

STUDIO DELLA REPLICAZIONE E TRASMISSIONE IN POLLO, TACCHINO E FARAONA DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA H5N8 AD ALTA PATOGENICITA' RESPONSABILE DELL'EPIDEMIA EUROPEA 2019/20 E CONFRONTO CON IL VIRUS H5N8 DEL 2016/17

Bortolami A.¹, Mazzetto E.¹, Verin R.², Zanardello C.¹, Panzarin V.¹, Scolamacchia F.¹, Terregino C., Bonfante F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia;

² Università di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD), Italia.

Summary

Avian influenza is one of the avian diseases with the highest impact on the poultry sector, in particular highly pathogenic avian influenza viruses (HPAI) in the last twenty years have been responsible of large scale epidemics in the European countries with an increasing frequency. HPAI viruses are characterized by high morbidity and mortality in domestic poultry species and during the last epidemics caused the death or the culling of millions of birds with an enormous economic impact. In this study, we characterized the pathogenicity, infectivity and transmissibility of the first isolate (H5N8/19) of the ongoing epidemic started in December 2019. The same phenotypic traits were studied for an isolate of the 2016/2017 epidemic (H5N8/17). To investigate the pathobiology of those viruses we performed experimental infection in three Gallinaceous species considered relevant for the Italian and European poultry sector: chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). We aimed to determine the viral dose necessary to elicit an infection in susceptible fully-grown birds, the clinical symptoms, the viral excretion of infected birds and the transmission parameters to susceptible contact birds. The results obtained have shown a poor adaptation of both HPAI viruses to domestic poultry and to Galliformes in particular, as it can be inferred by the high bird infectious dose determined in this study. However, the slow progression of the disease resulting in prolonged viral shedding might compensate for the poor adaptation of the viruses of the 2.3.4.4B lineage. In guinea fowls, a species in which the pathology of HPAI viruses is less studied compared to chicken and turkey, the challenge viruses demonstrated high virulence, causing death in less than 48 hours, in absence of overt clinical disease. With relevance to AI surveillance programs, the guinea fowls were asymptomatic before death. The data are the first available describing the phenotypic behavior of the H5N8 HPAI A/turkey/Poland/23/2019 and remarks the importance of the determination of the characteristics and pathogenesis of emerging viruses aiming to produce results useful for the preparation of tailored surveillance and control programs and to better define the risk posed to the public health.

INTRODUZIONE

Il virus dell'influenza aviaria (IAV), ad oggi, è uno dei patogeni che maggiormente impattano in termini economici e sanitari il settore della produzione avicola. Gli IAV, a seconda delle caratteristiche genetiche e fenotipiche, si possono distinguere in virus a bassa patogenicità (LPAI) e in virus ad alta patogenicità (HPAI). I virus HPAI, a differenza dei virus LPAI, sono in grado di diffondersi rapidamente a livello sistemico

provocando nell'ospite una malattia con alti tassi di mortalità. Nell'ultimo ventennio la maggior parte delle epidemie di HPAI sono state causate da introduzioni multiple di virus presenti nella popolazioni di uccelli selvatici in allevamenti di avicoli domestici. In particolare a partire dal 2014 in Europa si registrano focolai causati da virus del sottotipo H5NX appartenenti lineaggio 2.3.4.4. Questi virus sono stati rilevati per la prima volta nel 2010 in Cina (Zhao et al., 2013), e la loro diffusione ha permesso di categorizzarli in due ulteriori sottogruppi denominati A (Buan-like: A/Broiler-duck/Korea/Buan2/2014) e B (A/breeder-duck/Korea/Gochang1/2014, Gochang-like). La prima introduzione in Europa del virus H5N8 2.3.4.4 risale al 2014 e si limitò ad alcuni focolai in Italia, Germania, Olanda e Regno Unito (Adlhoch et al., 2014), mentre a partire dal 2016/17 una seconda ondata diede inizio ad una pandemia che coinvolse assieme all'Europa, 48 paesi in tutto il mondo (<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2018/>). Dopo circa un anno di stasi, nel dicembre del 2019 un nuovo focolaio causato da un H5N8 HPAI (A/turkey/Poland/23/2019) in un allevamento di tacchini in Polonia segnò l'ingresso di un nuovo virus ad alta patogenicità in Europa. Ad oggi questo virus è responsabile di circa oltre 300 focolai in diverse nazioni dell'Europa Centro Orientale. La grande capacità di ricombinazione e riassortimento genetico, predispone i virus influenzali ad acquisire caratteristiche patogenetiche sempre nuove e difficili da prevedere sulla base delle sole analisi filogenetiche. In questo senso diventa imprescindibile l'utilizzo di studi *in vivo* condotti in modelli animali per definire il fenotipo virale del virus emergente. A tal fine, lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere l'efficienza di trasmissione, il tessuto tropismo e la patogenesi del virus H5N8/19 e di compararlo con il virus H5N8/17 della precedente epidemia nel pollo, nel tacchino e nella faraona.

MATERIALI E METODI

Isolamento e produzione dei lotti virali

Il virus dell'influenza ad alta patogenicità (HPAI) A/turkey/Italy/17VIR9106-2/2017 (H5N8/17, GISAID ID: EPI_ISL_316550) e il virus HPAI A/turkey/Poland/23/2019 (H5N8/19, GISAID ID: EPI_ISL_402134) sono stati isolati da pool di organi di animali infetti prelevati durante i focolai italiani delle rispettive epidemie. L'isolamento è stato eseguito mediante l'inoculo in uova embrionate SPF (specific pathogen free) secondo quanto previsto dalle procedure standard in uso presso il laboratorio di Virologia Speciale e Sperimentazione animale (SCS-6) dell'IZSVe. Il liquido allantoideo raccolto dall'isolamento virale è stato successivamente titolato mediante diluizioni seriali inoculate in uova SPF embrionate. Per ognuno dei virus la dose infettante il 50% delle uova embrionate (EID₅₀) è stata estrapolata mediante l'utilizzo della formula di Reed-Muench.

Animali utilizzati negli esperimenti e condizioni di stabulazione

Per la valutazione delle caratteristiche fenotipiche dei virus precedentemente descritti sono state scelte le seguenti specie avicole: Polli di razza White Leghorn (*Gallus gallus*; schiusi ed allevati presso la sede centrale dell'IZSVe, Legnaro, Italia), tacchini femmine razza White wide-breasted (*Meleagris gallopavo*; Società agricola la Pellegrina, Italia) e faraone (*Numida meleagris*; La Corte, Italia). Gli animali sono stati acclimatati, identificati e stabulati in isolatori Montair 1900 (Montair Process Technology B.V., Olanda) in condizioni di pressione negativa e con sistemi di filtrazione dell'aria in

ingresso e in uscita con filtri ad alta efficienza (*high efficiency particulate air*; HEPA), presso lo stabulario dell'IZSve, in modo da garantire un adeguato livello di biocontenimento e biosicurezza (BSL-3). Da ogni animale è stato prelevato un campione di sangue per valutare la presenza di anticorpi contro l'influenza tramite metodica ELISA (FlockCheck Avian Influenza MultiS-Screen Antibody Test®, IDEXX Laboratories, ME, USA). Inoltre, al momento dell'arrivo, su tutti i soggetti acquistati da allevamenti commerciali (faraone e tacchini) sono stati effettuati tamponi orofaringei (OF) e cloacali (CL) per assicurare l'assenza di infezioni causate da IAV. Tale indagine è stata eseguita utilizzando una RRT-PCR diretta verso il gene M dell'influenza 'H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5- and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately 103 to 104 gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI. Tutte le procedure sono state effettuate in stretto accordo con il decreto del Ministero della salute n. 26 del 4 marzo 2014 riguardante la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, decreto che implementa la Direttiva del Consiglio 2010/63/UE.

Dose infettante media

Per entrambi i virus si è voluto calcolare la dose media in grado di infettare il 50% degli animali (BID_{50}) di ognuna delle tre specie. Gli animali ($n=15$ per ogni specie) sono stati suddivisi in gruppi di 5 animali ed ogni gruppo è stato infettato per via oro-nasale con le seguenti dosi: $10^{4.0}$, $10^{5.0}$ e $10^{6.0}$ $EID_{50}/100 \mu l$. Al fine di identificare i soggetti positivi, ogni animale è stato monitorato quotidianamente mediante il prelievo di tamponi OP e CL. Non appena prelevati, i tamponi sono stati conservati a $-80^{\circ}C$ fino al momento delle analisi. Per l'identificazione del gene M alla RRT-PCR i tamponi sono stati scongelati ed immersi in soluzione salina tampone antibiotata. L'estrazione dell'RNA virale è stata ottenuta a partire da $300 \mu l$ di campione utilizzando il QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit e l'estrattore automatico QIASymphony® SP, secondo le indicazioni fornite dal produttore. Per il controllo della fase di estrazione si è scelto di utilizzare un controllo interno esogeno Intype IC-RNA (Indical). La quantificazione del genoma virale è stata quindi ottenuta tramite metodica RRT-PCR utilizzando il kit QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen) 'H5 and H7 hemagglutinin subtype-specific probe sets were developed based on North American avian influenza virus sequences. The RRT-PCR assay utilizes a one-step RT-PCR protocol and fluorogenic hydrolysis type probes. The matrix gene RRT-PCR assay has a detection limit of 10 fg or approximately 1,000 copies of target RNA and can detect 0.1 50% egg infective dose of virus. The H5- and H7-specific probe sets each have a detection limit of 100 fg of target RNA or approximately 103 to 104 gene copies. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay were directly compared with those of the current standard for detection of influenza virus: virus isolation (VI. Un RNA sintetico utilizzato come standard è stato prodotto seguendo la procedura riportata nel MEGAShortscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen). I dati sono quindi stati analizzati utilizzando il software Bio-Rad CFX Manager software (Version 3.1).

Patogenesi

Gruppi di 8 o 9 animali per ogni specie sono stati infettati per via oculo-nasale con una dose di $10^{6.0}$ EID₅₀ del virus H5N8/17 o del virus H5N8/19 al fine di valutare il tempo medio di decesso, il punteggio clinico, l'escrezione virale e la distribuzione virale nei tessuti. A tale scopo, ogni animale è stato monitorato su base giornaliera effettuando dei tamponi OP e CL e registrandone la sintomatologia secondo il seguente criterio di punteggio: 0 animale sano, 1 lievemente malato, 2 malato, 3 gravemente malato e 4 morto. Almeno due animali deceduti per gruppo sono stati sottoposti a necropsopia al fine di prelevare sezioni di trachea, polmone, cervello, timo, intestino tenue, pancreas colon, tonsille ciecali, milza e rene su cui eseguire le indagini istopatologiche e biomolecolari. I tessuti destinati alle analisi istopatologiche sono stati fissati in formalina e paraffina e successivamente colorati in ematossilina eosina per una valutazione istologica o processati mediante colorazione immunoistochimica per determinare la presenza della nucleoproteina del virus dell'influenza A.

Trasmissione

In ogni specie l'efficienza di trasmissione per entrambi i virus è stata valutata applicando il seguente schema sperimentale: quattro (n=4) animali infettati per via oro-nasale con una dose di 10^6 EID₅₀ sono stati messi a contatto con sei (n=6) sentinelle immunologicamente naïve. Per dieci giorni, dal momento dell'infezione, tutti gli animali sono stati monitorati quotidianamente sia per sintomatologia clinica, sia attraverso la raccolta di tamponi OF e CL. Assumendo un modello SIR, è stato ricostruito il processo di trasmissione all'interno di ogni gruppo sperimentale volto a determinare la trasmissibilità dei virus H5N8. A tal fine, i dati sono stati uniformati secondo un formato S, I, C e per ogni intervallo (Δt) è stato determinato il numero di animali infettivi (I), gli animali suscettibili (S) e il numero di infezioni per contatto (C) avvenute tra gli animali suscettibili. N rappresenta il numero di animali in vita per giorno. È stato considerato retrospettivamente un periodo di latenza di 1 giorno. Il tasso di trasmissione (β) è stato stimato utilizzando un modello lineare (distribuzione binomiale)^{2,3}. Per lo sviluppo del modello sono state stabilite le seguenti assunzioni: che tutti gli animali fossero ugualmente suscettibili, che tutti gli animali fossero ugualmente infettivi e che tutti gli animali fossero ugualmente infettivi per tutta la durata del loro periodo infettante. Inoltre, è stato assunto che ogni animale infetto costituisca un rischio indipendente per l'infezione di un animale suscettibile. Il tasso di riproduzione R può essere stimato prendendo il prodotto del β stimato e la durata media del periodo di infettività. Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software R v 3.5.3⁴.

Statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Graph Pad Prism 8.0. I dati sono stati confrontati mediante un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie. In caso di risultato significativo all'ANOVA, i confronti multipli (analisi post hoc) sono stati eseguiti utilizzando la correzione di Sidak. Il limite per definire la significatività statistica è stato stabilito con $p\text{-value} < 0.5$.

RISULTATI

Minima dose infettante

Per il virus H5N8/19 è stata osservata una BID₅₀ di $10^{4.9}$ EID₅₀ nel pollo, di $10^{5.6}$ EID₅₀

nel tacchino, e di $10^{5.3}$ EID₅₀ nella faraona. Valori molto simili sono stati registrati per le tre specie anche nella prova di infezione con il virus H5N8/17 (pollo $10^{5.2}$ EID₅₀, tacchino $10^{5.30}$ EID₅₀, faraona $10^{5.1}$ EID₅₀) confermando la necessità di una dose di infezione maggiore nel tacchino rispetto al pollo e alla faraona per infettare almeno la metà degli animali.

Patogenesi

La sintomatologia registrata per ogni animale direttamente infettato a livello sperimentale con il virus H5N8/19 o il virus H5N8/17 è stata riportata nei grafici di Figura 1. Come si evince dall'immagine, il decorso della malattia nel pollo è comparabile nei due gruppi infettati: indipendentemente dal virus, gli animali hanno mostrato sintomatologia grave entro i 2 giorni dall'inizio dell'infezione, portando a morire tutti gli animali entro i 3-5 giorni. Anche le MDT dei due virus risultano essere molto simili, con un ritardo di circa mezza giornata nel virus H5N8/19 (MDT di 4 giorni) rispetto al virus H5N8/17 (MDT di 3.57 giorni). Nei tacchini, nonostante il confronto tra i due virus abbia rilevato una MDT comparabile (H5N8/19 MDT di 5 giorni e H5N8/17 MDT di 5.33 giorni), la sintomatologia negli animali infettati con il virus H5N8/19 è apparsa più grave registrando valori significativamente più alti a due giorni post-infezione. Nelle faraone i segni clinici e la MDT (H5N8/19 MDT di 2.11 giorni e H5N8/17 MDT di 2.44 giorni) sembrano aver evidenziato un decorso della malattia più grave e rapido nel caso di infezione con il virus H5N8/19 ma a livello di sintomatologia le differenze significative tra i due virus rimangono limitate al secondo giorno post-infezione. La valutazione dell'escrezione media virale è stata quantificata mediante le analisi biomolecolari sui tamponi OP e CL raccolti giornalmente per tutta la durata della sperimentazione. Dalla figura 2 è possibile osservare la quantità genomica eliminata per via orofaringea e cloacale da ogni animale nel tempo. Tutti i tessuti raccolti per le indagini biomolecolari sono risultati positivi per la presenza di genoma virale. In particolare, sia nel pollo che nel tacchino, indipendentemente dal virus di infezione, il numero più alto di copie genomiche è stato osservato a livello di cervello, mentre nelle faraone, sia per il virus H5N8/17 che per il virus H5N8/19, i titoli virali più alti sono stati riscontrati principalmente nei polmoni. A conferma di quanto rilevato dalle analisi biomolecolari anche le indagini istopatologiche hanno evidenziato la presenza della nucleoproteina del virus influenzale nella maggior parte dei tessuti prelevati (Tabella 1).

Trasmissione

Tutti i polli infettati direttamente con il virus H5N8/19 e tutte le sentinelle esposte sono morti rispettivamente entro 4 e 7 giorni. Negli animali infettati l'escrezione del virus ha raggiunto il picco a 3 giorni post-infezione mentre le sentinelle hanno iniziato ad eliminare virus a partire dal quarto giorno post-esposizione. L'andamento dell'infezione è risultato molto simile anche nel gruppo infettato con il virus H5N8/17, a parte per un una delle sentinelle per la quale non è mai stata rilevata eliminazione virale, confermata dall'assenza di sieroconversione a 21 giorni post-esposizione. I tacchini inoculati con il virus H5N8/19 sono stati trovati morti entro i 5 giorni post infezione, mentre le rispettive sentinelle sono morte entro i 7 giorni post-esposizione. Nel gruppo di trasmissione del virus H5N8/17 è stato osservato un decorso della malattia più lento che ha portato gli animali direttamente infettati a morire entro i 6 giorni dall'infezione, mentre le sentinelle sono state ritrovate tutte morte entro gli 8 giorni post-esposizione. Nelle faraone,

indipendentemente dal virus utilizzato, il decorso della malattia negli animali infettati in modo diretto ha raggiunto la mortalità del 100% entro i 3 giorni post-infezione. Nel gruppo infettato con il virus H5N8/19 solo 3 sentinelle su 6 si sono infettate mentre nel gruppo infettato con il virus H5N8/17 la trasmissione è risultata più efficiente portando all'infezione di tutte le sentinelle esposte (Figura 4). Da questi dati l'analisi dell'efficienza di trasmissione ha estrapolato il tasso R e quindi la capacità dei due virus H5N8 di diffondere nelle tre diverse specie (Tabella 2).

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Nel corso del presente studio sono state analizzate le caratteristiche fenotipiche di virus rappresentativi dei virus responsabili delle ultime due ondate epidemiche in Europa (2016/2017 e 2019/2020) in un contesto emergenziale con lo scopo di fornire dati attuali ad epidemia in corso. I risultati ottenuti non hanno mostrato differenze sostanziali tra i due virus utilizzati nelle prove sperimentali, ma hanno dimostrato alcune importanti caratteristiche che sembrano essere conservate nel lineaggio 2.3.4.4B. L'elevata dose infettante richiesta per infettare le diverse specie avicole testate è estremamente elevata e atipica per dei virus HPAI ^{5,6}the emergence of closely related viruses in poultry has raised concerns that additional zoonotic transmissions of influenza viruses from poultry to humans may occur. In May 2001, an avian H5N1 influenza A virus was isolated from duck meat that had been imported to South Korea from China. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA. Questo dato suggerisce la necessità di un'esposizione ad alte cariche virali per l'instaurarsi dell'infezione in un allevamento ponendo quindi l'accento sull'importanza delle misure di biosicurezza per un efficace controllo della diffusione di questi virus poco adattati al pollame. I risultati invece ottenuti nelle prove di patogenesi hanno evidenziato una lenta progressione della malattia, come indicato da valori di MDT insolitamente elevati, che consentono agli animali infetti di eliminare virus per un periodo prolungato di tempo. Questo dato unito ai dati di eliminazione virale e di sintomatologia clinica osservati indicano la possibile esistenza di un intervallo di tempo significativo in cui il virus può essere escreto da animali infetti senza che questi dimostrino sintomatologia evidente, con possibili gravi ritardi nella notifica di sospetti. Nelle faraone invece il quadro osservato si discosta da quanto visto in pollo e tacchino e il decorso della malattia è risultato molto rapido e accompagnato da una scarsa eliminazione di virus e da un'assenza di sintomatologia clinica. Le lesioni osservate negli animali che sono deceduti a seguito dell'infezione hanno mostrato una distribuzione e gravità tipiche dei ceppi HPAI, con l'eccezione di un marcato neurotropismo e mancanza di tropismo per gli endoteli. Il tropismo per gli endoteli è una caratteristica tipica di virus HPAI a maggiore virulenza, pertanto la lenta progressione della malattia potrebbe essere dovuta a tale mancanza ⁷. Le prove di trasmissibilità hanno inoltre mostrato la scarsa capacità del virus di diffondere rapidamente in pollo e tacchino, come mostrato dai tassi di riproduzione visibili in Tabella 2. Il rapido decorso della malattia e la scarsa eliminazione virale osservate nelle faraone sono probabilmente alla base della scarsa diffusibilità osservata ed evidenziata da un tasso di riproduzione di 0.2 e da una morbilità del 50% (3/6 sentinelle infette) con il virus H5N8/19. I risultati ottenuti hanno quindi mostrato come i virus appartenenti al lineaggio 2.3.4.4B posseggano caratteristiche peculiari e si differenzino notevolmente da quanto osservato con altri virus del lineaggio Gs/Gd, dimostrando come sia necessario lo studio del fenotipo virale per poter ottenere informazioni adeguate allo sviluppo di sistemi di sorveglianza e contenimento nel corso di un'emergenza epidemica.

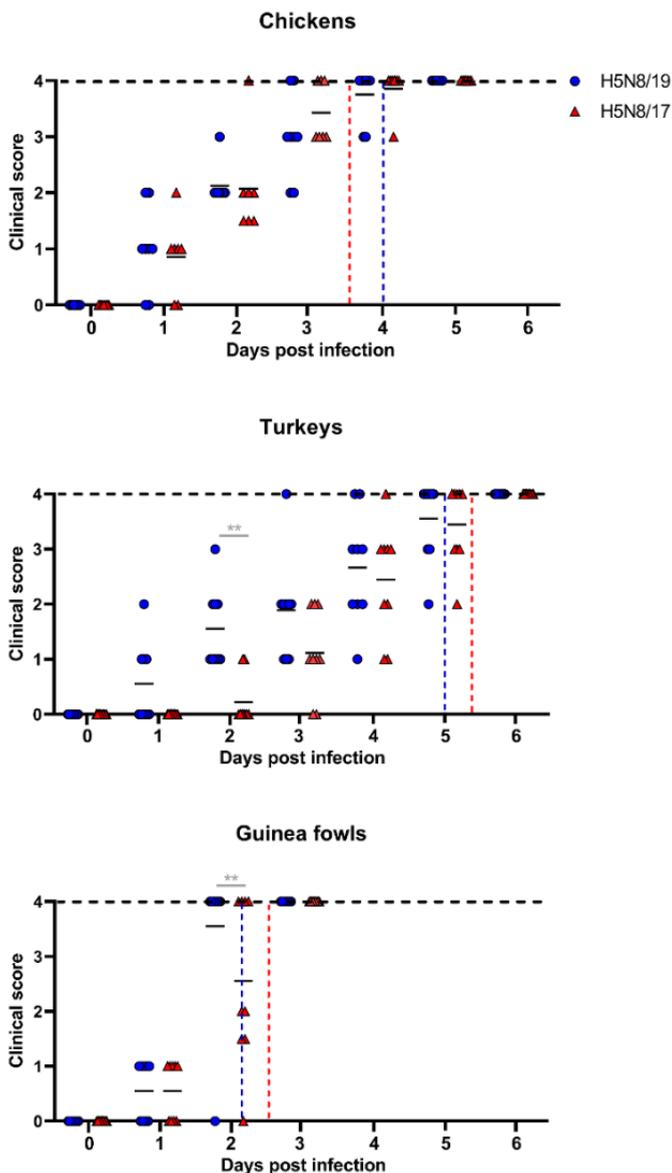


Figura 1. Confronto della sintomatologia clinica riscontrata in polli, tacchini e faraone infettate con H5N8/19 (blu) o H5N8/17 (rosso). Criterio di punteggio assegnato per animale: 0 animale sano, 1 lievemente malato, 2 malato, 3 gravemente malato e 4 morto. Le linee verticali tratteggiate indicano la MDT dei rispettivi gruppi. Gli asterischi (**) indicano una differenza significativa della sintomatologia osservata tra i gruppi infettati con il virus H5N8/19 rispetto a quelli infettati con il virus H5N8/17. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

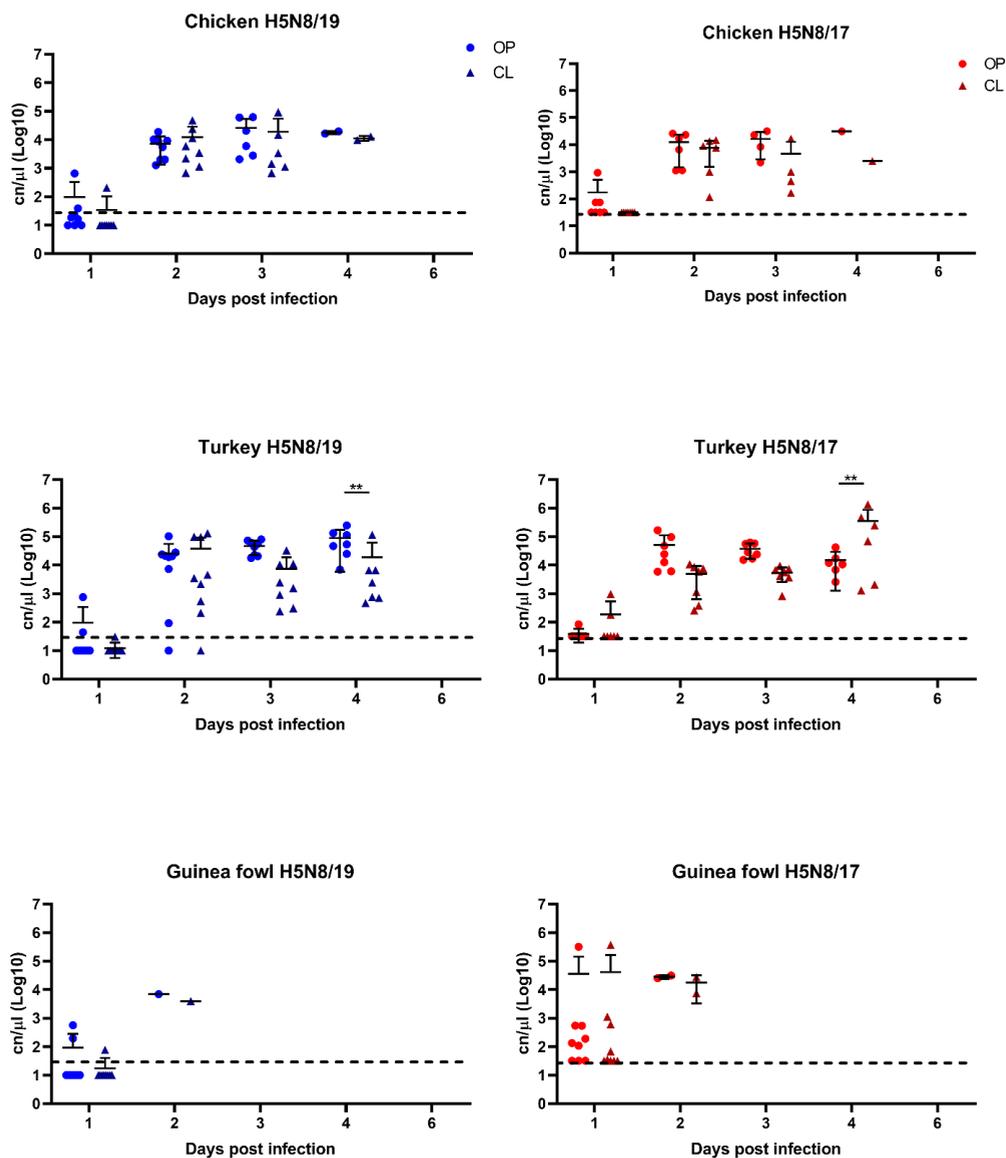


Figura 2. Confronto tra le quantità di virus eliminato nel tempo per via orofaringea (OP) e cloacale (CL) dagli animali infetti. La carica virale è espressa in copie genomiche per microlitro (cn/μl). La linea orizzontale tratteggiata indica il limite di quantificazione della metodica qRRT-PCR. Gli asterischi (**) indicano una differenza significativa della carica virale rilevata a seconda della tipologia di campionamento utilizzato (tampone OP vs CL). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Organi		Lesioni	Pollo		Tacchino		Faraona	
			H5N8/19	H5N8/17	H5N8/19	H5N8/17	H5N8/19	H5N8/17
Trachea	IHC		-	+	+	+	++	+
	Lesioni	Necrosi epiteliale	-	-	-	+/-	+	+
		Tracheite	-	-	-	-	+/-	+/-
Polmoni	IHC		++++	+++	++	+	++++	+++
	Lesioni	Polmonite interstiziale	+	+	+	+	+++	++
Intestino	IHC		+	+	+++	++	+++	++
	Lesioni	Emorragie	+	+	+	+	+	-
		Deplezione linfoide	+	+	+	+	+	+
		Necrosi epiteliale	++	++	+++	++	++	+
		Enterite	++	++	++	++	++	++
Pancreas	IHC Score		+++	+++	+++++	++++	+	-
	Lesioni	Necrosi pancreatica	++	++	++++	++++	+/-	+/-
Timo	IHC		++	+++	+++	++	+++	++
	Lesioni	Deplezione linfoide	++	++	++	++	+	++
Milza	IHC		++	++	+	+	+++	++
	Lesioni	Deplezione linfoide	++	++	+++	+++	++	++
		Necrosi splenica	-	-	++	++	-	-
Rene	IHC Score		++	+++	++	++	+/-	+
	Lesioni	Necrosi tubulare	+/-	+	++	++	+/-	+/-
Fegato	IHC		+	+	-	+	+	+
	Lesioni	Necrosi epatocellularre	-	-	-	-	+/-	+/-
		Infiltrato periportale	++	++	-	+/-	-	++
Cervello	IHC		++++	++++	+++++	+++++	+++	++
	Lesioni	Edema dei neutrofilii	+	+	+	+	+	+
		Necrosi neuronale	++	++	++	++	++	+
		Gliosi	++	++	++	++	+++	++

Tabella 1. Punteggio delle lesioni istopatologiche: - = nessuna lesione; +/- = lesioni rare ; + = lesioni minime; ++ = lesione lievi; +++ = lesione moderata; ++++ = lesioni gravi ; +++++ = Perdita completa della struttura tissutale

IHC: Indica la distribuzione dell'antigene della nucleoproteina virale del virus dell'influenza H5N8: = negativo; + = presenza occasionale di cellule positive; ++ = poche cellule positive; +++ = numero moderato di cellule positive; 4 ++++ = numerose cellule positive; +++++ = positività estesa.

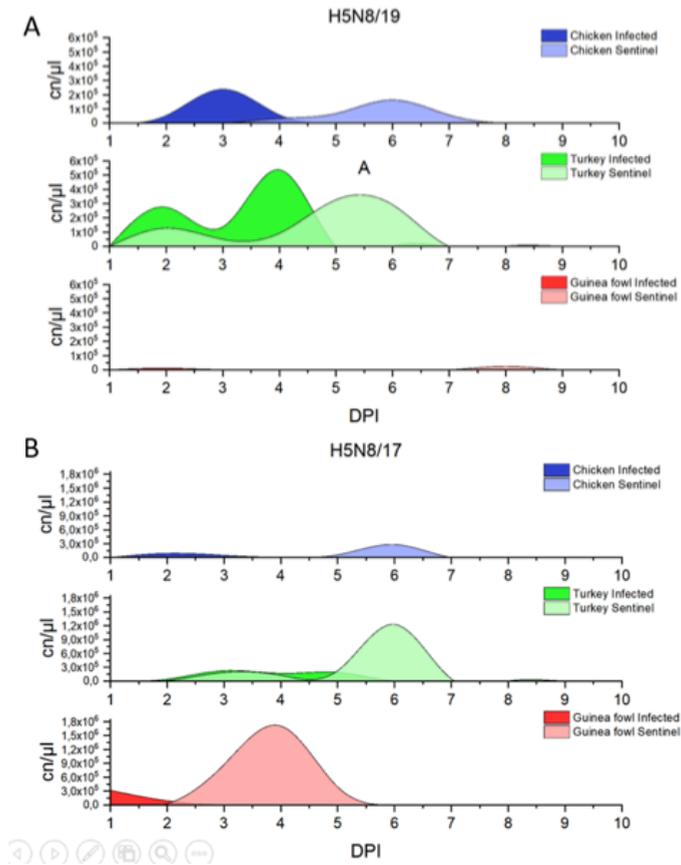


Figura 4. Confronto tra le quantità cumulative di virus escreto dagli animali (polli, tacchini e faraone) infettati con H5N8/19 (A) o H5N8/17 (B). La carica virale è espressa in copie genomiche per microlitro (cn/μl).

Virus	Specie	T_i (days; 95% CI) ^a	β (95% CI) bird ⁻¹ day ⁻¹	R
H5N8/19	Pollo	2 (1,34 - 2,66)	1,03 (0,41-2,12)*	2,1*
	Tacchino	1,83 (1,04 - 2,62)	1,91 (0,74-4,04)	3,5
	Faraona	0,33 (0 - 0,87)	0,48 (0,08-1,49)	0,2
H5N8/17	Pollo	1,66 (0,58 - 2,75)	0,66 (0,23-1,41)	1,1
	Tacchino	3,3 (2,48 - 4,19)	1,35 (0,48-3)	4,5
	Faraona	2,16 (0,77 - 3,56)	2,49 (0,95-5,45)	5,4

Tabella 2. Parametri di trasmissibilità del virus H5N8/19 e del virus H5N8/17 in pollo, tacchino e faraona calcolati utilizzando un modello SIR.

BIBLIOGRAFIA

1. Spackman, E. *et al.* Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* (2002). doi:10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002
2. Van der Goot, J. A., De Jong, M. C. M., Kochi, G. & Van Boven, M. Comparison of the transmission characteristics of low and high pathogenicity avian influenza A virus (H5N2). *Epidemiol. Infect.* **131**, 1003–1013 (2003).
3. Van Der Goot, J. A., Koch, G., De Jong, M. C. M. & Van Boven, M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18141–18146 (2005).
4. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. (2019).
5. Bertran, K. *et al.* Pathobiology and innate immune responses of gallinaceous poultry to clade 2.3.4.4A H5Nx highly pathogenic avian influenza virus infection. *Vet. Res.* (2019). doi:10.1186/s13567-019-0704-5
6. Tumpey, T. M. *et al.* Characterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat. *J. Virol.* (2002). doi:10.1128/jvi.76.12.6344-6355.2002
7. Short, K. R., Veldhuis Kroeze, E. J. B., Reperant, L. A., Richard, M. & Kuiken, T. Influenza virus and endothelial cells: A species specific relationship. *Frontiers in Microbiology* (2014). doi:10.3389/fmicb.2014.00653