

IDENTIFICAZIONE DI VIRUS HPAI NELLE PENNE DELLE ANATRE: RILEVANZA DEL METODO DIAGNOSTICO E DELL'ETÀ DEI SOGGETTI CAMPIONATI

Aiello R., Beato M.S., Rigoni M., Maniero S., Mancin M., Capua I., Terregino C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale, OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (Padova)

Summary

Previous studies have reported the detection of HPAI H5N1 virus in feathers from naturally and experimentally-infected ducks; however, knowledge on the relevance of age on virus detection in feathers from asymptomatic ducks is lacking and would be important for development of effective surveillance strategies. In this study, young (4-weeks) and adult (24-weeks) Pekin ducks (*Anas platyrhynchos domestica*) were inoculated with a clade 2.2 field isolate of HPAI H5N1 virus (*A/duck/Nigeria/1071-23/2007*). Tracheal (Tr) and cloacal (Cl) swabs and feathers from the wing, breast, and tail regions were collected at 3, 5, 7 and 10-days-post infection and tested for presence of virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RRT-PCR) and an *ad hoc double* antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Virus was detected by RRT-PCR for a longer period of time in feathers (10 days) than in Tr and Cl swabs (7 days) in young ducks, but not in adult ducks. DAS-ELISA proved to be suitable for virus detection in feathers during the early stages of infection (days 3 and 5 p.i.) in young ducks only. An age-related presence of virus in duck feathers was observed, together with an age-related susceptibility to H5N1 HPAI infection. The probability to detect virus-positive feathers and/or Tr swabs was greater in young ducks ($P < 0.01$) than in adult ducks ($P > 0.10$), with major differences during the early stages of infection. Our study shows that feathers may represent a valid diagnostic sample in suspected HPAI outbreaks and in surveillance programs, particularly when collected from young ducks. The use of an *ad hoc* immunoassay may be useful to detect HPAI when molecular techniques and/or virus isolation procedures are not available.

INTRODUZIONE

Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo dei volatili acquatici selvatici e domestici nel mantenimento e nella diffusione delle infezioni da virus influenzali. In particolare nelle anatre domestiche anche l'infezione con virus ad alta patogenicità (HPAI) può risultare asintomatica e per tale ragione la rapida identificazione del virus in animali apparentemente sani è fondamentale per le strategie di controllo.

La scoperta della colonizzazione virale precoce dei follicoli delle penne sia a seguito di infezione sperimentale che naturale con virus HPAI (Perkins & Swayne 2001, Busquets 2010, Yamamoto 2007, Yamamoto 2008) ha posto in evidenza il possibile uso delle penne come campione diagnostico. Inoltre, è stato dimostrato che le penne risultano positive per un periodo di tempo più prolungato rispetto ai campioni convenzionali (tamponi e organi). Tuttavia non esiste uno studio sulla colonizzazione delle penne in anatre asintomatiche di diverse età.

Lo scopo del nostro studio è stato quindi la valutazione della colonizzazione virale delle penne mediante due diverse metodiche (ELISA e RRT-PCR) da parte di un virus HPAI appartenente al clade 2.2 in anatre giovani e adulte sperimentalmente infette. Penne e tamponi tracheali e cloacali sono stati prelevati a diversi intervalli di tempo. I risultati sono stati analizzati per valutare l'efficacia del metodo ELISA *ad hoc* sviluppato, e la validità delle penne come campione diagnostico rispetto ai campioni convenzionali.

I dati presentati forniscono ulteriore evidenza della validità delle penne come campione diagnostico, anche in animali asintomatici, e forniscono indicazioni utili relative all'età degli animali da sottoporre a campionamento durante le attività di sorveglianza.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Sedici anatre di 4 settimane di età (giovani) sono state infettate per via oronasale con 100 µl di liquido allantoideo contenente 107 EID₅₀/0,1 ml del ceppo H5N1 HPAI A/duck/Nigeria/1071-23/2007 (clade 2.2), letale per il pollo, isolato in Nigeria da anatre domestiche apparentemente sane.

L'eventuale insorgenza di sintomatologia clinica è stata monitorata due volte al giorno e tamponi tracheali e cloacali e penne in fase di sviluppo (ben vascolarizzate) da tre regioni del corpo (ala, petto, coda) sono state prelevate nei giorni 3, 5, 7 e 10 post infezione (p.i.). Campioni ematici sono stati prelevati prima dell'infezione e al giorno 10 p.i., per esami sierologici (test ELISA commerciale competitivo e test di inibizione dell'emoagglutinazione). Inoltre, tre animali sono stati selezionati in modo casuale e soppressi nei giorni 3 e 5 p.i. per valutare la colonizzazione virale di organi e tessuti. Per tale ragione la numerosità campionaria è diminuita nel tempo.

Lo stesso disegno sperimentale è stato applicato ad un gruppo di sedici anatre di 24 settimane di età (adulte), infettate con lo stesso virus, dose e via di infezione.

Identificazione virale

I tamponi tracheali e cloacali e le penne sono stati analizzati mediante RRT-PCR (Spackman 2002), selezionata come metodica *gold standard*, essendo un test rapido, sensibile e validato per l'identificazione dei virus influenzali.

Un test immunoenzimatico (ELISA *sandwich*) *ad hoc* è stato sviluppato per tale ricerca sulla base di una metodica già pubblicata (Lee *et al.* 1993), utilizzando due anticorpi monoclonali commerciali. Prima di essere applicato alle penne, il test ELISA *sandwich* è stato validato utilizzando matrici virali convenzionali a diverse diluizioni.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante curve ROC (Thrusfield 2005) per determinare il valore *cut-off* dell'ELISA *sandwich* e per valutarne sensibilità e spe-

cificità rispetto alla RRT-PCR (gold standard). Per valutare l'eventuale differenza tra le tre diverse regioni di prelievo delle penne l'analisi ANOVA per misure ripetute (West 2007) è stata applicata. Inoltre, i risultati ottenuti dalle penne sono stati comparati con i risultati ottenuti dai tamponi mediante test esatto di Mc Nemar ad una coda per dati appaiati (Thrusfield 2005) e eventuali differenze nella positività dei campioni tra anatre giovani e adulte sono state valutate mediante un modello Logit per misure ripetute (Littel 2002).

RISULTATI

Segni clinici e mortalità

Due delle sedici anatre giovani infette hanno manifestato segni clinici lievi e non specifici (depressione e lieve congiuntivite) dal giorno 2 p.i. e sono morte il giorno 4 p.i.. Una delle sedici anatre adulte infette ha manifestato lieve depressione dal giorno 5 p.i. ed è morta il giorno 6 p.i.. Nessuno degli altri soggetti ha manifestato evidente sintomatologia clinica.

Sierologia

Tutti i sieri prelevati prima dell'infezione sono risultati negativi mediante ELISA commerciale per virus influenzali di tipo A e test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) per il sottotipo H5. Dei soggetti sopravvissuti all'infezione, 6/8 anatre giovani e 6/9 anatre adulte sono risultate positive mediante test HI.

Analisi dei campioni mediante RRT-PCR e ELISA sandwich

Positività elevata è stata riscontrata nei tamponi tracheali prelevati dalle anatre giovani nei giorni 3 e 5 p.i.. Solo alcuni tamponi tracheali sono risultati positivi il giorno 7 p.i. e nessuno il giorno 10 p.i. Una positività inferiore è stata riscontrata nei tamponi cloacali, risultati negativi il giorno 10 p.i. (Tabella 1).

Nelle anatre adulte la positività dei tamponi tracheali e cloacali è stata complessivamente inferiore rispetto a quella delle anatre giovani (Tabella 1).

Nelle anatre giovani una positività elevata è stata riscontrata tramite RRT-PCR e ELISA *sandwich* nelle penne prelevate nei giorni 3 e 5 p.i., mentre nei giorni 7 e 10 p.i. le penne sono risultate positive solo tramite RRT-PCR. Nelle anatre adulte un numero ridotto di campioni di penne è risultato positivo nei giorni 3 e 5 p.i. rispetto alle giovani (Tabella 1).

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nelle tre zone di campionamento delle penne.

Confrontando i risultati ottenuti tramite RRT-PCR dai tamponi e dalle penne prelevati dalle anatre giovani, le penne sono risultate positive per un periodo di tempo prolungato rispetto ai tamponi ed hanno consentito di individuare l'infezione in un maggior numero di animali rispetto ai tamponi. La probabilità di trovare un animale positivo tramite tamponi e/o penne è stata sempre maggiore nelle anatre giovani ($P < 0.01$). Nelle anatre adulte non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra penne e tamponi.

Tabella 1. Risultati della RRT-PCR e dell'ELISAsu tamponi e penne (*)

a) Anatre giovani

Gg.p.i.	RRT-PCR TT	RRT-PCR TC	Penne (RRT-PCR)			Penne (ELISA sandwich)		
			ala	petto	coda	ala	petto	coda
3	16/16	7/16	14/16	15/16	16/16	12/16	13/16	13/16
5	9/11	2/11	10/11	10/11	9/11	4/11	5/11	6/11
7	2/8	2/8	8/8	6/8	7/8	0/8	0/8	0/8
10	0/8	0/8	3/8	5/8	7/8	0/8	0/8	0/8

b) Anatre adulte

Gg.p.i.	RRT-PCR TT	RRT-PCR TC	Penne (RRT-PCR)			Penne (ELISA sandwich)		
			ala	petto	coda	ala	petto	coda
3	11/16	4/16	6/16	5/16	5/16	2/16	2/16	1/16
5	4/13	2/13	5/13	3/13	5/13	3/13	0/13	1/13
7	1/9	0/9	3/9	2/9	3/9	1/9	0/9	0/9
10	0/9	1/9	2/9	2/9	2/9	1/9	0/9	0/9

(*) numero di campioni positivi/totale; Gg.p.i. = giorni post infezione; RRT-PCR = real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction; TT = tamponi tracheali; TC = tamponi cloacali.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha confermato che la suscettibilità delle anatre domestiche all'infezione con virus H5N1 HPAI varia con l'età (Pantin-Jackwood 2007, Löndt 2010), e ha dimostrato che nelle anatre giovani la colonizzazione virale dei follicoli delle penne è maggiore rispetto alle anatre adulte.

Nonostante la RRT-PCR si sia chiaramente dimostrata il test diagnostico più sensibile, l'ELISA ad hoc sviluppato potrebbe essere utile per l'individuazione dei virus HPAI nelle penne negli stadi precoci dell'infezione (fino al giorno 5 p.i.), soprattutto in paesi in cui per ragioni economiche e tecniche la RRT-PCR risulta inapplicabile. Ciononostante, l'applicazione dell'ELISA richiede un'accurata valutazione statistica della numerosità campionaria, ed una validazione specifica per ogni specie avicola.

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra le diverse regioni corporee campionate, sebbene una variabilità tra soggetti sia stata evidenziata, sottolineando l'importanza di una accurata valutazione statistica della numerosità campionaria ai fini del prelievo delle penne.

CONCLUSIONI

Le penne potrebbero rappresentare un valido campione diagnostico per la rapida identificazione di virus HPAI, anche in soggetti asintomatici. I dati ottenuti in questo studio potranno essere utilizzati per la creazione di strategie di sorveglianza innovative, soprattutto in paesi in cui i virus HPAI risultano endemici.

BIBLIOGRAFIA

Busquets N, Abad FX, Alba A, Dolz R, Allepuz A, Rivas R, Ramis A, Darji A, Majó N. (2010). Persistence of highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in infected chickens: feather as a suitable sample for diagnosis. *Journal of General Virology*, 91, 2307-2313.

Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Simonson RR. ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J Vet Diagn Invest*. 1993 Oct;5(4):510-5.

SAS for Linear models, fourth edition; Ramon C. Littell, Walter W. Stroup, Rudolf J. Freund; 2002 by SAS institute Inc., Cary, NC, USA

Löndt BZ, Núñez A, Banks J, Alexander DJ, Russell C, Richard-Löndt AC, Brown IH. The effect of age on the pathogenesis of a highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally. *Influenza Other Respi Viruses*. 2010 Jan;4(1):17-25.

Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Swayne DE. Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Res*. 2007 Dec;130(1-2):151-61.

Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol*. 2001 Mar;38(2):149-64.

Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T. & Suarez, D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3256-3260.

Veterinary Epidemiology third edition; Michael Thrusfield; 2005 by Blackwell Science Ltd.

Linear Mixed Models: a practical guide using statistical software; Brady T. West, Kathleen B. Welch, Andrzej T. Galecki ; 2007 by Taylor&Francis Group, LLC

Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, Ikenaga N, Yamada M, Mase M, Narita M. Severe nonpurulent encephalitis with mortality and feather lesions in call ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*) inoculated intravenously with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1):52-7.

Yamamoto Y, Nakamura K, Okamoto M, Miyazaki A, Yamada M, Mase M. Detecting avian influenza virus (H5N1) in domestic duck feathers. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1671-2.