

## **EPIDEMIA ITALIANA DI HPAI H5N1 CLADE 2.3.4.4B (2021-2022): INFEZIONE SILENTE IN UN ALLEVAMENTO INDUSTRIALE DI BROILER**

Gobbo F.<sup>1</sup>, Zanardello C.<sup>1</sup>, Bottinelli M.<sup>1</sup>, Budai J.<sup>1</sup>, Bruno F.<sup>1</sup>, De Nardi R.<sup>2</sup>, Patregnani T.<sup>2</sup>, Catania S.<sup>1</sup>, Terregino C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.;*

<sup>2</sup>*Servizio Veterinario Azienda Ulss 9 SCALIGERA, via Valverde, 42, 37122 Verona, Italia .*

### **Summary**

From October 2021 to January 2022, different incursions of clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV (Highly Pathogenic Avian Influenza Virus) occurred in several Italian regions with its main diffusion in Densely Poultry Populated Areas (DPPAs) of northeastern Italy. Monitoring and control activities applied in the affected area clearly evidenced that turkeys and broilers were the most affected species, although several flocks of broilers at times resolved HPAIV H5N1 infection in absence of increased mortality and/or clinical signs. Thus, an approach based on sampling dead birds was adopted in the broiler sector to improve the early detection of infection; this protocol allowed us to confirm 15 farms being HPAIV infected with birds ready to be delivered to the slaughterhouse. The aim of this report is to describe the results of the diagnostic activities carried out in one HPAIV H5N1 infected broiler farm, three days after laboratory confirmation during the pre-movement testing without showing increased mortality or clinical signs. Thus, clinical signs, daily cumulative mortality rate (CMR), virus shedding, seroconversion, pathobiology of clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV as well as AIVs (Avian Influenza Viruses) environmental contamination were thoroughly examined in the infected holding. Such in-depth investigation demonstrated low infection prevalence in live birds, low environmental contamination, no seroconversion for AIVs, gross and microscopic findings compatible with systemic infection with peracute death in H5N1 HPAIV infected birds.

### **INTRODUZIONE**

Durante gli anni 2021-2022 in Europa si sta osservando una delle più gravi epidemie di influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) con coinvolgimento di avifauna selvatica, uccelli tenuti in cattività e pollame. Tutti i focolai sono stati attribuiti al virus HPAI sottotipo H5 clade 2.3.4.4b, che attualmente risulta il lineaggio maggiormente diffuso a livello globale (Eurasia, Africa, Nord America). Alcuni di questi isolati virali hanno un potenziale zoonotico, testimoniato da marcatori genetici che indicano un crescente adattamento ai mammiferi e da numerose segnalazioni di infezione con questo patogeno in diverse specie di mammiferi selvatici e nell'uomo (EFSA, 2022). Da ottobre 2021 a gennaio 2022, il territorio italiano è stato colpito da diverse incursioni del clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV sia nell'avifauna selvatica sia domestica. Il cluster più importante di infezione è stato registrato in Veneto, territorio geografico caratterizzato da una peculiare combinazione di *Densely Poultry Populated Areas* (DPPAs) e zone umide e quindi considerato a più alto rischio di introduzione di HPAIV attraverso gli uccelli acquatici migratori. Il 18 ottobre 2021, il primo focolaio ad alta patogenicità H5N1 clade 2.3.4.4b si è verificato

in un allevamento industriale di tacchini da carne, situato nel “core” della DPPA della provincia di Verona. Nonostante le autorità sanitarie abbiano immediatamente adottato numerosi provvedimenti volti a mitigare urgentemente la diffusione dell’infezione da HPAI (abbattimento degli animali infetti, Zona di Protezione ZP, Zona di Sorveglianza ZS e Zona di ulteriore Restrizione ZUR), un gran numero di focolai secondari sono stati osservati con una distribuzione centripeta rispetto al primo focolaio (*Index Case*) in tutte le principali categorie avicole della regione Veneto. Le successive attività di monitoraggio e controllo applicate durante l’emergenza epidemica nell’area colpita da HPAI H5N1 hanno chiaramente evidenziato che i tacchini e i polli da carne sono state le specie più colpite. Durante l’epidemia italiana segni clinici e aumento della mortalità sono stati riportati in tacchini, ovaiole, anatre commerciali, faraone, quaglie e fagiani, mentre nella categoria broiler numerosi focolai sono stati confermati solo grazie alle attività di monitoraggio attivo e in assenza di significativo aumento della mortalità giornaliera, di sintomatologia sospetta o di alterazione dei parametri produttivi. Inoltre i risultati laboratoristici di tali attività sanitarie hanno permesso di evidenziare che i tamponi orofaringei e/o tracheali campionati da broiler vivi in azienda presentavano una minore frequenza di campioni positivi e/o una minore carica virale (Ct) se comparati con le altre categorie produttive infette (tacchino, ovaiole, faraone e quaglia). Queste evidenze di campo e di laboratorio hanno quindi portato all’emanazione di controlli più approfonditi nell’intero settore avicolo con test virologici obbligatori su tutti i volatili morti presenti in azienda e specificatamente per il settore broiler un protocollo per la movimentazione al macello includente visita clinica e raccolta di 60 tamponi orofaringei/tracheali da ogni capannone dell’allevamento in animali vivi (concentrandosi su eventuali soggetti sintomatici o malati) e tampone tracheale obbligatorio da tutti i volatili morti di giornata o dei giorni precedenti il carico. Tali misure combinate si sono rivelate efficaci nella *detection* tra ottobre e dicembre 2021 del virus H5N1 HPAI in 15 gruppi di polli da carne asintomatici su 961 esaminati (2%) e pronti per il carico per il macello. Inoltre sette di questi focolai (1%) sono stati confermati positivi per IA solo grazie ai risultati dei test di laboratorio effettuati su volatili morti. Successivamente, da gennaio 2022 fino alla fine dell’ondata epidemica (marzo 2022), nessun gruppo di broiler (0% su un totale di 1206 testati) è risultato positivo per IA durante i test pre-movimentazione. Lo scopo del presente lavoro è descrivere i risultati delle attività diagnostiche svolte in un allevamento commerciale di broiler dopo 72 ore dalla conferma laboratoristica di positività per HPAIV H5N1 in uno dei due capannoni testati in pre-movimentazione e in assenza di aumento di mortalità, segni clinici o alterazione di parametri produttivi.

## **MATERIALI E METODI**

Il giorno del sopralluogo (3 giorni dalla conferma diagnostica di HPAI) l’allevamento infetto presentava un totale di 26.271 animali di 8 settimane allevati in due capannoni: il capannone 1, considerato infetto, e il capannone 3. In entrambi i capannoni erano presenti soggetti maschi, poiché lo sfoltimento delle femmine per l’invio al macello era avvenuto circa una settimana prima. Si è provveduto ad eseguire in entrambi i capannoni una scrupolosa visita clinica per evidenziare segni di malattia, sintomatologia sospetta e valutare il comportamento degli animali (assunzione di alimento ed acqua). I dati di mortalità cumulativa dell’intero ciclo produttivo sono stati messi a disposizione e registrati per la loro elaborazione. In entrambi i capannoni si è eseguito un campionamento randomizzato di tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) da animali vivi (60 animali nel

cap. 1; 40 animali nel cap. 3) per valutazione dello *shedding* virale in Real-Time RT-PCR, inoltre si sono eseguiti prelievi di sangue per valutazione della sieroconversione per influenza aviaria (IA) tramite metodica ELISA in 65 sieri di animali vivi (35 sieri animali cap. 1; 30 animali cap. 3).

Le carcasse disponibili nei due capannoni (un animale moribondo e quattro carcasse nel cap. 1 e cinque carcasse nel cap. 3) sono state raccolte ed inviate al laboratorio per esame autoptico, prelievo di siero da coagulo cardiaco per valutazione della sieroconversione per IA e prelievo in doppia aliquota di trachea, polmone, milza, duodeno, pancreas, tonsille cecali, Borsa di Fabrizio e cervello per lo studio del tessuto-tropismo in Real-Time RT-PCR e patobiologia dell'infezione HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b nel broiler (esame istologico E-E e immunistochemica IHC).

In fine durante il sopralluogo sono stati eseguiti anche dei campionamenti ambientali, quali tamponi a secco da superfici inanimate (manici delle carriole, maniglie e ruote dall'auto di servizio dell'IZSVE) e sovrascarpe per la valutazione in Real-Time RT-PCR della contaminazione ambientale di HPAIV H5N1 nella azienda infetta.

## RISULTATI

Durante la visita clinica del capannone 1 e 3 la maggior parte degli animali presentavano buone condizioni generali e normale comportamento alimentare in assenza di conclamata sintomatologia respiratoria, gastroenterica o neurologica. In alcuni animali si sono rilevati segni di dermatite-cellulite cutanea e/o bursiti sternali e solamente nel capannone 1-infetto pochi animali presentavano lievi e a specifici sintomi respiratori (congiuntivite, rantoli, essudazione nasale) o ali cadenti con piumaggio arricciato. L'elaborazione dei dati di mortalità cumulativa (CMR) ha dimostrato che, fatta eccezione per episodi di mortalità anomala nei primi giorni post accasamento, in entrambi i capannoni non si è mai registrata una mortalità giornaliera superiore allo 0.2% durante l'intero ciclo produttivo. I risultati dell'indagine epidemiologica (IE) hanno rilevato marcato incremento della mortalità solo dopo 8 giorni dalla notifica del focolaio. Lo studio di *shedding* virale tramite l'analisi dei tamponi tracheali e cloacali ha dimostrato l'assenza di eliminazione virale in tutti i tamponi prelevati dai 40 animali del capannone 3 (0%), e al contrario la presenza di genoma virale in trachea e/o cloaca di 12 broiler su 60 esaminati del capannone 1 infetto (20%). Il totale dei 65 sieri collezionati negli animali vivi (35 sieri nel cap. 1 e 30 sieri nel cap. 3), così come i sieri ematici ottenuti dal coagulo cardiaco delle 10 carcasse non ha rilevato alcuna sieroconversione per IA. Le lesioni macroscopiche con conferma anche in sede istopatologica (E-E) delle 5 carcasse del capannone 1-infetto erano comparabili tra i diversi soggetti e maggiormente distribuite all'apparato respiratorio con segni di congiuntivite sierosa con congestione della mucosa, tracheite sierosa o siero-cattarale con iperemia diffusa della mucosa e grave edema e congestione del parenchima polmonare. Inoltre tutti i soggetti esaminati presentavano marcata splenomegalia associata a diffuse e miliari lesioni biancastre (necrosi) del parenchima. Le borse di Fabrizio si presentavano di dimensioni consistenti con mucosa lievemente edematosa e le tonsille cecali presentavano segni di iperplasia con focali petecchie emorragiche in alcuni soggetti. Tra le cinque carcasse esaminate del capannone 3 solo una ha presentato lesioni macroscopiche e microscopiche sovrapponibili a quelle sopra descritte per gli animali infetti (Tabella 2; BRL 4). I risultati dell'esame immunistochemico (IHC) sulle sezioni degli organi infetti ha dimostrato la presenza dell'antigene virale in cellule epiteliali, endotelio, macrofagi e nel cervello (cellule neuronali e gliali). Si riportano nelle

due tabelle sottostanti i risultati integrati dello studio di tessuto tropismo in Real-Time RT-PCR e di patobiologia dell'infezione HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b nelle carcasse di broiler del capannone 1 e 3.

**Tabella 1:** risultati dello studio di tessuto tropismo e patobiologia dell'infezione da HPAI H5N1 nei volatili morti del capannone 1

Capannone 1	BRL1		BRL2		BRL3		BRL4		BRL5		Cellule IHC positive/tessuto
Organo	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	
<b>Polmone</b>	17.6	+++	34.01	-	21.06	+++	18.77	+++	18.43	+++	Pneumociti, endotelio
<b>Trachea</b>	18.9	+	27.89	-	21.67	++	21.96	++	19.77	+++	Cellule epiteliali, endotelio e macrofagi
<b>Milza</b>	19.07	+	36.13	-	19.81	+++	22.08	++	23.32	++	Macrofagi ed endotelio
<b>Duodeno</b>	18.35	++	31.32	-	22.39	+	21.36	+	20.09	+++	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, endotelio e plessi
<b>Pancreas</b>	17.17	+++	33.57	-	22.19	++	22.21	+	18.73	+++	Epitelio della componente acinare
<b>Tonsille cecali</b>	16.81	+++	25.32	+	neg	n.e.	22.46	++	18.29	++	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, aree di necrosi ed endotelio
<b>Borsa di Fabrizio</b>	18.19	+++	32.91	-	20.25	+	21.71	++	15.15	++	Macrofagi
<b>Cervello</b>	13.85	+++	34.6	-	19.83	++	17.2	+++	18.94	+++	Neuroni, cellule della glia e ependimali

BRL, broiler; rRT-PCR, Real-Time RT-PCR; Ct, cycle threshold; IHC score, - (negativo), -/+ (rara/occasionale presenza di cellule IHC positive), ++ (bassa presenza di cellule IHC positive), +++ (/moderata presenza di cellule IHC positive), ++++ elevata presenza di cellule IHC positive), +++++ diffusa presenza di cellule IHC positive); neg, negativo; n.e., non eseguito.

**Tabella 2:** risultati dello studio di tessuto tropismo e patobiologia dell'infezione da HPAI H5N1 nei volatili morti del capannone 3

Capannone 3	BRL1		BRL2		BRL3		BRL4		BRL5		
Organo	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	rRT-PCR (Ct)	IHC score	Cellule IHC positive/ tessuto
<b>Polmone</b>	neg	-	neg	n.e.	neg	n.e.	25.03	-/+	39.43	-	Pneumociti, endotelio
<b>Trachea</b>	37.68	-	neg	n.e.	neg	n.e.	23.83	+	38.46	-	Cellule epiteliali, endotelio e macrofagi
<b>Milza</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	23.86	-/+	neg	n.e.	Macrofagi ed endotelio
<b>Duodeno</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	25.03	-/+	neg	-	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, endotelio e plessi
<b>Pancreas</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	24.03	-/+	38.31	-	Epitelio della componente acinare
<b>Tonsille cecali</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.a.	24.05	+	neg	n.e.	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, aree di necrosi ed endotelio
<b>Borsa di Fabrizio</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.a.	22.25	-	neg	n.a.	Macrofagi
<b>Cervello</b>	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	19.88	+	neg	n.e.	Neuroni, cellule della glia e ependimali

BRL, broiler; rRT-PCR, Real-Time RT-PCR; Ct, cycle threshold; IHC score, - (negativo), -/+ (rara/occasionale presenza di cellule IHC positive), ++ (bassa presenza di cellule IHC positive), +++ (/moderata presenza di cellule IHC positive), ++++ elevata presenza di cellule IHC positive), +++++ diffusa presenza di cellule IHC positive); neg, negativo; n.e., non eseguito; n.a., non applicabile.

Infine, la valutazione della contaminazione ambientale per IA tramite metodica Real-Time RT-PCR ha mostrato blande positività (> 36.00 Ct) unicamente su matrici ambientali del capannone 1-infetto (2 pool/3 di sovrascarpe e dal tampone eseguito sui manici della carriola utilizzata per i campionamenti del presente studio; al contrario nessun campione ambientale collezionato nel capannone 3 ha mostrato positività in Real-Time RT-PCR. Questi risultati suggeriscono quindi una bassa contaminazione ambientale di HPAIV H5N1 nell'azienda infetta di broiler con infezione silente.

## DISCUSSIONE

I risultati del presente studio hanno consentito di acquisire un quadro più completo riscontrabile in casi di infezione silente con HPAIV H5N1 clade 2.3.4.4b nel broiler dimostrando una bassa prevalenza negli animali vivi e la maggiore efficienza di diagnosi di IA (*early detection*) attraverso test di laboratorio eseguiti su matrici biologiche prelevate da volatili morti. In questo allevamento, i dati di mortalità cumulativa o la clinica non si sono rivelati efficaci per il sospetto precoce (*early warnig*) di HPAI, infatti la mortalità anomala si è osservata solo dopo 8 giorni dalla notifica del focolaio in entrambi i capannoni. Questi dati combinati con la dinamica temporale di infezione del capannone 3 suggeriscono che l'introduzione in azienda del HPAIV sia avvenuto almeno 11 giorni prima dell'insorgenza di sintomatologia sospetta e dell'incremento significativo della mortalità. Il capannone 3 è stato considerato infetto solo grazie alle analisi condotte sulle carcasse poiché sulla base del campionamento *intra vitam* tutti i 40 soggetti esaminati sono risultati negativi per IA sia da tamponi tracheali sia cloacali. Al contrario, le carcasse risultate infette da HPAIV hanno dimostrato una infezione di natura sistemica con elevate cariche virali e mortalità iperacuta per *failure* multi-organo. I risultati delle indagini sierologiche hanno evidenziato l'assenza di sieroconversione in ELISA in tutti gli animali vivi e nelle carcasse esaminate, sottolineando come la sierologia non possa risultare uno strumento utile nelle attività di sorveglianza per HPAI nel settore broiler. I dispositivi emanati durante l'epidemia italiana di HPAI H5N1 e lo specifico protocollo adottato per il settore broiler (*weekly pool sampling "bucket sampling" in poultry species that often do not manifest clinical signs when infected with HPAI*: <https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/weekly-pool-sampling-bucket-sampling.pdf>) si sono confermati efficaci nella diagnosi precoce di infezione con HPAI in gruppi di broiler in assenza di sintomatologia o incremento della mortalità, consentendo di non movimentare attraverso le DPPAs della regione Veneto migliaia di animali potenzialmente infetti.

## CONCLUSIONI

L'evidenza di campo dell'infezione silente in alcuni allevamenti di broiler durante l'epidemia italiana di HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b e i risultati ottenuti in questo studio sottolineano l'importanza di promuovere costanti studi sull'evoluzione degli HPAIV circolanti e di valutare attentamente il loro comportamento nelle diverse categorie avicole, al fine di ottenere evidenze scientifiche sul loro potenziale ruolo epidemiologico e per mettere in atto le più efficienti strategie di controllo e sorveglianza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gobbo, F.; Zanardello, C.; Bottinelli, M.; Budai, J.; Bruno, F.; De Nardi, R.; Patregnani, T.; Catania, S.; Terregino, C. Silent Infection of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b in a Commercial Chicken Broiler Flock in Italy. *Viruses* 2022, 14, 1600. <https://doi.org/10.3390/v14081600>
2. Lee, D. H.; Bertran, K.; Kwon, J. H.; Swayne, D.E. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3. 4.4. *J Vet Sci* 2017, 18(S1), 269-280. [doi.org/10.4142/jvs.2017.18.S1.269](https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.S1.269)
3. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, E.; Staubach, C.; Terregino, C.; Aznar, I.; Guajardo, M.I.; Baldinelli, F. European

- Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention, Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Avian influenza overview December 2021–March 2022. *EFSA J.* 2022, 20(4), e07289. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7289>
4. Gobbo, F.; Fornasiero, D.; De Marco, M.A.; Zecchin, B.; Mulatti, P.; Delogu, M.; Terregino, C. Active Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Wintering Waterbirds in Northeast Italy, 2020-2021. *Microorganisms* 2021, 20;9(11):2188. [doi:10.3390/microorganisms9112188](https://doi.org/10.3390/microorganisms9112188)
  5. Beerens, N.; Germeraad, E.A.; Venema, S.; Verheij, E.; Pritz-Verschuren, S.B.; Gonzales, J.L. Comparative pathogenicity and environmental transmission of recent highly pathogenic avian influenza H5 viruses. *Emerg Microbes Infect* 2021, 10(1), 97-108. [doi.org/10.1080/22221751.2020.1868274](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1868274)
  6. Perlas, A.; Argilaguët, J.; Bertran, K.; Sánchez-González, R.; Nofrarías, M.; Valle, R.; Ramis, A.; Cortey, M.; Majó, N. Dual Host and Pathogen RNA-Seq Analysis Unravels Chicken Genes Potentially Involved in Resistance to Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection. *Front Immunol* 2021, 12. [doi.org/10.3389/fimmu.2021.800188](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.800188)