

SORVEGLIANZA ATTIVA PER INFLUENZA AVIARIA NEI VOLATILI SELVATICI NEL NORDEST ITALIA: RISULTATI ATTIVITÀ 2017-2018

Azzolini A.¹, Fornasiero D.¹, Scolamacchia F.¹, Gobbo F.², Salviato A.³, Cunial G.¹, Dalla Costa A.¹, Di Martino G.¹, Terregino C.^{2,3}, Mulatti P.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS4 - Epidemiologia Veterinaria - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS6 - Virologia speciale e sperimentazione - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

³*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCS5 - Ricerca e Innovazione - Viale dell'Università 10, 35020 - Legnaro (Pd)*

Summary

Wild aquatic birds are considered the natural reservoir of avian influenza (AI) viruses, posing a continuous threat for their direct and indirect introduction of into the domestic poultry sector. Novel Avian Influenza viruses are known to be introduced by migratory birds; however, the role of residential wild bird populations is still not completely understood, although they could be related with the maintenance, amplification and local spread of AI viruses. Following the H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) of 2016-2018, the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie drafted some ancillary active surveillance measures for AI in wild populations, to complement the passive surveillance already in force. Hereby the results of activities carried out in between 2017 and 2018 are shown, with the aim of deepening the knowledge on the circulation of AI viruses in both migratory and residential wild birds in Northeast Italy.

INTRODUZIONE

La sorveglianza passiva è la principale strategia attuata in Italia per l'individuazione di virus influenzali circolanti in popolazioni di volatili selvatici. Questo tipo di sorveglianza si basa sul rilevamento in campo di esemplari di volatili morti, o con sintomatologia clinica associabile ad Influenza Aviaria (IA).

La sorveglianza passiva risulta uno strumento efficace nell'individuazione di circolazione di virus ad alta patogenicità, data l'alta mortalità della malattia (Breed et al., 2012, DeLiberto et al., 2009, Knight-Jones et al., 2010). Il successo di questa strategia dipende dalla rapida capacità di mettere in evidenza i nuovi casi, dall'efficienza di spedizione dei campioni ai laboratori diagnostici qualificati, alle tempestive analisi, alla segnalazione immediata dei risultati diagnostici e alla veloce implementazione di protocolli prestabiliti in caso di positività. Il principale limite di questo approccio, tuttavia, è legato al fatto che la maggior parte degli eventi di morbilità e mortalità possano passare inosservati se coinvolgono pochi soggetti, o se avvengono in aree poco frequentate dagli esseri umani, o possono non risultare utili ai fini diagnostici in caso di predazione o decomposizione delle carcasse (DeLiberto et al., 2009). Un altro importante limite consiste nella difficoltà di utilizzare la sorveglianza passiva per individuare la circolazione di ceppi di IA a bassa patogenicità, con bassa mortalità e individui asintomatici (Baumer et al., 2010; Flint et al., 2015; Galletti et al., 2018; Breed et al., 2012; Hjulsgaard et al., 2012).

I limiti della sorveglianza passiva evidenziati in letteratura sono emersi anche nel contesto dell'epidemia di IA ad alta patogenicità (HPAI) sostenuta dal ceppo virale H5N8, re-

sponsabile di 83 focolai negli allevamenti domestici tra il 2016 e 2018, principalmente nelle regioni del nord Italia. Come suggerito dallo scarso numero di casi individuati nei volatili selvatici, confronto a quanto osservato negli altri stati europei (Verhagen et al., 2017; Mulatti et al., 2018), le attività di sorveglianza sono verosimilmente risultate non ottimali per la valutazione della circolazione virale nella popolazione selvatica. L'inefficacia del sistema è probabilmente dovuta alla mancanza di precise e uniformi istruzioni operative sulle modalità di raccolta, conservazione e consegna dei volatili trovati morti per la ricerca dei virus. Le carenze evidenziate nel sistema di sorveglianza passiva impongono la necessità di strutturare in maniera sistematica i piani di campionamento per l'avifauna selvatica, tenendo in considerazione: le popolazioni stanziali, i periodi di migrazione, e l'ecologia delle diverse popolazioni di volatili acquatici selvatici presenti sul territorio. Per questo motivo, tra il 2017 e 2018 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ha pianificato ed attuato una serie di attività volte ad intensificare la sorveglianza per IA nelle popolazioni di volatili selvatici presenti in Italia. Queste attività rientrano in programmi di sorveglianza attiva per la valutazione della circolazione di virus influenzali nell'avifauna acquatica migratoria e nelle popolazioni dei selvatici stanziali, oltre ad un programma di campionamento ambientale di raccolta di feci fresche.

MATERIALI E METODI

Sorveglianza attiva per IA nell'avifauna acquatica migratoria

La sorveglianza attiva nell'avifauna acquatica migratoria è stata basata su campioni raccolti da volatili selvatici abbattuti durante attività venatorie. Il campionamento è stato condotto tra il 2017 e il 2019 in alcune valli da pesca della Provincia di Rovigo (Porto Levante, Porto Viro e Porto Tolle), nel corso delle stagioni di caccia (tra settembre e gennaio), con frequenza settimanale. Su ciascun volatile cacciato è stato effettuato un tampone oro-tracheale e un tampone cloacale. Le attività di prelievo sono state svolte dal personale dell'IZSVe con il supporto operativo di Federcaccia, in collaborazione con la Provincia di Rovigo.

I campioni sono stati trasportati a temperatura controllata nell'arco della stessa giornata di prelievo, e successivamente conservati in congelatore a -80°C. La processazione dei campioni raccolti comprendeva uno *screening* iniziale mediante rRT-PCR specifica per l'individuazione del gene M, per individuazione di virus influenzali di tipo A. I campioni positivi sono stati successivamente sottoposti a rRT-PCR specifiche per identificare eventuali ceppi H5, H7 e H9. Per i sottotipi H5 e H7 è stata inoltre effettuata l'analisi del sito di clivaggio al fine di determinare il tipo di patogenicità (bassa o alta). I campioni risultati positivi alle indagini molecolari sono stati successivamente destinati all'isolamento virale in uova embrionate di pollo.

Sorveglianza attiva per IA nell'avifauna acquatica stanziale

Nel corso del 2018, l'IZSVe ha avviato una collaborazione con l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) per definire attività di sorveglianza al fine di valutare la prevalenza di virus influenzali circolanti nelle popolazioni di anatidi selvatici residenziali nel nord-est Italia. Le attività sono state condotte tra luglio e settembre, periodo a limitata presenza di anatidi migratori nella zona di studio.

Con il supporto di ISPRA, sono state individuate cinque zone umide idonee al posizionamento di trappole per la cattura e il campionamento di volatili acquatici selvatici. Le

aree scelte per le catture dei volatili e i successivi campionamenti sono: Valle Cavallino (VE), Valle Morosina (PD), Oasi del Busatello (VR), Valle di Campotto (FE) e Cave Danesi (CR).

Le trappole installate in ciascuna valle sono state controllate con cadenza settimanale da ornitologi qualificati, e su ciascun individuo catturato sono stati effettuati tamponi cloacali e oro-tracheali per la ricerca dei virus dell'IA, come precedentemente descritto.

Sorveglianza per IA tramite campionamento ambientale

La raccolta di campioni ambientali è stata condotta in Valle Figheri (Campagna Lupia, in Provincia di Venezia), territorio già interessato in precedenza dalla circolazione di virus HPAI H5N8, nel corso dell'epidemia del 2016-2017. Le attività si sono svolte nel periodo compreso tra marzo e ottobre 2018, mesi caratterizzati dalla commistione di specie selvatiche migratorie e stanziali sullo stesso territorio. Nel corso dei sopralluoghi sono stati prelevati campioni di feci fresche in provette sterili da 50 ml e successivamente trasportati refrigerati presso i laboratori dell'IZSVE per le successive analisi. Queste prevedevano lo stesso protocollo sopra descritto per i campioni provenienti da tamponi cloacali e tracheali; in aggiunta, sulle stesse matrici fecali sono stati condotti test molecolari per l'identificazione delle specie aviarie, in modo tale da raccogliere informazioni utili per lo studio delle dinamiche di popolazione e dell'ecologia dei virus influenzali sul territorio.

RISULTATI

Durante le stagioni di caccia 2017-18 e 2018-19, sono state organizzate 12 giornate di campionamento in sette diverse valli da pesca nella Provincia di Rovigo. In totale 1912 campioni costituiti da tamponi tracheali e cloacali sono stati raccolti e analizzati (Tabella 1). Complessivamente, 55 campioni (pari al 2,9% del totale di tamponi cloacali e tracheali) sono risultati positivi per presenza di virus influenzale tipo A (gene M). Tra questi, sono stati identificati 7 campioni positivi per il sottotipo H5, 2 per il sottotipo H7 e 4 per l'H9, tutti a bassa patogenicità.

Tabella 1. Positività dei campioni (tamponi tracheali e cloacali) raccolti da volatili cacciati e analizzati nel corso del 2018

Luogo del prelievo	Totale campioni	Influenza A (gene M)	Positivi H5	Positivi H7	Positivi H9
Boccasette - Porto Tolle	98	7	2	0	1
Ca' Pasta - Porto Viro	584	19	4	1	1
Ca' Zuliani - Porto Tolle	180	13	1	0	1
Ca' Sacchetta - Porto Levante	672	10	0	1	0
Valchiusa - Porto Tolle	240	3	0	0	1
Ca' Pisani - Porto Viro	88	2	0	0	0
Valle Spolverina - Porto Tolle	50	1	0	0	0
Totale	1912	55	7	2	4

Le attività di campionamento svolte nel corso del 2018 sull'avifauna acquatica stanziale hanno permesso di raccogliere campioni da un totale di 591 individui (Tabella 2). A causa di alcuni problemi tecnici legati al corretto posizionamento ed attivazione delle trappole, la cattura dei volatili è stata svolta principalmente durante il mese di agosto. Le specie più frequentemente campionate sono state la marzaiola (*Anas querquedula*, per un totale di 274 soggetti) ed il germano reale (*Anas platyrhynchos*, per un totale di 260 soggetti).

Sono risultati positivi per virus influenzali un totale di 29 tamponi oro-tracheali (4,9% dei tamponi tracheali totali) e 59 tamponi cloacali (10% dei tamponi cloacali totali). Solo due tamponi cloacali (0,34%) hanno dato esito positivo per presenza di virus sottotipo H9, mentre nessun campione è risultato positivo per H5 e H7 (Tabella 3).

Tabella 2. Numero di volatili selvatici campionati per sito di cattura nel 2018

Luogo	Specie	Numero
Valle Cavallino/ Valle Morosina	Gallinella d'acqua	1
	Germano reale	187
	Marzaiola	274
	Alzavola	13
Oasi Busatello	Gallinella d'acqua	12
	Germano reale	50
Valle dell'Oglio	Alzavola	8
	Folaga	6
	Gallinella d'acqua	17
	Germano reale	18
Valli di Campotto	Germano reale	5
	Totale	591

Tabella 3. Esito degli esami virologici eseguiti sui campioni raccolti nell'ambito del piano pilota di sorveglianza attiva per AI negli anatidi selvatici residenziali

Specie	Tamponi oro-tracheali				Tamponi cloacali			
	Influenza virus A	H5	H7	H9	Influenza virus A	H5	H7	H9
Alzavola	0	-	-	-	2	0	0	0
Germano reale	7	0	0	0	38	0	0	1
Marzaiola	22	0	0	0	19	0	0	1

Nel periodo compreso tra la metà di marzo e la metà di ottobre 2018, sono stati raccolti un totale di 1881 campioni ambientali (feci) nel corso di 13 giornate di campionamento, nel territorio di Valle Figheri (VE). Sedici campioni (0,9% del totale dei campioni ambientali) sono risultati positivi per il Influenzavirus A, e solo un

campione (1/1881; 0,06%) è risultato positivo per H7. La fase di sviluppo, validazione ed implementazione di test molecolari per l'identificazione di specie di volatili selvatici, ha permesso di arrivare all'automatizzazione della procedura di estrazione degli acidi nucleici e messa a punto di nuovi protocolli. I risultati ottenuti hanno permesso di processare 399 campioni dei 1881 raccolti. In particolare, i lotti sottoposti ad analisi sono stati quelli corrispondenti alle ultime 4 giornate di campionamento di questo studio, fra fine agosto ed inizio ottobre 2018. Le specie identificate e la relativa numerosità sono riportate in Tabella 4. Dei 399 campioni processati ed analizzati ne sono stati identificati il 76% (n = 305), il 3% (n = 11) è risultato non sequenziabile, mentre per il restante 21% (n = 83) non è stato possibile risalire alla specie esatta.

Tabella 4. Specie identificate e relativa numerosità nei campioni processati

Specie	N. campioni identificati	Percentuale campioni identificati
Oca selvatica (<i>Anser anser</i>)	201	66%
Germano reale (<i>Anas platyrhynchos</i>)	38	12%
Fagiano (<i>Phasianus colchicus</i>)	3	1%
Alzavola (<i>Anas crecca</i>)	2	1%
Oca lombardella (<i>Anser albifrons</i>)	2	1%
Canapiglia (<i>Anas strepera</i>)	58	19%
Totale campioni identificati	304	100%

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La raccolta di tamponi durante la stagione venatoria (settembre – gennaio) coincide con un'elevata presenza di volatili migratori nelle aree di studio. I risultati ottenuti sembrano indicare una continua circolazione di ceppi influenzali nei migratori con il conseguente rischio di *spill-over* verso le popolazioni stanziali e/o verso allevamenti di pollame. Il rafforzamento dell'attività di sorveglianza sui volatili cacciati permetterebbe di acquisire maggiori informazioni sulla circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici migratori. Tali informazioni potrebbero essere utilizzati per valutare qualitativamente il rischio di introduzione sul territorio nazionale di virus dell'influenza aviaria.

Le misure di sorveglianza attiva nelle popolazioni selvatiche stanziali, sono da considerarsi una fase pilota avviata con lo scopo di testare l'applicabilità delle misure previste, e numerose criticità sono state riscontrate, soprattutto di carattere logistico, che hanno portato a ritardare l'inizio delle attività e alla conseguente raccolta di un numero di campioni insufficiente per acquisire informazioni attendibili sulla circola-

zione del virus. Le conoscenze acquisite hanno però permesso di rimodulare il piano per il 2019, anticipando il momento di posizionamento delle trappole e l'inizio delle attività di pasturazione con il conseguente aumento dello sforzo di campionamento. Per il 2019 inoltre è in fase di definizione l'ampliamento dell'area di studio, incrementando il numero di trappole installate nelle zone a rischio. Questo permetterebbe di studiare con successo la prevalenza dei virus influenzali nelle popolazioni stanziali, fornendo importanti informazioni circa la possibilità di amplificazione dell'influenza aviaria nelle popolazioni selvatiche locali e della potenziale diffusione della malattia.

La raccolta e l'analisi di campioni fecali è già stata utilizzata in attività di sorveglianza nelle popolazioni di uccelli selvatici (Lee et al. 2010; Pannwitz et al. 2009). I vantaggi principali di questo metodo sono la facilità di raccolta di un notevole numero di campioni senza dover catturare i soggetti, con un conseguente abbattimento dei costi di campionamento. La valle selezionata è stata utilizzata per una prima fase pilota, al fine di definire e testare le metodiche di analisi. Si valuterà nel corso dei prossimi mesi se estendere l'area di studio. I test virologici e molecolari sviluppati ed applicati ai campioni ambientali raccolti hanno permesso di acquisire informazioni sulle dinamiche di circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici, e di identificare con discreto successo le specie eliminatrici. Per avere dei protocolli maggiormente performanti e in grado di identificare il maggior numero di ospiti, sarebbe auspicabile testare ulteriori campioni di feci in modo tale da migliorare il processo di identificazione delle specie maggiormente associate all'introduzione e al mantenimento di virus influenzali nelle aree di studio.

Le attività di sorveglianza implementate tra il 2017 e il 2018 hanno permesso di acquisire informazioni utili circa le dinamiche di circolazione dei virus influenzali nei volatili selvatici. Sebbene misure di sorveglianza passiva siano insostituibili nell'ottica di definizione di sistemi di *early detection* e *early warning* per l'introduzione di ceppi influenzali ad alta letalità o con sintomatologia molto evidente, le attività dei tre studi pilota possono considerarsi come misure ancillari, da realizzarsi in maniera mirata sia nel tempo che nello spazio. I risultati osservati indicano una prevalenza molto bassa di circolazione virale, il che comporta numerosità campionarie elevatissime al fine di escludere (o individuare) la presenza di malattia attraverso misure di sorveglianza attiva. Tuttavia il loro utilizzo potrebbe essere circoscritto ai periodi migrazione e alle zone umide a maggiore attrattività per i volatili migratori. L'applicazione delle misure dovrebbe quindi essere preceduta da un'attenta analisi di rischio, e da studi di *horizon scanning* per valutare la situazione epidemiologica in altri Paesi, e l'effettiva probabilità di introduzione di nuovi ceppi virali.

BIBLIOGRAFIA

1. Baumer A, Feldmann J, Renzullo S, Müller M, Thür B and MA Hofmann. (2010). Epidemiology of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Switzerland Between 2006 and 2009. *Avian Dis.* 54: 875–884.
2. Breed AC, Irvine RM, Duncan D, Rae D, Snow L, Cook AJC and IH Brown. (2012). An Evaluation of Wild Bird Avian Influenza Surveillance in Great Britain. *Avian Dis.* 56: 986–991.
3. DeLiberto TJ, Swafford SR, Nolte DL, Pedersen K, Lutman MW, Schmit BB, Baroch JA, Kohler DJ and A Franklin. (2009). Surveillance for highly pathogen-

- ic Avian Influenza in wild birds in the USA. *Integr. Zool.* 4: 426–439.
4. Flint PL, Pearce JM, Franson JC and DV Derksen. (2015). Wild bird surveillance for highly pathogenic Avian Influenza H5 in North America. *Virology* 12.
 5. Galletti G, Santi A, Guberti V, Paternoster G, Licata E, Loli Piccolomini L, Procopio A and M Tamba. (2018). A method to identify the areas at risk for the introduction of Avian Influenza virus into poultry flocks through direct contact with wild ducks. *Transbound. Emerg. Dis.* 65: 1033–1038.
 6. Hjulsgaard CK, Breum SØ, Trebbien R, Handberg KJ, Therkildsen OR, Madsen JJ, Thorup K, Baroch JA, DeLiberto TJ, Larsen LE, and PH Jørgensen. (2012). Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007–10. *Avian Dis.* 56: 992–998.
 7. Knight-Jones TJD, Hauser R, Matthes D and KDC Stark. (2010). Evaluation of effectiveness and efficiency of wild bird surveillance for Avian Influenza. *Vet. Res.* 41: 50.
 8. Lee DH, Lee HJ, Lee YJ, Kang HM, Jeong OM, Kim MC, Kwon JS, Kwon JH, Kim CB, Lee JB, Park SY, Choi IS and CS Song. (2010). DNA barcoding techniques for Avian Influenza virus surveillance in migratory bird habitats. *J Wildl Dis.* 46:649-54.
 9. Mulatti P, Fusaro A, Scolamacchia F, Zecchin B, Azzolini A, Zamperin G, Terregino C, Cunial G, Monne I and S Marangon. (2018). Integration of genetic and epidemiological data to infer H5N8 HPAI virus transmission dynamics during the 2016-2017 epidemic in Italy. *Sci. Rep.* 8: 18037.
 10. Pannwitz G, Wolf C and T Harder. (2009). Active surveillance for Avian Influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *J Wildl Dis.* 45:512-8.
 11. Verhagen JH, Lexmond P, Vuong O, Schutten M, Guldemeester J, Osterhaus ADME, Elbers ARW, Slaterus R, Hornman M, Koch G and RAM Fouchier. (2017). Discordant detection of Avian Influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs. *PLoS One* 12: 1–21.