?



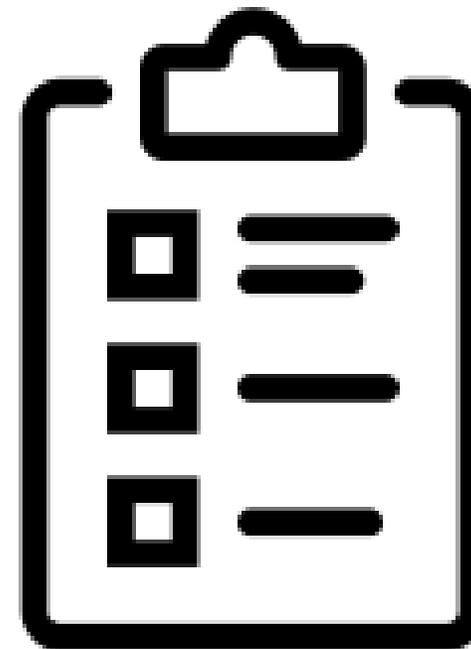


«SURVEILLANCE PYRAMID»

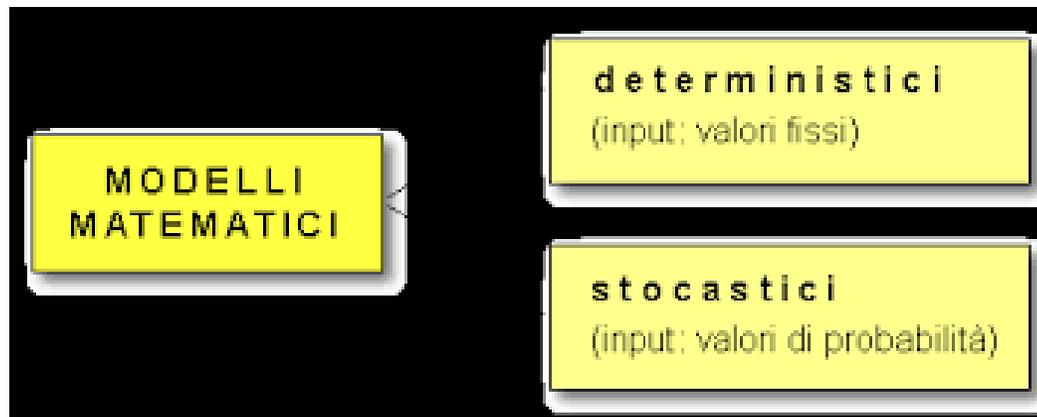
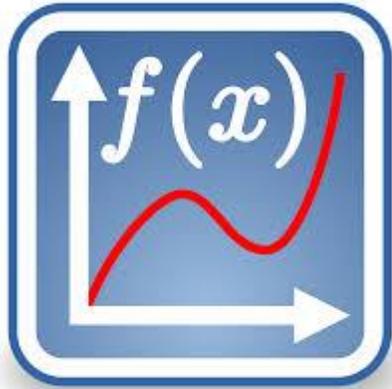


● CAMPIONAMENTO E INFO EPIDEMIOLOGICHE

- Numero di tamponi: non vi è un numero stabilito, consigliabile **circa 20**
- Animali sintomatici
- Categoria colpita
- Vaccinati sì, no da quanto con cosa?
- Nuove introduzioni?
- Da dove?
- Movimentazioni in azienda?
- Contatti con altre aziende?



● Dinamica dell'infezione: Modelli vs evidenze di campo



● Dinamica dell'infezione

- **CATEGORIA SUSCETTIBILE:** Suinetti senza anticorpi alla nascita
- Movimentazione
- Isolamento
- Introduzione
- Dimensioni di allevamento
- Stato vaccinale delle scrofe

Scrofette residenti da meno di 4 settimane e suinetti (<21 giorni) hanno una maggiore probabilità di infettarsi (Diaz et al., 2015)



● Cosa dicono i modelli?

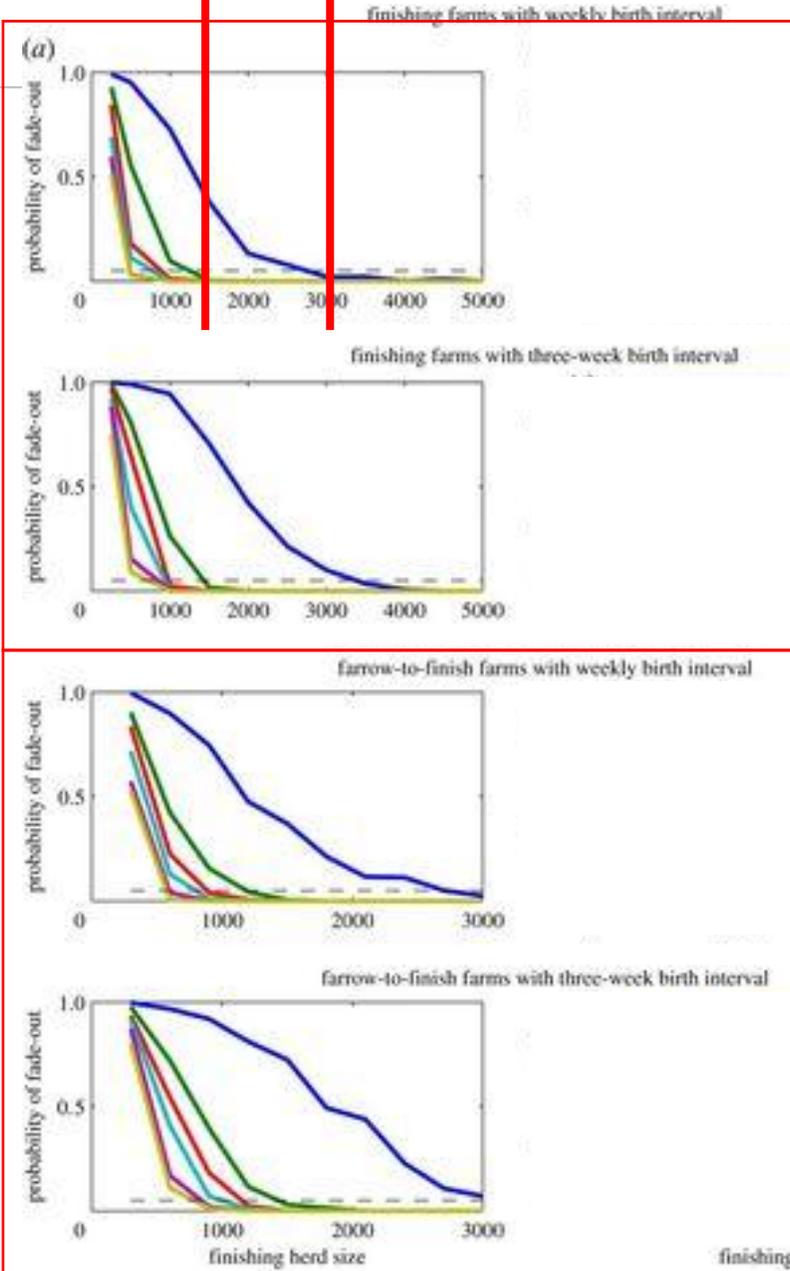
- Ruolo della vaccinazione omologa vs eterologa: Modello deterministico di Reynolds (2014)
- Più alta la probabilità che l'infezione persista in allevamenti da riproduzione (scrofette e suinetti) con almeno 250 scrofe
- La vaccinazione è una componente delle strategie di controllo
- Vaccinazione omologa efficace in scrofe e scrofette ma non per i suinetti

● CRITICAL COMMUNITY SIZE

Quanto grande deve essere un allevamento affinché l'influenza persista?
La prevalenza varia in base alle dimensioni dell'allevamento?

M-S-I-R
MDA protected- Suscetible-Infected-Recovered

- Farrow to finish
- Finishing farms – sito 3
- Finishing farm sito 2 e 3



FINISSAGGIO

- Dimensione critica di 3000 suini contribuisce a mantenere l'infezione
- La persistenza aumenta se gli animali sono sieronegativi
- Alto turnover di suinetti: ruolo chiave per l'endemizzazione
- L'infezione è più persistente in finissaggio rispetto a farrow to finish (ciclo chiuso)
- Quando c'è persistenza in finissaggio, la prevalenza è inferiore al 6% con un picco alla fine del periodo, ovvero campionatura di 45 animali!
- Aumento dell'intervallo tra i parti o introduzione di animali nel finissaggio può diminuire la persistenza

FARROW TO FINISH

● Cosa dicono i modelli?

Quali sono le strategie (interventi) che possono diminuire l'incidenza di Influenza nei suinetti?

STRATEGIE:

- Biosicurezza
- Gestione
- vaccinazione

INTERVENTI:

1. Momento di introduzione delle scrofette
2. Isolamento delle scrofette
3. Vaccinazione delle scrofette pre-introduzione
4. Svezamento precoce
5. Vaccinazione: pre-parto o di massa, eterologa vs omologa

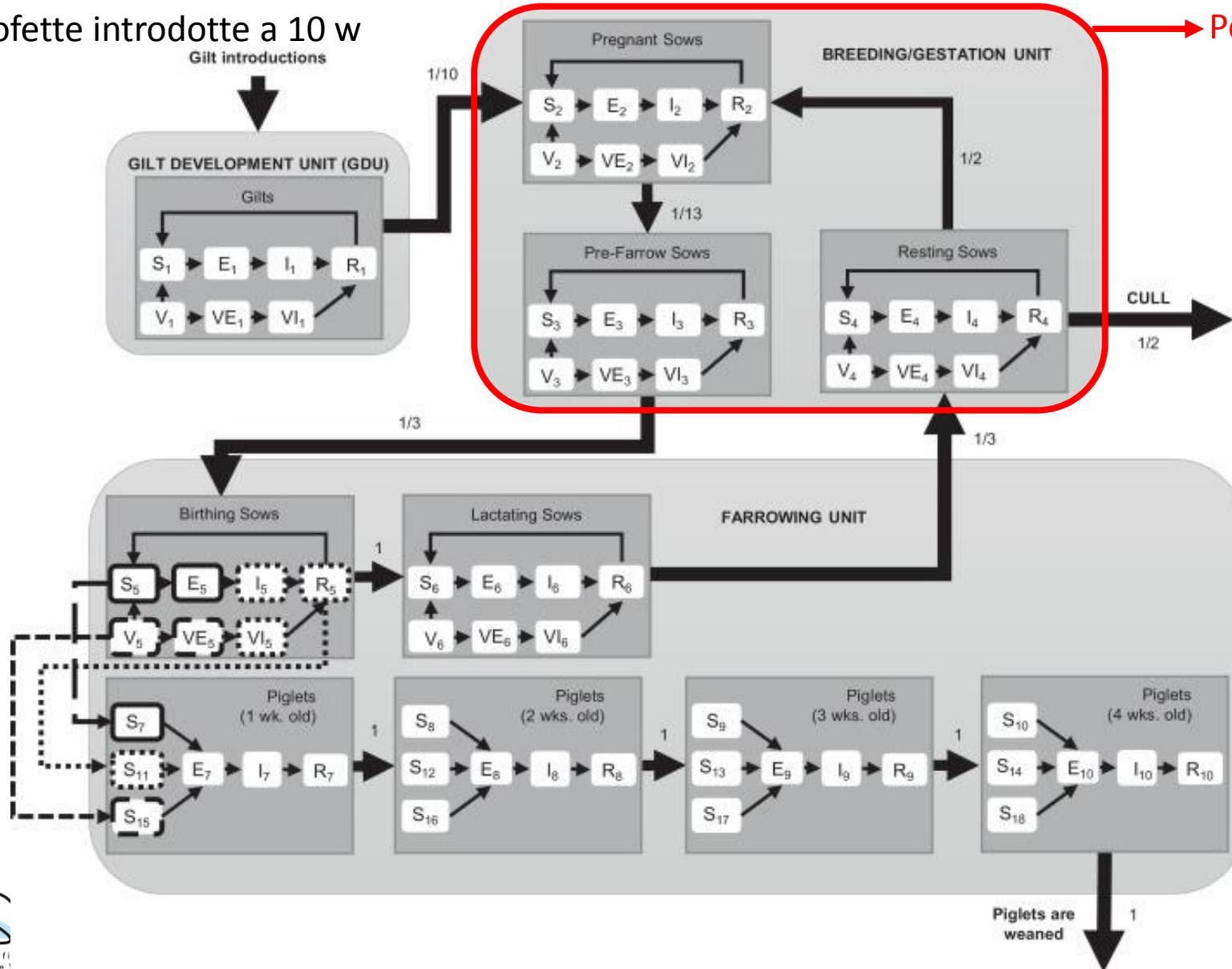
Susceptible - Exposed - Infectious - Recovered – Vaccinated
(SEIRV)

SEIRV model: 15 diversi scenari in Riproduzione a ciclo aperto

Scrofette introdotte a 10 w

Gilt introductions

Permanenza per 16 settimane



● Scenari testati

<i>Intervention</i>		<i>Experiment #</i>																
<i>Type</i>	<i>Description</i>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	<i>Timing of Gilt Introduction</i>	<i>1 week (Null)</i>	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
		<i>1 month</i>		X														
		<i>3 months</i>			X													
		<i>6 months</i>				X											X	
2	<i>Gilt Isolation</i>	<i>No (Null)</i>	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
		<i>Yes</i>					X										X	
3	<i>Gilt Vaccination</i>	<i>No (Null)</i>	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	
		<i>Homologous</i>							X									
		<i>Heterologous</i>						X										
4	<i>Early weaning</i>	<i>0-7 days</i>							X								X	
		<i>7-14 days</i>								X								
		<i>14-21 days</i>										X						
		<i>21-28 days (Null)</i>	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	
5 (MDA+)	<i>Vaccination</i>	<i>No vaccination</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
		<i>Mass Homologous-every 2 mo.</i>											X				X	
		<i>Mass Homologous-every 6 mo.</i>												X				
		<i>Mass Heterologous-every 2 mo.</i>													X			
		<i>Pre-Farrow Homologous</i>														X		
		<i>Pre-Farrow</i>															X	

● **Nessun intervento**

- Oltre 200 scrofe o 500 animali non c'è differenza di prevalenza
- L'infezione si introduce in GDU e si diffonde alle altre sottopopolazioni per una settimana successiva al picco
- L'endemicità è mantenuta dall'infezione dei suinetti appena nati
- Nello stato di endemia scrofe e scrofette hanno meno probabilità di essere infette

COSA CI DICONO GLI ALTRI SCENARI?

- Impatto relativo della vaccinazione pre-parto sulla prevalenza di infezione, ma diminuzione di segni clinici e lesioni polmonari
- Vaccinazione omologa di massa e svezzamento precoce maggior effetto sulla diminuzione della prevalenza
- Vaccinazione omologa di massa, svezzamento precoce, isolamento delle scrofette, vaccinazione delle scrofette e periodi di introduzione delle scrofette maggiori hanno l'impatto più significativo sulla riduzione della prevalenza

● Fattori associati a infezione nei suini durante lo svezzamento

- Studio longitudinale
- 83 allevamenti: Minnesota, Iowa, South Dakota
- 2 Aziende con dati disponibili dal 2011 e 2013
- 24 fattori: 3 categorie

Categorie di fattori:

- Caratteristiche dell'allevamento
- Pratiche gestionali
- Procedure specifiche per suinetti e scrofette

Fonte dei dati:

- Aziendali
- Pubblicazioni (anche modelli)
- Veterinari
- Questionari



Campionamento:

- Fluidi orali: prevalenza del 10%, 93% confidenza, 80% sensibilità PCR
- Tamponi nasali 30 o 10 pool da 3: prevalenza del 10%, 93% confidenza, 94% sensibilità PCR
- Tamponi orofaringei: 20: prevalenza del 20%, 95% confidenza, 86% sensibilità PCR



24 fattori studiati per verificare l'associazione con probabilità di infezione in suinetti in svezzamento

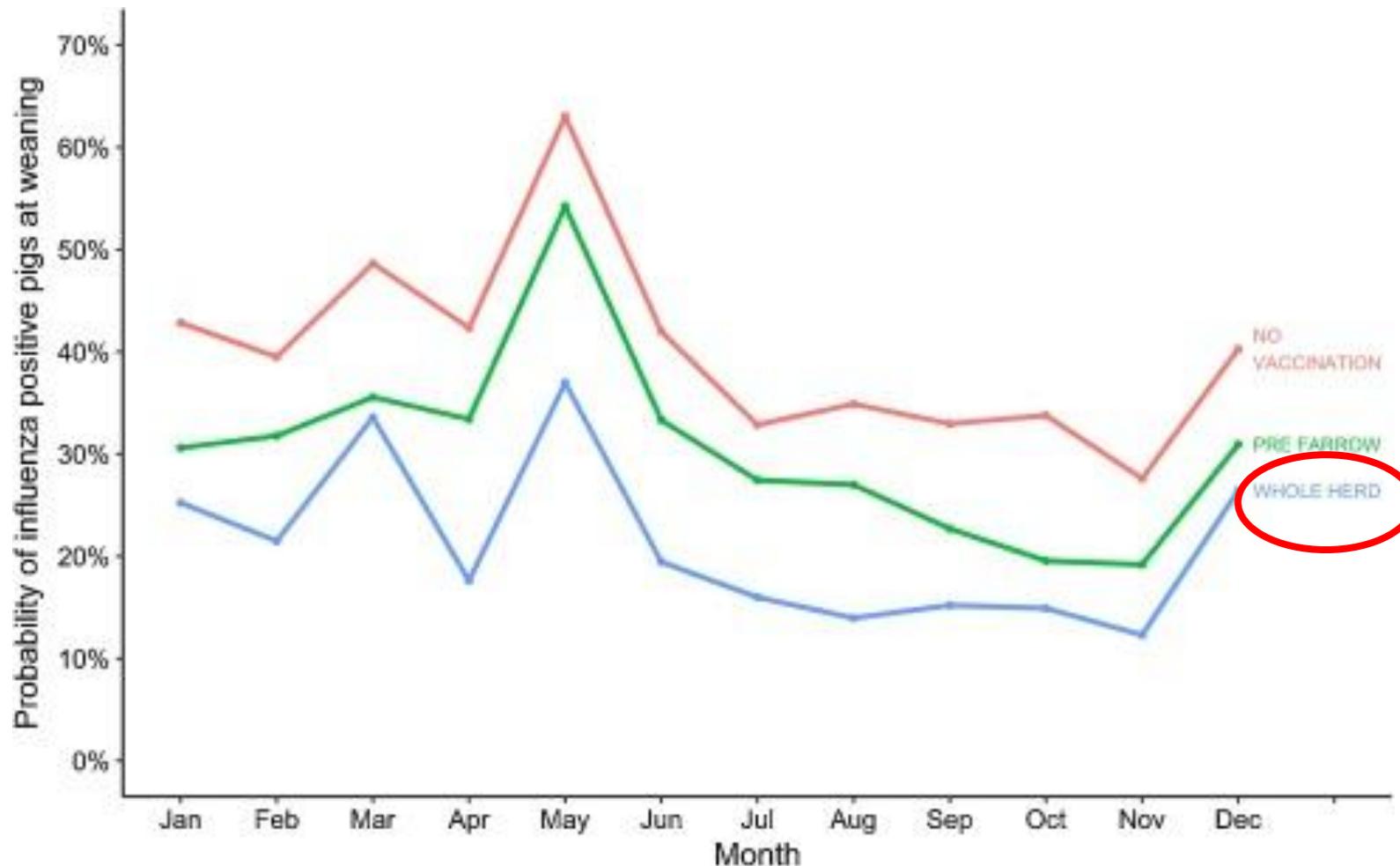
Caratteristiche dell'allevamento	Number of employees
	Female replacement rate (%)
	Farrowing flow
	Parity segregation
	Farm density in 1 mile radius
	Farm density in 3 miles radius
	Air filtration
	Herd size (number of sows)
	Herd closure
Gestione dell'allevamento	Sow IAV vaccination data
	Early weaning
	Flu-like sick personnel policy
	Personnel temperature check at entry policy
	Flu personnel vaccination policy

Procedure gestionali specifiche per scrofette e suinetti	IAV positive gilts at entry
	Gilt IAV vaccination
	Gilt development unit (GDU) location
	GDU flow
	GDU flow
	Gilt age at GDU entry
	GDU gilt entry frequency
	Type of gilt source
	Number of gilt sources
	Gilt isolation before entry
	Cross-fostering piglets > 10 days of age
	Holding back piglets at weaning

● Fattori associati a infezione nei suini durante lo svezzamento

Dati di allevamento	Fattore	Probabilità di positività in suinetti allo svezzamento
Caratteristiche dell'allevamento	Nessuno	Nessuna associazione
Gestione dell'allevamento	Vaccinazione delle scrofe o di <u>allevamento</u>	Inferiore
Pratiche specifiche per scrofette e suinetti	Stop all'introduzione di scrofette	Nessuna associazione
	Introduzione di scrofette positive	Aumentata
	Separazione delle scrofette in ingresso	Nessuna associazione
	Introduzione di scrofette negative	Inferiore

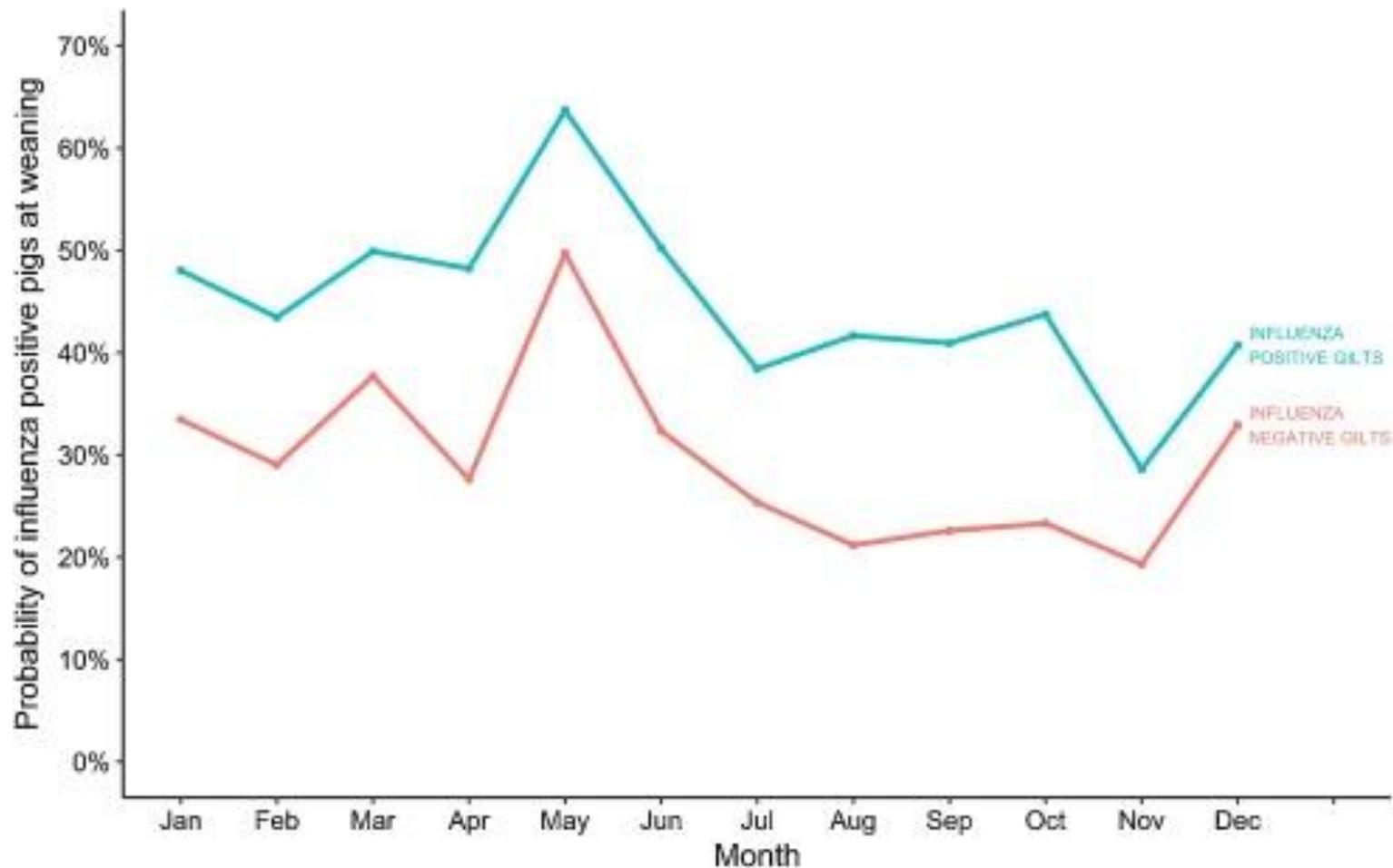
Probabilità di positività in suinetti allo svezzamento e vaccinazione delle scrofe



Nessuna differenza statisticamente significativa tra i due tipi di vaccinazione ma minore probabilità con whole-herd vaccination



Probabilità di positività in suinetti allo svezzamento e stato delle scrofette



● COSA DOBBIAMO RICORDARCI?

- Vaccinazione delle scrofe
- Introduzione di scrofette negative



**Diminuzione dell'infezione
dei suinetti allo svezzamento**

- Negatività delle scrofette
- Isolamento delle scrofette



**Diminuzione dell'infezione
dei suinetti allo svezzamento**

- Stop all'introduzione di scrofette



**Mitiga la diffusione tra
allevamenti ma non risolve la
diffusione e mantenimento
intra-allevamento**

- Filtrazione dell'aria
- Densità in allevamento



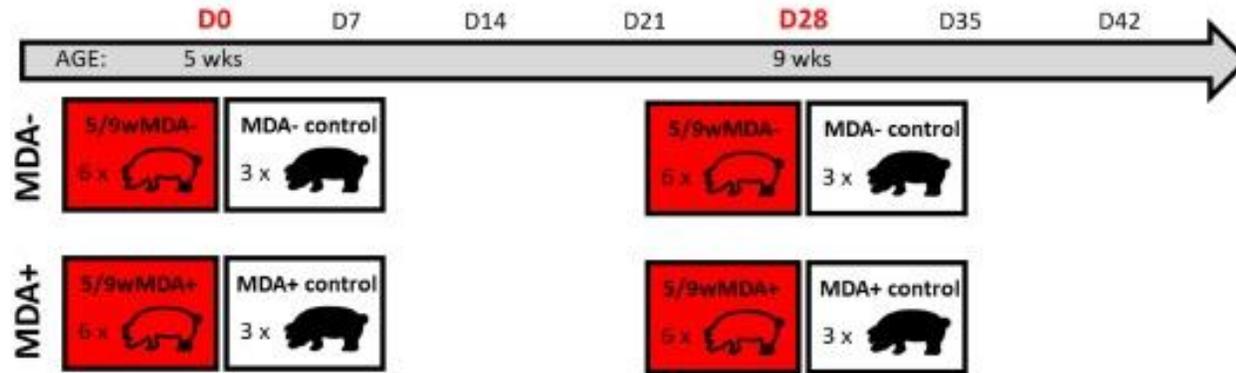
**Nessuna correlazione con
positività per influenza**

● Cosa sappiamo sull'effetto degli anticorpi materni (MDA)?

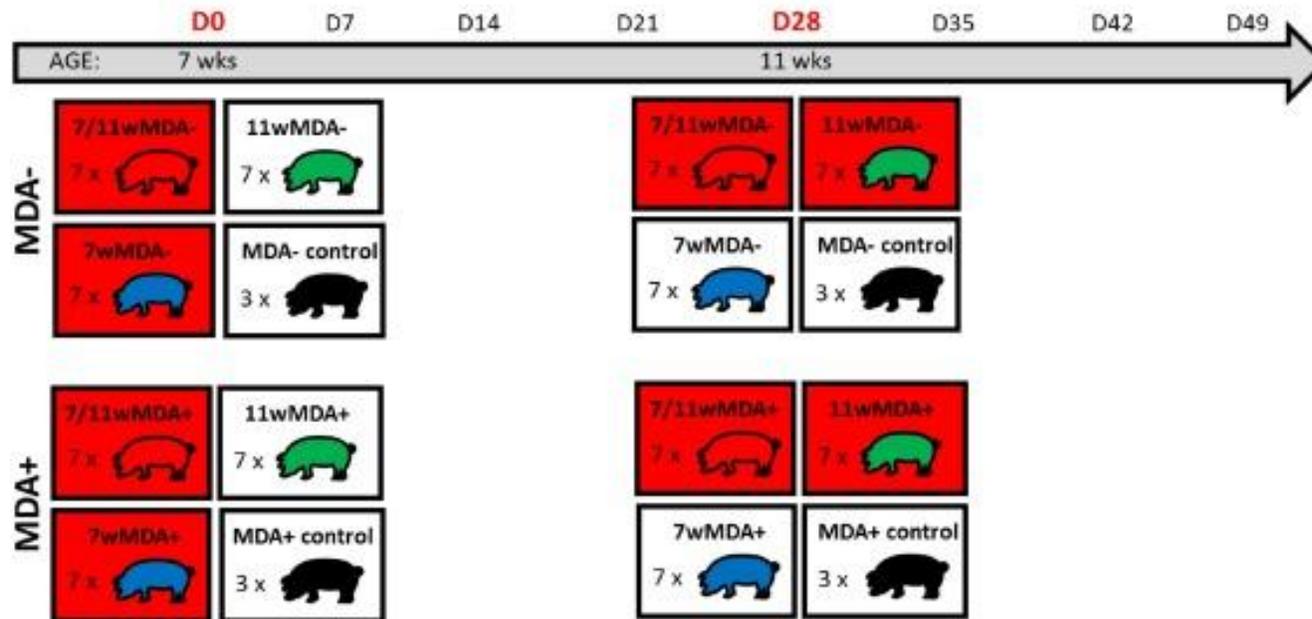
- Animali con MDA sono meno suscettibile ad una infezione omologa rispetto a animali MDA-
- La trasmissione della malattie avviene in minor misura in popolazioni con MDA (MDA+)
- Presenza di MDA estende la persistenza dell'infezione all'interno di un gruppo (Modello di Cadore et al., 2016)
- Durata dell'epidemia nello stesso lotto quindi aumentata trasmissione tra gruppi e aumentata persistenza in allevamento
- MDA+ interferisce con lo sviluppo di una risposta immunitaria post infezione (Rose et al., 2013)

● Anticorpi materni e influenza suina

A - Experiment 1 (E1)



B - Experiment 2 (E2)



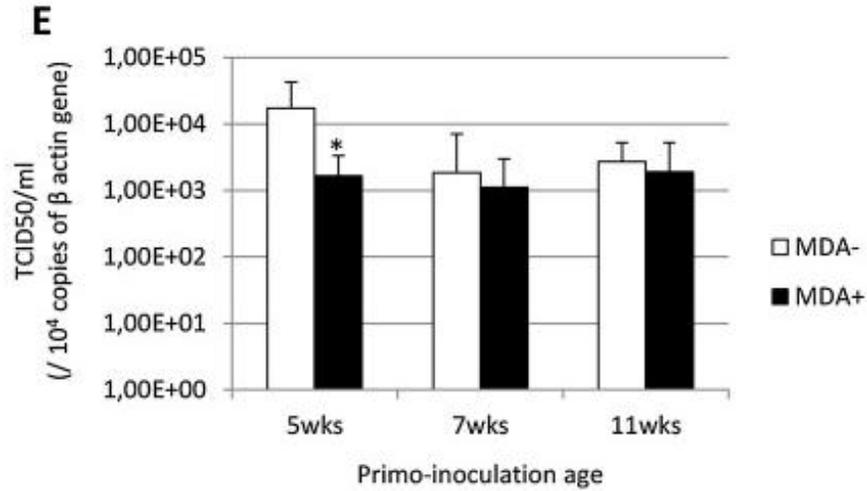
Età e livello di MDA modulano la risposta clinica

Experiment	Group ID	Mean rectal temperature (°C) at 24 hpi ± SD		MWG per day (kg) over the 48 hpi ± SD	
		1 st inoculation	2 nd inoculation	1 st inoculation	2 nd inoculation
E1	5/9wMDA-	40.2 ± 0.3 _{a, b}	39.6 ± 0.1	-0.092 ± 0.12 4 _{a, b}	0.958 ± 0.177
	MDA- control	39.7 ± 0.1	39.5 ± 0.1	0.417 ± 0.208	0.833 ± 0.252
	5/9wMDA+	39.7 ± 0.2	39.5 ± 0.1	0.358 ± 0.092	0.775 ± 0.202
	MDA+ control	39.7 ± 0.3	39.7 ± 0.3	0.483 ± 0.153	0.867 ± 0.582
E2	7wMDA-	40.0 ± 0.8	39.3 ± 0.1	0.479 ± 0.195	0.807 ± 0.073
	11wMDA-	39.3 ± 0.2	40.5 ± 0.6_a	0.550 ± 0.242	0.386 ± 0.281
	7/11wMDA-	39.8 ± 0.6	39.4 ± 0.1	0.386 ± 0.131	1.307 ± 0.221
	MDA- control	39.2 ± 0.3	39.1 ± 0.2	0.617 ± 0.126	nd
	7wMDA+	39.8 ± 0.4 _a	39.3 ± 0.2	0.529 ± 0.111	0.857 ± 0.321
	11wMDA+	39.5 ± 0.1	40.5 ± 0.3_a	0.493 ± 0.140	0.464 ± 0.462
	7/11wMDA+	40.0 ± 0.4 _a	39.2 ± 0.2	0.471 ± 0.166	0.914 ± 0.165
	MDA+ control	39.3 ± 0.1	39.4 ± 0.1	0.750 ± 0.100	1.100 ± 0.173

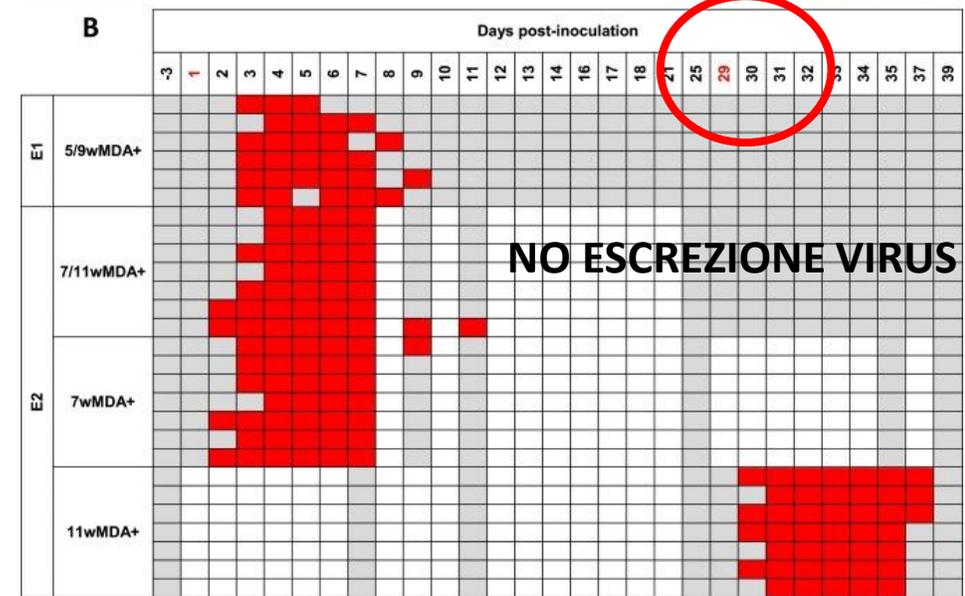
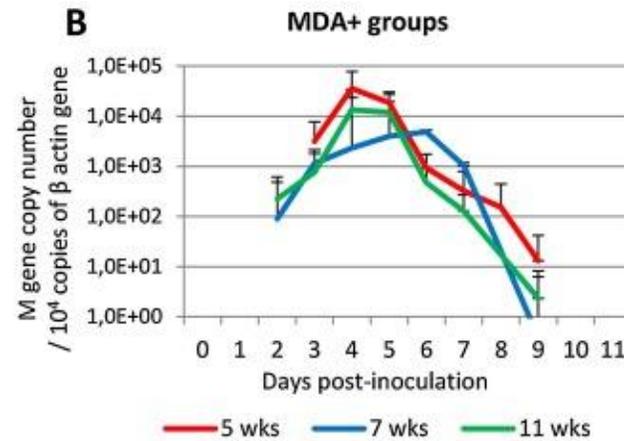
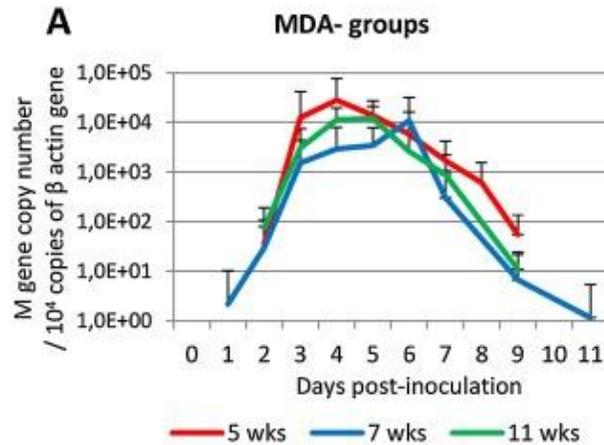
Animali infettati a 11 settimane
I segni clinici aumentano al diminuire di MDA



Presenza di MDA diminuisce l'escrezione virale ma non previene l'infezione



CINETICA DI ESCREZIONE SIMILE

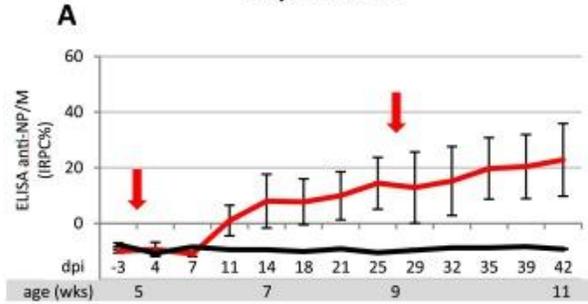




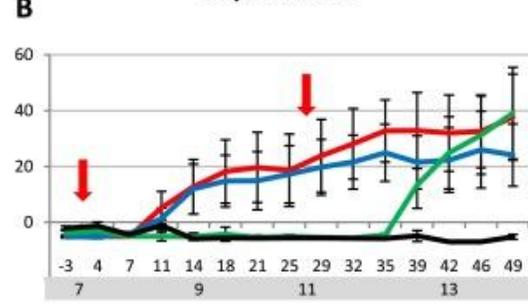
MDA -

5 e 9 settimane

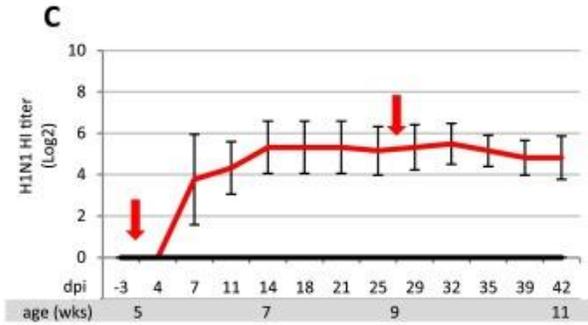
Experiment 1



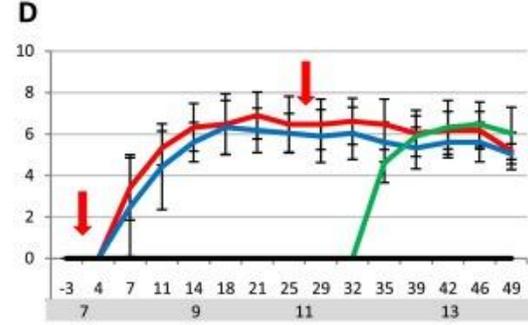
Experiment 2



C



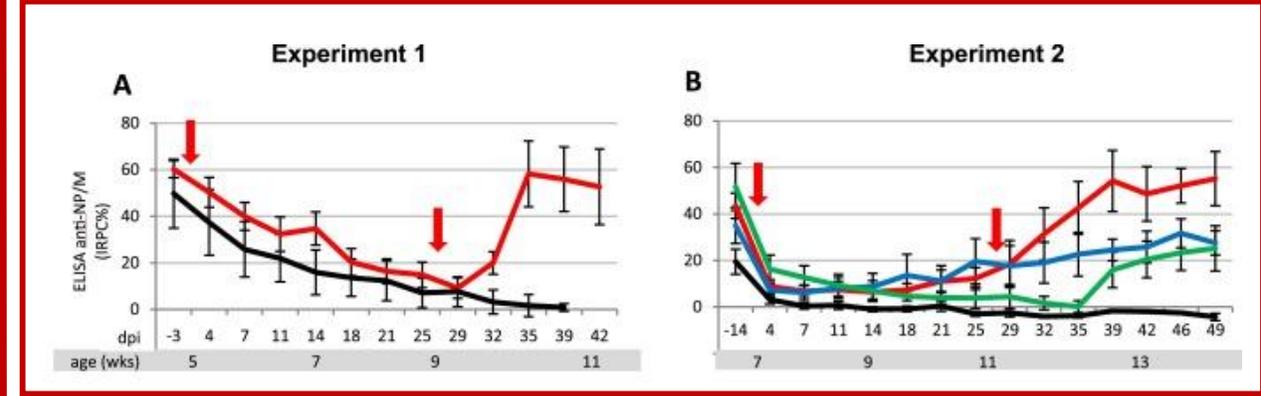
D



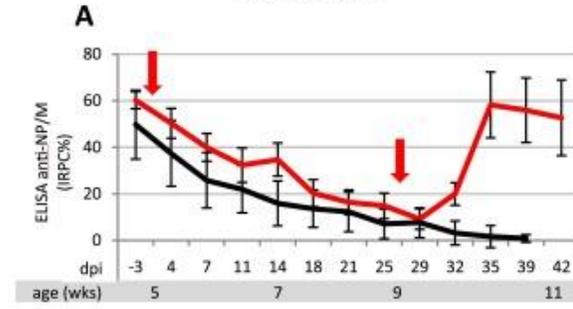
— 5/9wMDA- — MDA- control

— 7/11wMDA- — 7wMDA-
— 11wMDA- — MDA- control

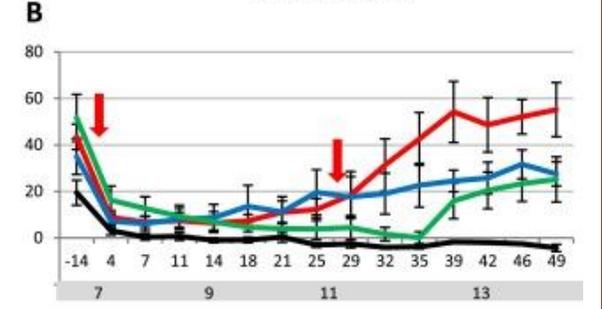
MDA +



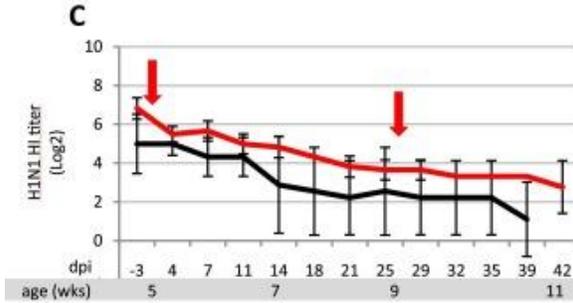
A



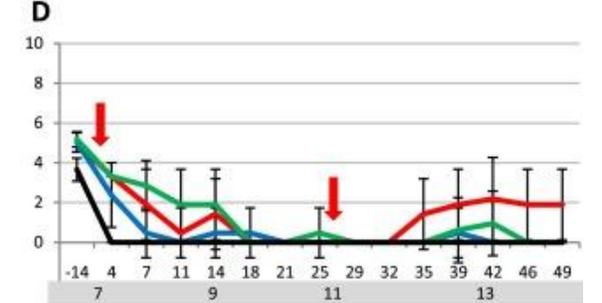
B



C



D



— 5/9wMDA+ — MDA+ control

— 7/11wMDA+ — 7wMDA+
— 11wMDA+ — MDA+ control



MDA +

-No MDA a 11 w (i modelli indicano 71 giorni circa) (nero A)

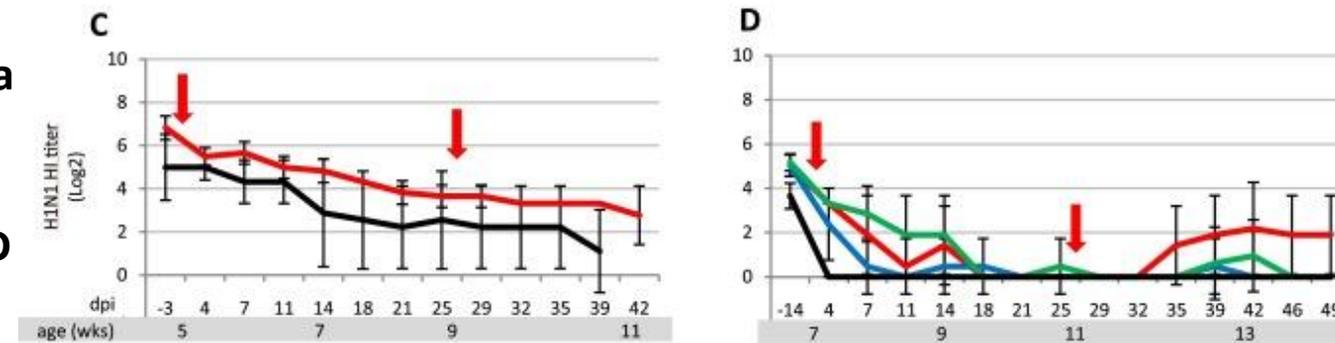
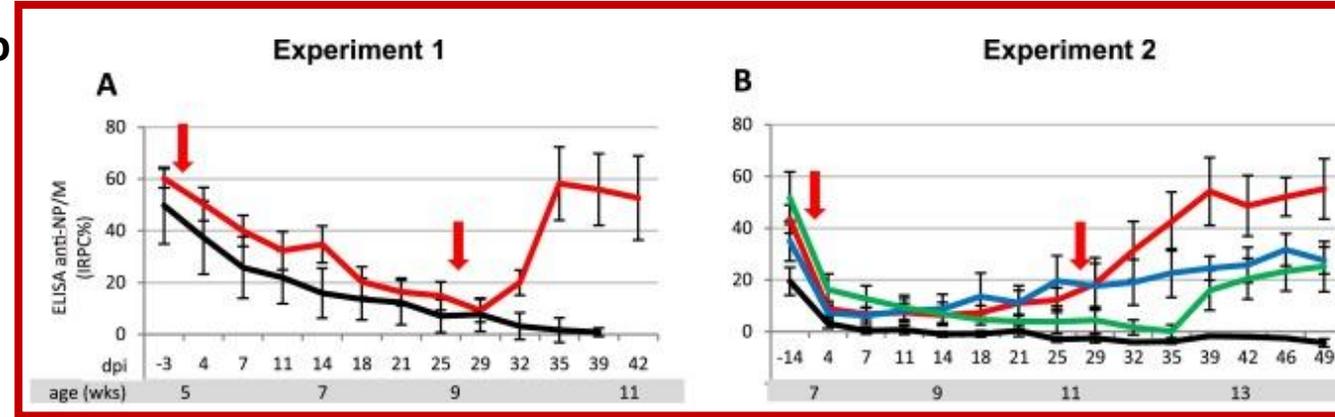
-Livello di MDA inferiore a 7 w rispetto a 11w (blue e verde)

-Rialzo anticorpale mediante ELISA (A e B)

-No risposta mediante HI per animali infettati 1 sola volta a 7 e 11 w (ma più protetti di MDA-) (blu e verde D)

-Rialzo anticorpale (HI) con diminuzione di MDA (rosso D gruppo infettato a 7 + 11 w: alla diminuzione di MDA)

-La presenza di MDA inficia il risultato dell'HI



— 5/9wMDA+ — MDA+ control

— 7/11wMDA+ — 7wMDA+
— 11wMDA+ — MDA+ control

Diagnostica Clinica -PD



Isolamenti e biobanca



Sierologia e virologia diagnostica



Infografica



Diagnostica clinica -PN

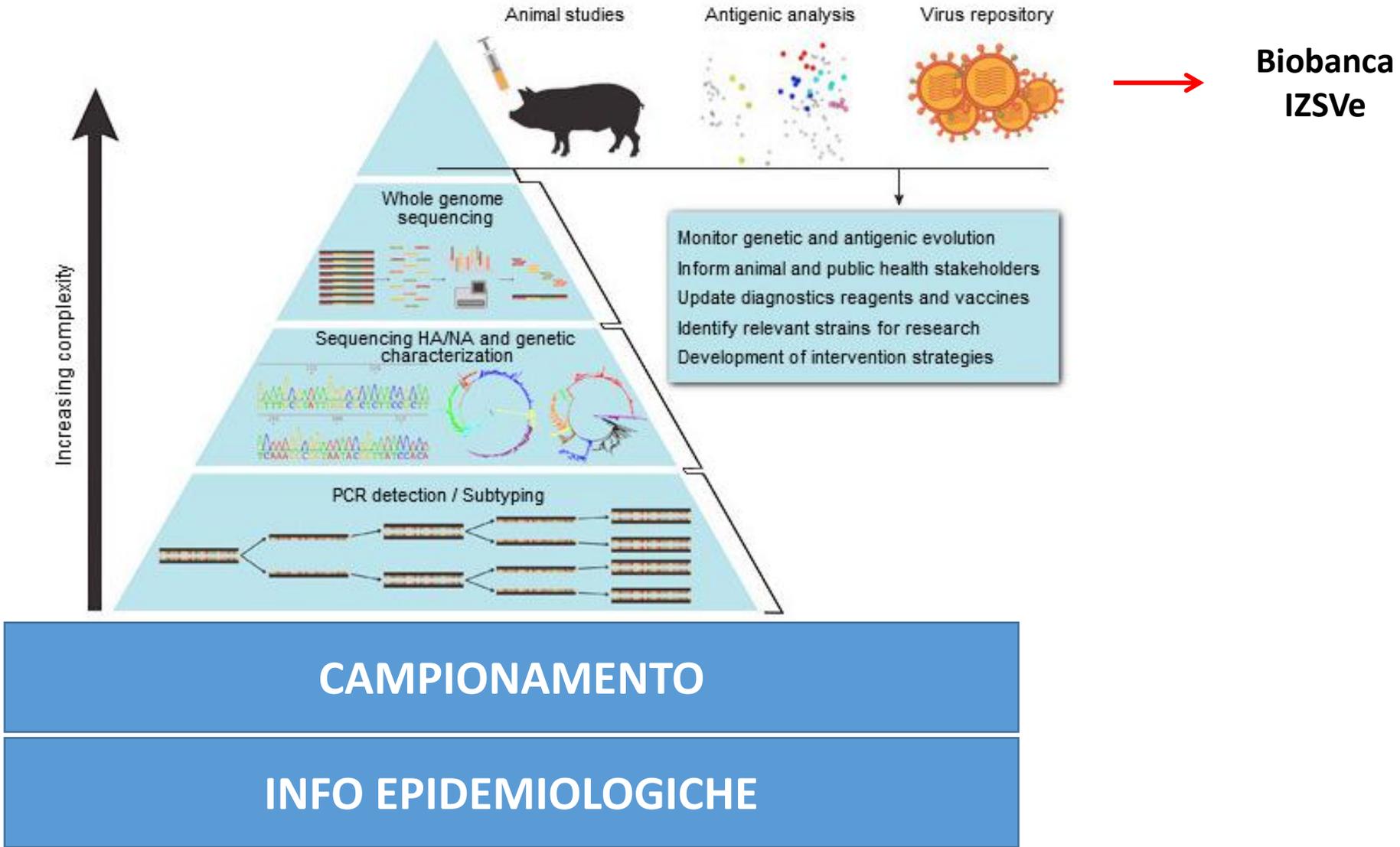


Sequenziamento e filogenesi (CRN)





«SURVEILLANCE PYRAMID»

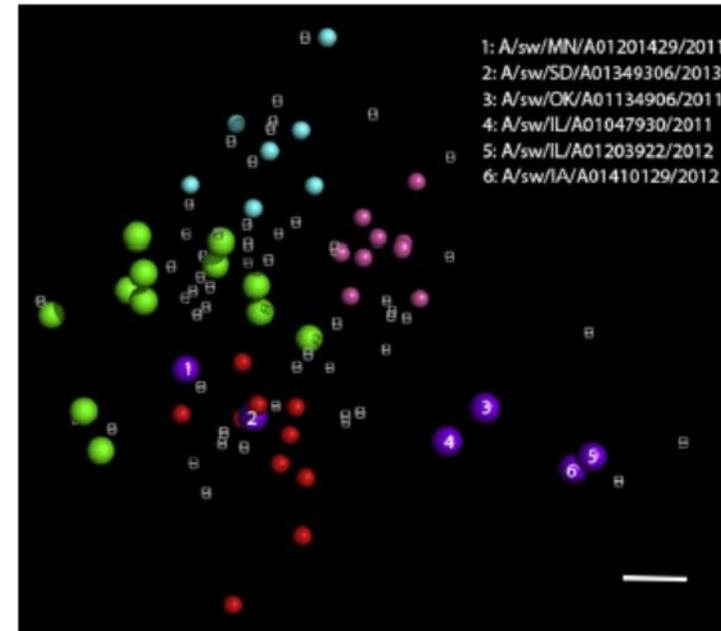
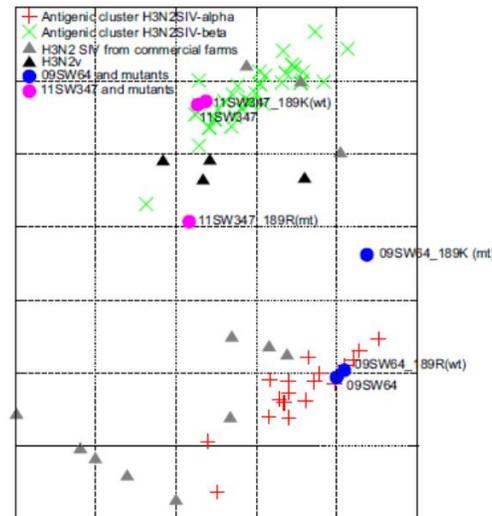
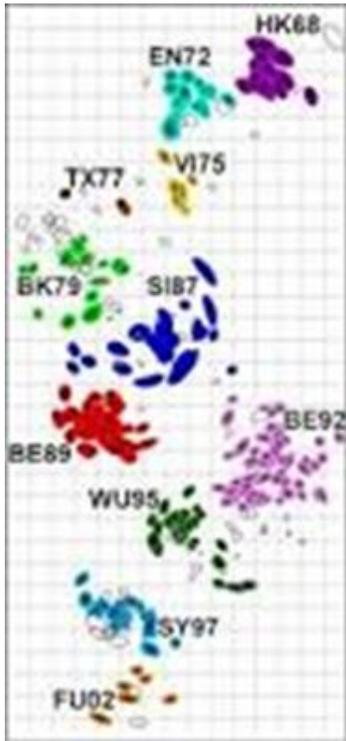


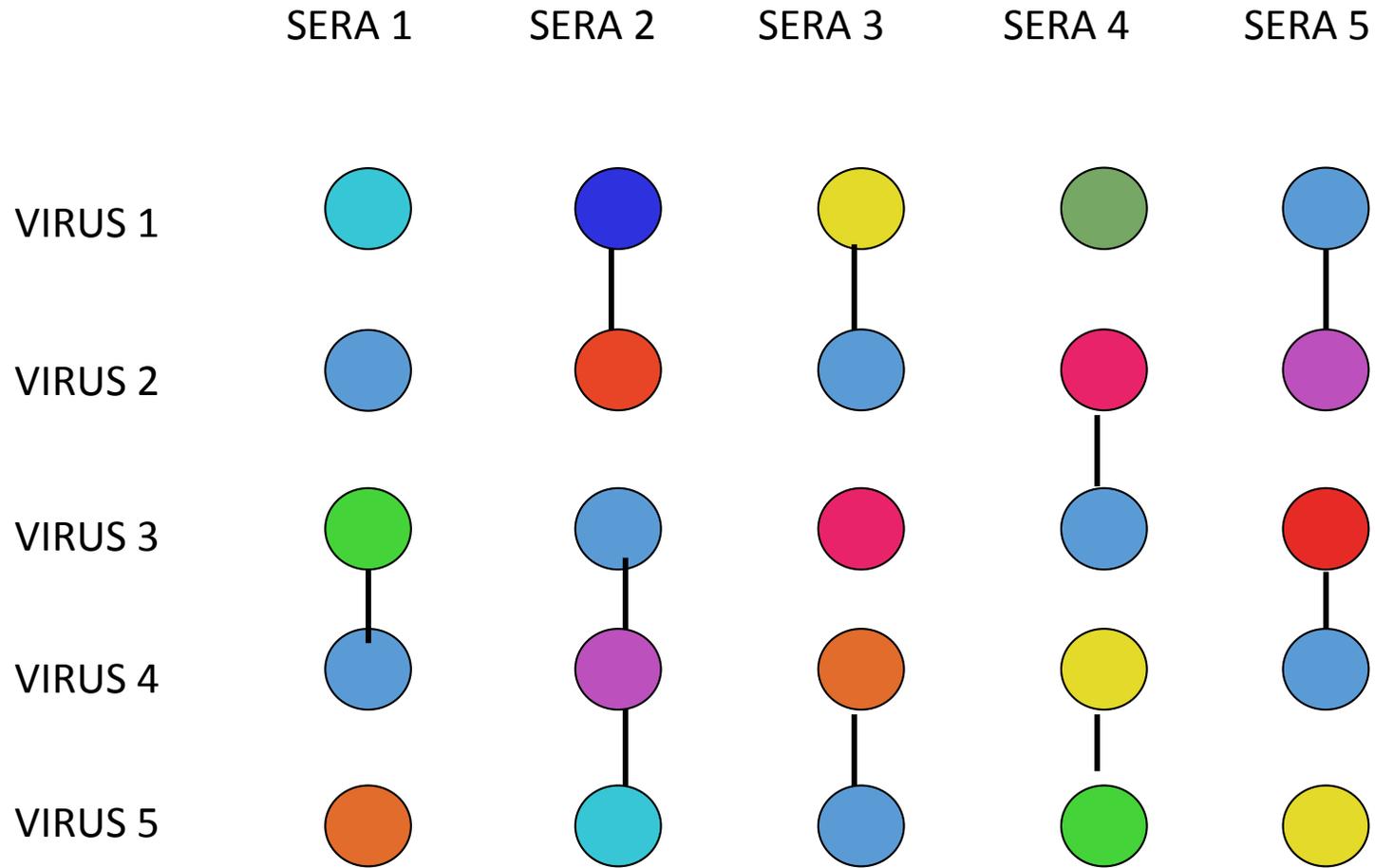
COME TROVARE LA RISPOSTA?

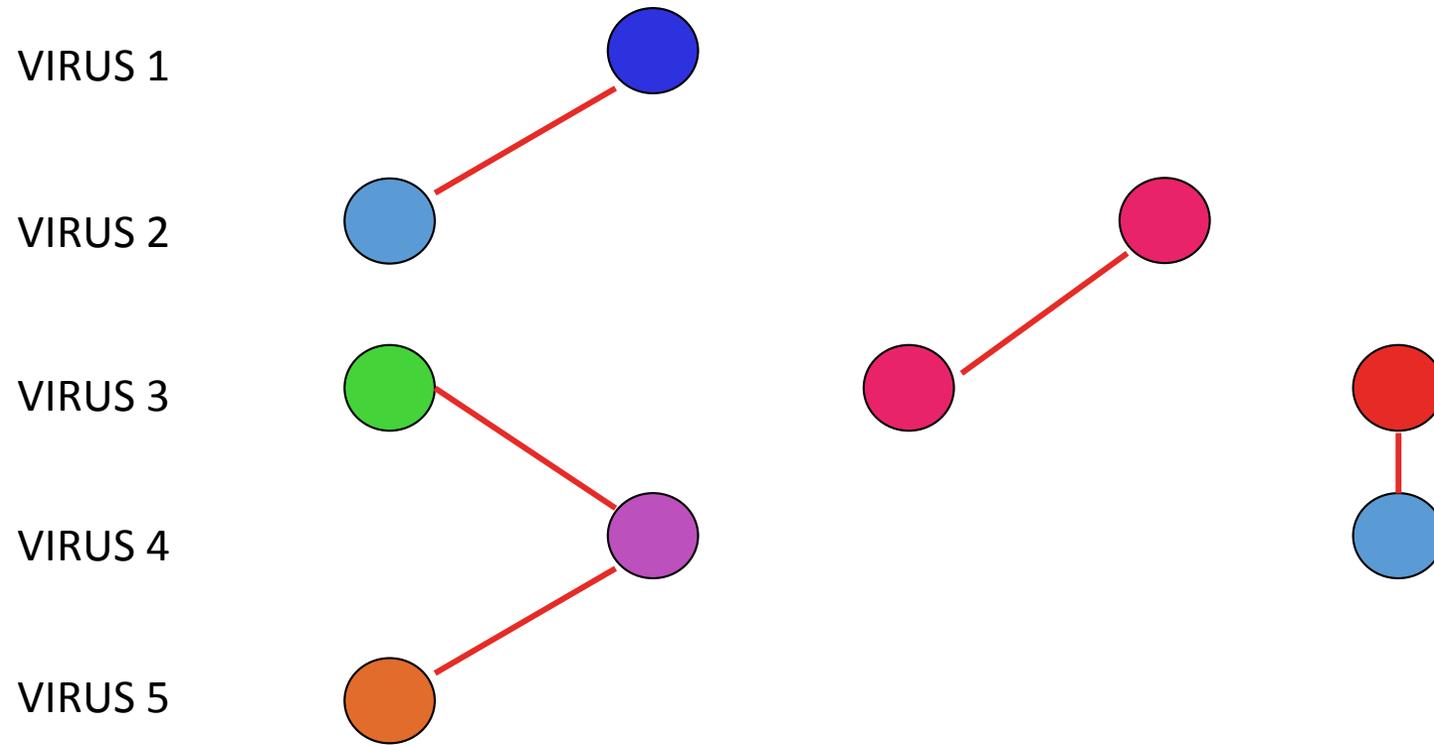
Quali sono le caratteristiche antigeniche?



ANTIGENIC CARTHOGRAPHY

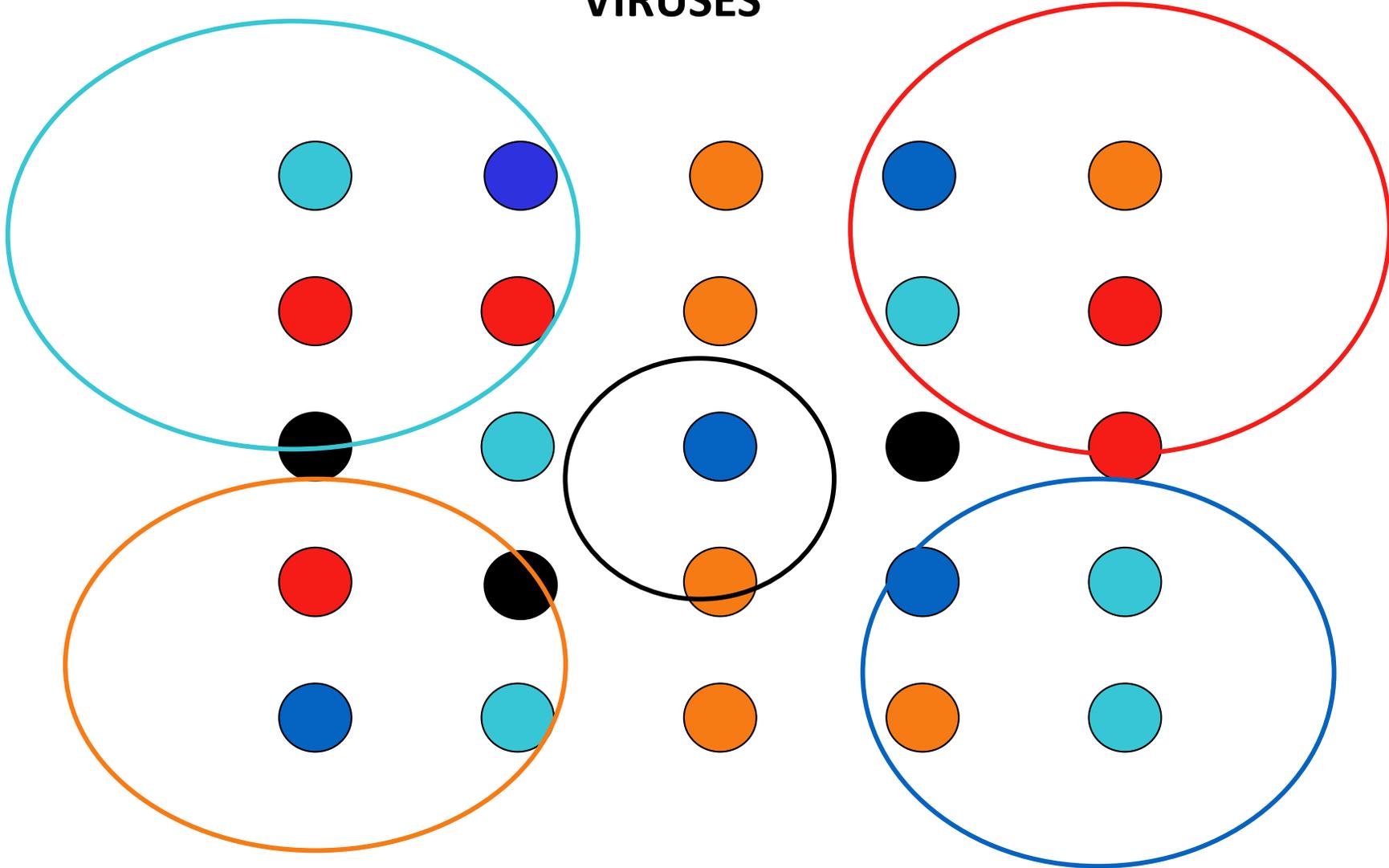








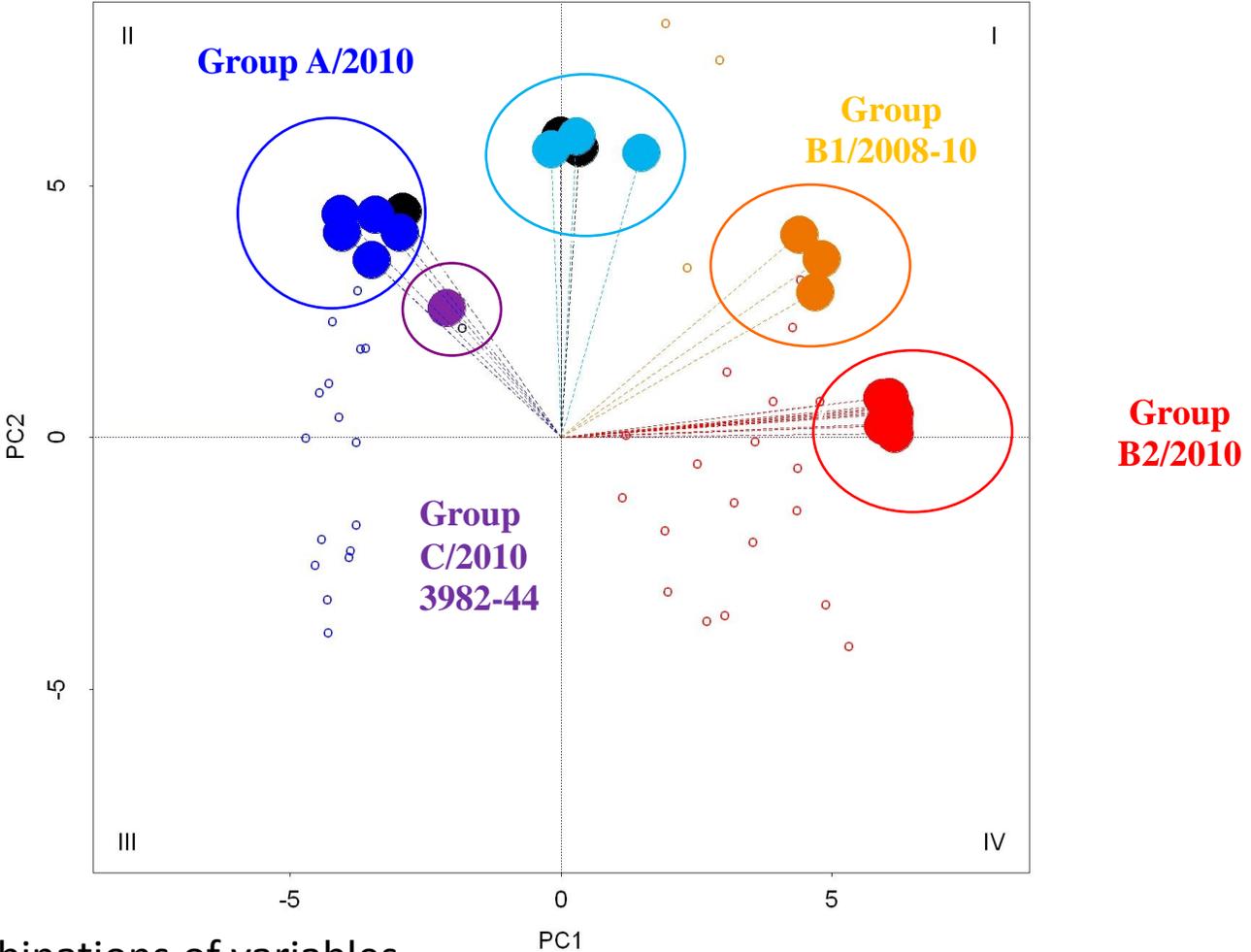
VIRUSES





PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

Group A/2008

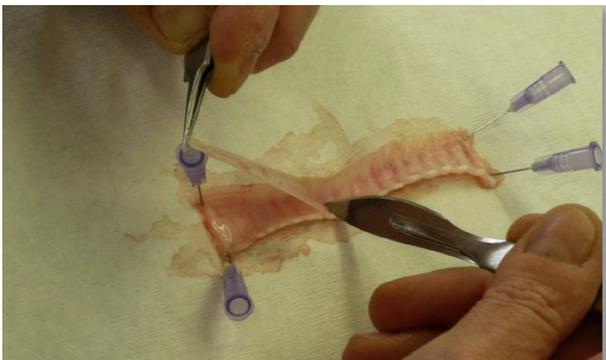
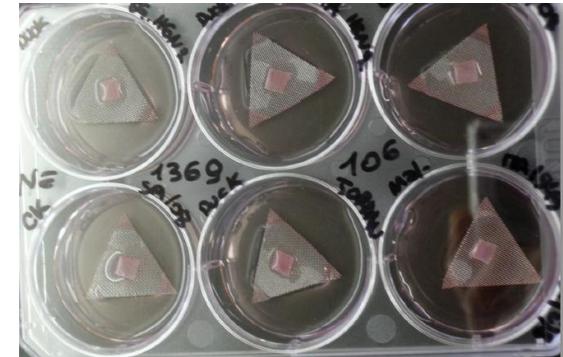
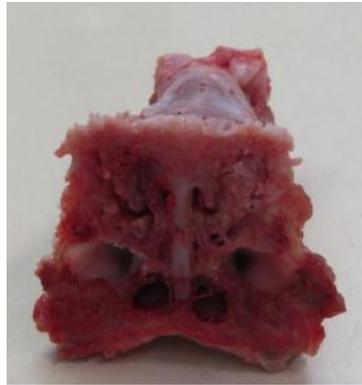


PC= linear combinations of variables

COME TROVARE LA RISPOSTA



Quale è la patogenicità dei genotipi identificati?



Diagnostica Clinica -PD



Isolamenti e biobanca



Sierologia e virologia diagnostica



Infografica



Diagnostica clinica -PN



Sequenziamento e filogenesi (CRN)



