



## **Rilievo di un focolaio di influenza aviare a bassa patogenicità nel centro Italia - Survey of a low pathogenic avian influenza outbreak in central Italy.**

Petrini S., Panicià M., Duranti A., Iacchia G., Iscaro C., Costarelli S., De Mia G.M., Fortunati M.

**Abstract.** This paper describes an outbreak of low pathogenicity avian influenza (LPAI) H7N1 subtype was observed in the Marche Region in 2009 in connection with an epidemiological outbreak of avian influenza occurred in the Emilia-Romagna Region in the same year. From all animals present in the farm located in the Marche Region, were evaluated the clinical signs and serological and virological tests were conducted on different animals (turkey, chickens, ducks). The samples were tested serologically and virologically for avian influenza virus at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) and were subsequently forwarded to the National Reference Laboratory (NRL) for Avian influenza (IZSVE, Padova) for virological confirmation and typing. No clinical signs were observed. With regard to the serological results in all animals, no antibodies against the avian influenza virus were found, unlike the virological tests (virus isolation, molecular biology), which showed positive results on tracheal and cloacal swabs. Subsequently, the NRL confirmed the findings obtained from IZSUM and then typed the virus as Low Pathogenicity Avian Influenza (LPAI) H7N1 subtype. Given the results, all the animals in the outbreak have been stamped out and all standards of cleaning and disinfecting of interest have been implemented. Furthermore, an epidemiological survey was carried out on all animals sold by the farmer before the declaration of the outbreak. No other viral positivity correlated with the outbreak of the above has been established within two months.

**Riassunto.** Nel presente lavoro viene descritto un focolaio di influenza aviare (IA) sottotipo H7N1 a bassa patogenicità rilevato nella Regione Marche nel 2009, in connessione epidemiologica con un analogo focolaio di IA avvenuto nella Regione Emilia-Romagna nello stesso anno. Nell'allevamento situato nella Regione Marche, sono stati effettuati esami clinici, sierologici e virologici su diverse categorie di animali (tacchini, galline ovaiole, oche). I campioni sono stati saggiati sia sierologicamente che virologicamente nei confronti del virus dell'influenza aviare presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) e gli stessi sono stati inviati poi, presso il Centro di Referenza Nazionale (CRN) per i virus influenzali di Padova per le conferme e la tipizzazione virologica. Dal punto di vista clinico nessun segno è stato apprezzato. Per quanto attiene ai risultati sierologici, in tutti gli animali, non sono stati rilevati anticorpi nei confronti del virus dell'IA, a differenza degli esami virologici, i quali hanno evidenziato positività in diversi campioni (tamponi tracheali e cloacali) sia alle prove di isolamento virale che di biologia molecolare. Successivamente il CRN ha confermato quanto accertato dall'IZSUM ed ha poi tipizzato il virus come sottotipo H7N1 a bassa patogenicità (LPAI). A fronte dei risultati ottenuti, tutti gli animali appartenenti al focolaio sono stati abbattuti e sono state messe in atto tutte le norme di lavaggio e disinfezione dei locali di interesse. Inoltre è stata effettuata un'indagine epidemiologica su tutti gli animali venduti dalla stessa azienda, prima dell'apertura del focolaio. Nessuna altra positività virologica correlata con il focolaio di cui sopra è stata accertata nei due mesi successivi.

### **Introduzione**

L'influenza aviare (IA) rappresenta una delle malattie che possono interessare la salute umana e recentemente è stata identificata in animali reservoir. Negli ultimi anni si sono verificati focolai di IA in misura maggiore rispetto a quelli accertati nei precedenti 40 anni (Capua et al., 2004). Tutta la comunità scientifica sia medico umana che veterinaria è d'accordo sul fatto che IA dal 1990 ha assunto un differente profilo di patogenicità. Diversi focolai hanno infatti mantenuto le caratteristiche di minore virulenza, a differenza di altri, come ad esempio quelli verificatesi in Italia nel 1999-2000, in Germania nel 2003 e in Canada nel 2004, che hanno devastato l'industria avicola, determinando un impatto negativo sulla opinione pubblica e con il rischio che eventi ricombinanti potessero dar luogo alla circolazione di una nuova variante virale (Capua et al., 2007a).

I virus dell'influenza aviare appartengono alla Famiglia Orthomyxoviridae e vengono distinti in tre generi: 1) Influenzavirus tipo A; 2) Influenzavirus tipo B; 3) Influenzavirus tipo C. Solo l'IA tipo A è responsabile d'infezione nei volatili. Sulla base delle proteine emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA), attualmente si conoscono 16 sottotipi HA (HA1-HA16) e 9 NA (N1-N9).

Ciascun virus può combinare HA con NA e originare stipti virali diversi (Knipe et al., 2001). Il virus dell'IA di tipo A può essere distinto in due gruppi sulla base della patogenicità della malattia. Gli stipti molto virulenti vengono classificati ad alta patogenicità (HPAI) ed originano una infezione sistemica che causa il 100% di mortalità. Tra questi, quelli di maggiore interesse sono identificati come sottotipi H5 e H7 che causano la morte negli uccelli domestici a differenza degli uccelli selvatici dove la sintomatologia può essere variabile e delle volte non sfociare nella morte dei soggetti.

Attualmente il ruolo svolto degli uccelli selvatici come possibili reservoir dell'infezione è stato descritto solo per il virus HPAI sottotipo H5N1 asiatico. Tutti i restanti virus dell'influenza aviare tipo A possono essere perpetuati in natura dagli uccelli selvatici e causare nei domestici infezioni localizzate e caratterizzate da una lieve sintomatologia respiratoria, depressione del sensorio e riduzione della produzione di uova (Capua et al., 2007b). Questi virus vengono classificati come stipti a bassa patogenicità (LPAI). Negli ultimi anni in Italia sono stati accertati diversi focolai di influenza aviare, sia HPAI che LPAI, localizzati prevalentemente nella parte settentrionale del Paese (Zanella et al., 2003; Mutinelli et al., 2003). Scopo del presente lavoro è stato quello di descrivere un focolaio di influenza aviare a bassa patogenicità verificatosi nella Regione Marche nell'anno 2009.

## **Materiali e metodi**

### *Epidemiologia del focolaio*

Nel mese di luglio del 2009, a seguito di un'indagine epidemiologica effettuata dalla Regione Emilia-Romagna in merito ad un focolaio di IA, veniva segnalata alla Regione Marche una connessione epidemiologica con un'azienda situata nella provincia di Fermo (FM). La Regione Emilia-Romagna comunicava inoltre che aveva aperto il proprio focolaio nel mese di giugno a seguito della sieropositività al virus dell'IA sottotipo H7 e che nello stesso mese tutti i volatili presenti nell'azienda erano stati abbattuti. Il controllo era stato effettuato dalla Regione Emilia-Romagna nell'ambito del programma di sorveglianza sugli animali svezzatori e riguardava sieri, tamponi tracheali di pollastre e tamponi cloacali di oche e anatre. Gli esiti evidenziavano positività sierologica al virus dell'influenza aviare a differenza dei tamponi tracheali e cloacali che nelle diverse specie risultavano tutti negativi virologicamente.

### *Azienda sottoposta a focolaio*

L'azienda oggetto di focolaio era a conduzione familiare e situata nel Comune di Falerone (FM) e la tipologia della stessa era quella di rivenditore. Era costituita da diverse categorie di animali ibridi commerciali ed all'apertura del focolaio erano presenti 100 tacchini da carne, 40 galline ovaiole e 15 oche. La stessa era costituita da 4 capannoni riuniti in un unico sito produttivo e con una parte dedicata alla vendita di mangimi per animali da corte. I tacchini e le galline ovaiole erano custodite in gabbie, a differenza delle oche che erano stabulate in box a terra.

### *Rilievi clinici e prelievi diagnostici*

I servizi veterinari della Regione Marche, insieme ai Colleghi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, subito dopo la comunicazione della connessione epidemiologica, si recavano presso l'azienda d'interesse per effettuare la valutazione clinica degli animali ed i prelievi diagnostici. Quest'ultimi erano rappresentati dalla raccolta di campioni di sangue e tamponi sia tracheali che cloacali accompagnati dalla compilazione di una scheda epidemiologica. In particolare, i veterinari effettuavano 50 prelievi di sangue rispettivamente da 20 tacchini, 20 galline e 10 oche per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus dell'IA secondo quanto previsto dalla normativa vigente e dagli stessi animali, venivano effettuati tamponi tracheali e cloacali in pool da 5 soggetti, per le ricerche virologiche. Quest'ultime venivano effettuate attraverso PCR ed isolamento virale su uova embrionate di pollo. Le prove sopramenzionate

venivano effettuate presso l'IZSUM e successivamente i campioni venivano inviati al CRN per le conferme diagnostiche e per la tipizzazione del virus rilevato oltre a determinare il grado di patogenicità dello stesso. Tutte le prove diagnostiche eseguite sia dall'IZSUM che dal CRN venivano effettuate in base a quanto previsto dalla normativa vigente.

## Risultati

### Clinici

Nessun animale presente nell'azienda evidenziava sintomatologia clinica riferibile ad infezione da IA (Tabella 1).

<b>Tabella 1. Risultati degli esami clinici effettuati su diverse categorie di animali (tacchini, galline, oche) presenti nel focolaio di influenza aviaria a bassa patogenicità verificatosi nella Regione Marche nel 2009</b>			
<b>Segni clinici</b>	<b>Tacchini</b>	<b>Galline</b>	<b>Oche</b>
Ipertermia*	0/20 <sup>§</sup>	0/20	0/10
Depressione del sensorio/letargia	0/20	0/20	0/10
Sintomi respiratori**	0/20	0/20	0/10
Sintomi enterici***	0/20	0/20	0/10
Inappetenza	0/20	0/20	0/10
Arruffamento delle penne	0/20	0/20	0/10
Cianosi****	0/20	0/20	0/10
Morte	0/20	0/20	0/10
* > 43°C **Tosse, starnuti, rantoli, ipersecrezione nasale e congiuntivale ***Diarrea ****Creste/bargigli § numero dei soggetti con sintomatologia clinica/numero dei soggetti osservati.			

### Sierologici

I sieri di tutti gli animali saggiati sono risultati negativi per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus dell'IA. Gli stessi risultati sono stati poi confermati dal CRN (Tabella 2).

<b>Tabella 2. Risultati delle prove sierologiche effettuate su diverse categorie di animali (tacchini, galline, oche) presenti nel focolaio di influenza aviaria a bassa patogenicità verificatosi nella Regione Marche nel 2009</b>			
<b>Numero Campioni</b>	<b>Specie Animale</b>	<b>Risultati IZSUM<sup>1</sup> per la ricerca di anticorpi IHA* nei confronti dell'influenza aviaria</b>	<b>Risultati CRN<sup>2</sup> per la ricerca di anticorpi IHA* nei confronti dell'influenza aviaria</b>
20	Tacchini	0/20**	0/20**
20	Galline	0/20	0/20
10	Oche	0/20	0/20
*Prova di inibizione dell'emoagglutinazione (IHA) nei confronti del virus dell'influenza aviaria in accordo alla normativa vigente **Numero animali positivi/Numero animali saggiati <sup>1</sup> IZSUM, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche <sup>2</sup> CRN, Centro di Referenza Nazionale per i virus influenzali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Padova			

### Virologici

Le indagini di biologia molecolare (PCR) hanno evidenziato positività in tutti i pool dei tamponi tracheali appartenenti ai tacchini, mentre solo in 1 pool dei tamponi cloacali degli stessi animali è risultata positività virologica. Per quanto attiene ai risultati ottenuti dalle PCR condotte sui tamponi effettuati nelle galline, solo 1 pool dei tamponi tracheali ha evidenziato positività virologica. Dai tamponi cloacali degli stessi animali nessun rilievo è stato accertato. Da tutti i tamponi effettuati dalle oche non è stata rilevata nessuna positività al virus dell'IA.

Le prove di isolamento virale effettuate sulle uova embrionate di pollo, sono state in grado di rilevare il virus dell'IA da 1 pool di tamponi tracheali e 1 di tamponi cloacali, appartenenti ai tacchini. E' stato inoltre possibile isolare il virus dell'IA solo da 1 pool di tamponi tracheali raccolti dalle galline. Nessun altro isolamento virale è stato accertato (Tabella 3).

<b>Tabella 3. Risultati delle prove virologiche effettuate su diverse categorie di animali (tacchini, galline, oche) presenti nel focolaio di influenza aviaria a bassa patogenicità verificatosi nella Regione Marche nel 2009</b>				
<b>Specie animale</b>	<b>Risultati IZSUM<sup>1</sup></b>		<b>Risultati CRN<sup>2</sup></b>	
	Tamponi tracheali*	Tamponi cloacali*	Tamponi tracheali*	Tamponi cloacali*
Tacchini	4/4 <sup>a,§</sup> 1/4 <sup>a,§§</sup>	1/4 <sup>a,§</sup> 1/4 <sup>a,§§</sup>	0/4 <sup>a,b</sup> 3/4 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>	1/4 <sup>a,b</sup> 1/4 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>
Galline	1/4 <sup>a,§</sup> 1/4 <sup>a,§§</sup>	0/4 <sup>a,§</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>	1/4 <sup>a,b</sup> 1/4 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>	0/4 <sup>a,b</sup> 0/4 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>
Oche	0/2 <sup>a,§</sup> 0/2 <sup>a,§§</sup>	0/2 <sup>a,§</sup> 0/2 <sup>a,§§</sup>	0/2 <sup>a,b</sup> 0/2 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>	0/2 <sup>a,b</sup> 0/2 <sup>a,c</sup> 0/4 <sup>a,§§</sup>

<sup>1</sup> IZSUM, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche <sup>2</sup> CRN, Centro di Referenza Nazionale per i virus influenzali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Padova \*pool di 5 soggetti <sup>a</sup> Numero dei pool positivi / Numero dei pool saggiati <sup>b</sup> Positività alla "PCR Real-time", sottotipo H7N1 <sup>c</sup> Positività alla "PCR reverse transcriptase", sottotipo H7N1 <sup>§</sup> Positività rilevata in PCR <sup>§§</sup> Positività all'isolamento virale su uova embrionate di pollo;

In una fase successiva il CRN ha confermato la positività virologica nei confronti del virus dell'IA sottotipo H7N1, previo utilizzo della metodica PCR Real-Time in 1 pool di tamponi cloacali appartenenti ai tacchini e 1 pool di tamponi tracheali delle galline. Nessun altro rilievo positivo è stato accertato con questa metodica nei restanti animali. Le indagini condotte con la PCR Reverse transcriptase hanno rilevato positività al virus dell'IA sottotipo H7N1 in 3 pool di tamponi tracheali e 1 di tamponi cloacali appartenenti ai tacchini. Inoltre lo stesso CRN rilevava positività anche da 1 pool di tamponi tracheali effettuati nelle galline. Nessuna altra positività veniva accertata nei campioni rimanenti (Tabella 3).

Le prove di isolamento virale non rilevavano positività, mentre i risultati dei sequenziamenti genomici condotti sulla sequenza amminoacidica dell'emoagglutinina, confermavano la presenza di uno stipite LPAI.

### Discussione

Il focolaio di influenza aviaria accertato nella Regione Marche nel luglio del 2009 è stato il primo ad essere caratterizzato come sottotipo H7N1 a bassa patogenicità nel territorio sopramenzionato. Focolai simili sono stati accertati nel Marzo del 1999 nel nord Italia e in Cile ed identificati poi come sottotipi H7N1 (Zanella et al., 2003; Mutinelli et al., 2003; Rojas et al., 2002). Il virus

successivamente si è diffuso e trasformato in uno stipite ad alta patogenicità nel dicembre dello stesso anno. In quel periodo più di 14 milioni di volatili sono stati abbattuti per l'epidemia occorsa. Lo stesso virus è riapparso nel 2000 sottoforma di virus a bassa patogenicità e risale a questo stesso periodo anche l'applicazione, per la prima volta in Italia, della profilassi immunizzante realizzata con strategia DIVA (differentiating infected from vaccinated animals), ovvero con l'impiego di un vaccino che consente di differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati. Nel maggio del 2000 il virus veniva eradicato, a seguito della vaccinazione ed in concomitanza di un intenso programma di sorveglianza (Capua et al., 2003).

Nella Regione Marche dopo l'accertamento del focolaio di IA, sono state prese misure di contenimento dell'infezione virale. Queste hanno previsto la distruzione di tutti gli animali presenti nell'azienda e il rintraccio di eventuali soggetti venduti dall'accertamento diagnostico. Sono state inoltre effettuate tutte le misure di lavaggio e disinfezione in base al Piano Nazionale e al Piano Regionale per Influenza Aviaria emanati nel 2010 dal Ministero della Salute e dalla Regione Marche. In base a quest'ultimo i servizi veterinari hanno monitorato per i successivi 2 mesi diverse aziende avicole dislocate su tutto il territorio Regionale, non riscontrando alcuna positività sierologica.

Tutte le misure prese dalle Autorità Sanitarie, hanno avuto come scopo quello di limitare la diffusione dell'infezione del virus LPAI H7N1 in quanto, come è noto, questi agenti infettivi possono ricombinarsi e trasformarsi in virus HPAI. Diverse teorie suggeriscono che gli stipiti HPAI possono derivare da stipiti LPAI H5 e H7 per mutazione o ricombinazione genetica. Queste teorie sono derivate da studi di filogenesi secondo cui i virus ad alta patogenicità non costituiscono un genogruppo specifico, ma derivano da stipiti non patogeni. Le mutazioni che vengono rilevate nei diversi virus di IA, si creano durante il passaggio del virus dagli uccelli selvatici ai polli.

Tuttavia le mutazioni della virulenza sono imprevedibili e si possono verificare al momento dell'introduzione del virus nei polli o dopo diversi mesi che questi sono circolati negli stessi. Questa ipotesi è stata dimostrata da Munster et al., (2005) i quali hanno evidenziato una elevata similarità genetica ed antigenica tra virus LPAI rilevati nei selvatici e virus HPAI che hanno causato focolai nei domestici. In conclusione, negli ultimi anni in Italia si sono verificati diversi focolai sostenuti da virus LPAI, con particolare riferimento ai sottotipi H7.

Poiché questi sono i precursori di stipiti HPAI, il loro controllo deve essere effettuato negli animali domestici e deve essere costante su tutto il territorio nazionale.

## Bibliografia

- Capua I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez JF. (2003) "Development of a DIVA (different infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza" *Avian Pathology*, n.32, pag. 47-55.
- Capua I., Alexander DJ. (2004) "Avian influenza: recent developments" *Avian Pathology* n. 33, pag. 393-404.
- Capua I., Alexander DJ. (2007a) "Animal and Human Implications of Avian Influenza Infections" *Bioscience Report* n. 27, pag. 359-372.
- Capua I., Marangon S. (2007b) "Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario" *Vaccine* n. 25, pag. 5645-5652.
- Knipe DM., Howley PM. *Fields Virology. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, vol. 1. Philadelphia Press, 2001. pp. 1487- 1579.
- Mutinelli F., Capua I., Terregino C., Cattoli G. (2003) "Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low-and high-patogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000". *Avian Diseases* n. 47, pag. 844-848.
- Munster VJ., Wallensten A., Baas C., Rimmelzwaan GF., Schutten M., Olsen B. (2005) "Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe" *Emerging Infectious Diseases*, n. 11(10), pag. 1545-1551.
- Rojas H., Moreira R., Avalos P., Capua I., Marangon S. (2002) "Avian influenza in poultry in Chile" *Veterinary Record*, n. 151, pag. 188.
- Zanella A. (2003) "Avian influenza attributable to serovar H7N1 in light layers in Italy" *Avian Diseases*, n. 47 (3 Suppl), pag. 1177 - 1180.

## Affiliazione

Petrini S.(a), Paniccià M.(a), Duranti A.(b), Iacchia G.(c), Iscaro C.(a), Costarelli S.(a), De Mia G.M.(a), Fortunati M.(a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, via G. Salvemini 1, 06126 Perugia (PG)

(b) Osservatorio Epidemiologico Veterinario, Regione Marche, Via Cupa di Posatora 3, 60126, Ancona (AN)

(c) Azienda Sanitaria Unica Regionale (ASUR), Regione Marche, Zona Territoriale 11,C.da San Martino 8, 63023, Fermo (FM)



Rilievo di un focolaio di influenza aviaria a bassa patogenicità nel centro Italia - Survey of a low pathogenic avian influenza outbreak in central Italy between 2002 and 2007 by Petrini S., et al. is licensed under a Creative Commons Attribution 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: <a href="mailto:bie@izsum.it">bie@izsum.it</a>
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: <a href="mailto:editoria@izsum.it">editoria@izsum.it</a> ; <a href="mailto:redazione-spvet@izsum.it">redazione-spvet@izsum.it</a> <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> ; <a href="http://indice.spvet.it">http://indice.spvet.it</a>
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: <a href="mailto:URP@izsum.it">URP@izsum.it</a>