

## **A/H1N1PDM(09) IN TACCHINI DA RIPRODUZIONE**

Gobbo F., Zecchin B., Canevaro A., Zanardello C., Scolamacchia F., Bonfante F., Terregino C.

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

### **Summary**

After its first detection in humans in Mexico (2009), the A/H1N1pdm(09) infection was also described in the poultry industry, and specifically in turkey breeder flocks. Previous works assumed that farm workers might be the first cause of infection of turkey hens *via* contaminated equipment during artificial insemination procedures, which is a unique prerogative of this poultry category. Previously described cases reported that affected flocks did not show abnormal mortality or other clinical signs except for a sudden and drastic egg drop associated to economic loss. In the majority of cases, phylogenetic analyses of avian samples showed a high similarity of the virus isolates with the human circulating A/H1N1pdm(09), suggesting the occurrence of a reverse zoonosis.

In April 2019, a turkey breeder company contacted the Official Veterinary Authority to complain about a sudden and drastic drop in egg production in mature hens.

60 tracheal swabs and 30 blood sera from each barn of the farm (hens in barn 1-2-3 and stags in barn 4) were collected and submitted to the laboratory for type A Influenza virus analysis.

Only tracheal swabs from animals of barns 3 and 4 tested positive for type A Influenza virus and negative for H5, H7 and H9 subtype. Further molecular analyses and Sanger sequencing showed that clinical specimens collected from hens and stags presented a high similarity (99-100%) with the human A/H1N1pdm(09) strains isolated in 2018-2019, thus reinforcing the hypothesis of a reverse zoonosis occurrence. The infection observed in stags turned out to be particularly surprising, considering that they had not been directly manipulated for artificial insemination, thus suggesting a possible horizontal transmission of the virus between barns. In order to shed light on this theory and gain more exhaustive information on the pathogenesis of the infection, additional samples from hens and stags were collected. Preliminary results of Whole Genome Sequencing (WGS) from tracheal clinical specimens showed nucleotide point mutations associated to possible mechanism of virus adaption to the avian host. These preliminary findings underline the need to implement high biosecurity measures during the artificial insemination procedures of turkey hens in order to avoid the human-animal transmission of influenza A virus in turkeys, which may act as potential source of emerging viruses through adaptive changes and reassortment, posing a risk for both human and animal health.

### **INTRODUZIONE**

Il virus A/H1N1pdm(09) è stato descritto per la prima volta nell'uomo in Messico e da allora, oltre che nella popolazione umana, è stato isolato a livello globale nel settore suinicolo ed avicolo. Tra le specie avicole allevate, la categoria produttiva

colpita è stata sempre quella del tacchino da riproduzione e specificatamente le femmine mature, con marcato ed improvviso calo della ovideposizione (*Egg Drop*) in assenza di mortalità anomala o di altra sintomatologia riferibile ad infezione da virus influenzali. Lo studio di filogenesi del virus, a partire da campioni clinici aviari, ha sempre dimostrato una elevata similarità con i ceppi circolanti umani e in alcuni casi una completa omologia con isolati clinici di operatori avicoli sintomatici coinvolti nelle pratiche di inseminazione artificiale (IA), suggerendo quindi l'occorrenza di una *reverse-zoonosis*.

Ne consegue, che l'inseminazione artificiale, prerogativa di questo settore avicolo, rappresenti il più importante determinante nell'instaurarsi dell'infezione nel tacchino da riproduzione e l'ipotesi più plausibile è che le tacchine si infettino durante le pratiche di manipolazione associate all'inseminazione artificiale, attraverso il contatto diretto con secrezioni infette umane o con attrezzature contaminate dalle stesse. Le infezioni sperimentali in tacchini di diverse età e attraverso diverse vie di inoculo hanno individuato nella via intrauterina la modalità di infezione primaria responsabile dell'insorgenza di *Egg Drop*. In tutti i casi descritti in letteratura il calo/blocco dell'ovideposizione ha presentato un andamento autolimitante con ritorno in pochi giorni alla deposizione ma con *performance* produttive ridotte rispetto allo *standard*.

Lo scopo del presente lavoro è quello di riportare i risultati di approfondimenti diagnostici effettuati dopo la prima conferma di laboratorio di infezione da A/H1N1pdm(09) in tacchine da riproduzione associato a drastico ed improvviso calo dell'ovideposizione e all'evidenza di infezione e *shedding* virale anche nei maschi riproduttori dell'azienda.

## **MATERIALI E METODI**

**Conferma diagnostica di A/H1N1pdm(09) -15 Aprile 2019:** il laboratorio di Virologia Speciale e Sperimentazione dell'IZSVe ha confermato l'infezione di A/H1N1pdm(09) in 4 capannoni di una azienda di tacchini da riproduzione (cap. 1-2-3 femmine di 48 settimane; cap. 4 maschi).

La diagnosi iniziale è stata eseguita su campioni ufficiali (60 tamponi tracheali e 30 sieri di sangue raccolti da ogni capannone) dopo segnalazione aziendale di un drastico ed improvviso calo dell'ovideposizione in assenza di mortalità, di sintomatologia respiratoria e/o enterica e di alterazioni nell'assunzione di cibo ed acqua.

I risultati delle analisi molecolari e sierologiche hanno consentito di evidenziare un'infezione pregressa nei capannoni 1-2 dove si era già instaurato il blocco dell'ovideposizione (animali negativi in rRT-PCR e marcatamente positivi sierologicamente) e uno stadio di infezione acuta nel capannone 3, associata ad iniziale e marcata diminuzione dell'ovideposizione (animali positivi in rRT-PCR e con inizio di sieroconversione), e nel capannone 4 dei maschi (positivi in rRT-PCR e negativi sierologicamente).

Infine il sequenziamento *Sanger* dei campioni positivi del capannone 3 e 4 ha consentito di classificare il ceppo virale come virus A/H1N1pdm (09) con il 99-100% di similarità con i ceppi umani dell'epidemia 2019.

**Campionamento:** di concerto con l'Azienda si è quindi deciso di approfondire il caso con successivi campionamenti, volti a comprendere meglio la patogenesi

dell'infezione e specificatamente il tropismo virale per l'apparato riproduttore nelle femmine, nonché i possibili meccanismi alla base della trasmissione/diffusione virale al capannone 4 dei maschi, che presenta in termini gestionali una netta separazione funzionale con i capannoni delle femmine.

Inoltre scopo di questo studio è stato valutare la possibile trasmissione verticale del virus, la possibilità di *egg-borne dissemination* e la presenza di immunità passiva nella progenie di un giorno di vita.

Per tali fini sono stati conferiti al laboratorio a diversi intervalli nel tempo (aprile-giugno 2019):

-tamponi tracheali e cloacali delle femmine (cap. 3) e dei maschi (cap. 4) per studio di *shedding* virale (rRT-PCR e WGS)

-sieri di sangue (cap. 3 e 4) per sierologia in ELISA e HI con antigene omologo A/Verona/IT/2810/09)

-carcasse di tacchino femmina per esami di anatomia patologica, studio del tropismo virale in rRT-PCR ed istopatologia (E-E ed IHC)

-5 *pool* di sperma per trasmissione verticale venerea (rRT-PCR)

-52 uova beccate scarto schiusa per rRT-PCR da guscio esterno (*egg-borne dissemination*) e da *pool* di organi dell'embrione (trasmissione verticale alla progenie)

-47 tacchinotti di un giorno per sierologia in ELISA e HI (immunità passiva) e rRT-PCR da *pool* di organi (trasmissione verticale alla progenie)

-34 tacchinotti di un giorno di vita (DOA-*Dead On Arrival*-) per rRT-PCR da *pool* di organi (trasmissione verticale alla progenie)

Infine, i dati produttivi di ovideposizione forniti dalla compagnia sono stati analizzati allo scopo di studiare l'evoluzione spazio-temporale dell'infezione all'interno dell'allevamento nei diversi capannoni di femmine, considerando l'andamento delle *performances* produttive e i relativi tempi di ripresa delle stesse a seguito dell'infezione.

## RISULTATI

-tamponi tracheali e cloacali (cap. 3 e 4): i risultati delle analisi su queste matrici hanno consentito di evidenziare uno *shedding* virale a livello respiratorio e cloacale sia nelle femmine che nei maschi fino ad 8 giorni dopo la conferma diagnostica di A/H1N1pdm(09). Nella fase tardiva di infezione lo *shedding* cloacale risulta essere predominante. Nell'ultimo campionamento (circa 8 settimane dalla conferma iniziale) gli animali hanno presentato negatività sia da tampone tracheale che cloacale.

I dati preliminari di WGS (*Whole Genome Sequencing*) su campioni clinici respiratori del cap. 3 e 4 hanno permesso di mettere in evidenza mutazioni amminoacidiche associate a meccanismi di adattamento del virus A/H1N1pdm(09) all'ospite aviare, che potrebbero avallare l'ipotesi di trasmissione orizzontale anche nei maschi.

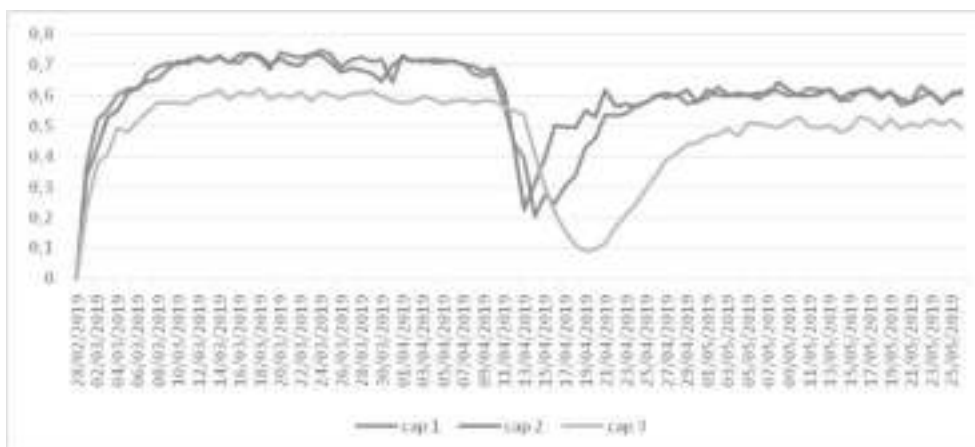
-sieri di sangue: gli animali di tutti i 4 capannoni hanno mostrato una marcata sieroconversione sia in ELISA che tramite test dell'inibizione dell'emoagglutinazione con titoli elevati (1:1024-1:2048), con diminuzione degli stessi dopo circa 8 settimane dalla conferma.

-carcasse delle femmine: le diverse metodiche diagnostiche applicate agli organi hanno confermato il tropismo virale per l'apparato riproduttore e nel contempo un coinvolgimento sistemico dell'infezione in particolare a carico di sierose della cavità celomatica, trachea, parenchima pancreatico e delle tonsille cecali.

-trasmissione verticale ed *egg-borne dissemination*: le analisi eseguite sulle matrici sperma, guscio di uova beccate scarto schiusa, e *pool* di organi di embrioni e/o tacchinotti di un giorno di vita non hanno evidenziato segni di trasmissione verticale.

-immunità passiva: il 23 % dei tacchinotti testati alla schiusa per anticorpi materni è risultato positivo sia al test ELISA sia in HI (1:64-1:128).

Infine, l'andamento delle curve di ovideposizione (Fig. 1) ha messo in evidenza un calo medio di produzione di uova del 46% ed una *Egg Drop* a carattere autolimitante, seguita da una ripresa all'ovideposizione di tutti i gruppi ma con un calo medio di *performance* rispetto allo *standard* del 16%.



**Fig. 1** Curve di deposizione dei diversi capannoni

Le curve di deposizione hanno mostrato delle tempistiche variabili di calo e ripresa tra i tre capannoni; nello specifico il capannone 1 dall'inizio del calo ha raggiunto il blocco di produzione dopo circa tre giorni, il capannone 2 dopo due giorni e il capannone 3 dopo sei giorni. Anche la durata della ripresa ha presentato tempistiche diverse tra i capannoni: per il capannone 1 circa sette giorni, tre giorni per il capannone 2 e sette giorni per il capannone 3.

E' inoltre interessante notare che gli animali campionati in prossimità o dopo il l'arresto della ovideposizione (cap. 1 e 2) sono risultati negativi in rRT-PCR e positivi sierologicamente con alti titoli; mentre le femmine del capannone 3 sottoposte a monitoraggio nel tempo, hanno presentato marcata positività in trachea e cloaca durante il calo dell'ovideposizione (con iniziale sieroconversione) e positività da organi delle carcasse conferite 4 giorni *post* blocco dell'ovideposizione.

## DISCUSSIONE

I risultati di questo studio sottolineano ancora una volta la possibilità di infezione delle tacchine da riproduzione con il virus A/H1N1pdm(09), con conseguente danno produttivo associato a improvviso e drastico calo dell'ovideposizione. Sebbene in questo caso non sia stata accertata la modalità di introduzione virale è molto probabile che sia stata associata ad un operatore infetto e alle pratiche di inseminazione artificiale alle quali le tacchine venivano sottoposte due volte alla settimana a giorni alterni. Una particolarità di questo caso diagnostico rispetto a quelli fin ora riportati in letteratura è l'evidenza di infezione nei maschi con *shedding* virale respiratorio e cloacale fino a 8 giorni *post* diagnosi e marcata sieroconversione (titoli anticorpali in HI fino a 1:4096).

Gli studi condotti sulle carcasse hanno permesso di evidenziare un tropismo specifico per l'apparato riproduttore, che spiegherebbe il momentaneo calo e blocco della ovideposizione, ma anche la disseminazione dell'agente virale in altri organi, nello specifico trachea, pancreas e intestino (tonsille cecali). Parallelamente i dati preliminari di WGS hanno evidenziato in alcuni campioni clinici tracheali (soggetti del cap. 3 e cap. 4) la presenza di mutazioni amminoacidiche associate a meccanismi di adattamento del virus alla specie aviaria, che potrebbero avvalorare l'ipotesi di trasmissione orizzontale inter-capannone incluso quello dei maschi. Nonostante il tropismo virale per l'ovidutto, le analisi svolte per la valutazione della trasmissione verticale alla progenie e la *egg-borne dissemination* hanno escluso tali possibilità.

I dati laboratoristici (rRT-PCR e sierologia) integrati con i dati produttivi di ovideposizione suggeriscono che per la diagnosi virologica di A/H1N1pdm(09) sia utile campionare gli animali durante i primi giorni associati al calo dell'ovideposizione con tamponi tracheali e cloacali poiché gli animali campionati *intra vitam* nei giorni durante l'arresto della deposizione risultavano positivi solo sierologicamente.

## CONCLUSIONI

L'evidenza di infezione dei tacchini da riproduzione con il virus pandemico umano (*reverse-zoonosis*) sottolinea l'importanza del rispetto dei principi della biosicurezza in allevamento, delle buone pratiche di igiene e lavorazione e della profilassi vaccinale antiinfluenzale degli operatori del settore avicolo, e nello specifico delle squadre impegnate nella pratica di inseminazione artificiale in questa categoria produttiva.

L'elevata e riconosciuta suscettibilità della specie tacchino nei confronti di virus influenzali tipo A (anche a bassa patogenicità) deve essere tenuta in considerazione per possibili meccanismi di adattamento e riassortimento tra l'H1N1pdm(09) e virus aviari con possibili rischi per la sanità pubblica e animale.

## BIBLIOGRAFIA

1. C. Mahieu, V. Moreno, A. Gonzalez, A. Rivera, J. Fuller, C. Jara, C. Lecocq, M. Rojas, A. Garcia, M. Vasquez, M. Agredo, C. Gutierrez, H. Escobar, C. Ternicier, P. Avalos. *Pandemic (H1N1) 2009 in Breeding Turkeys, Valparaiso, Chile*. Emerging Infectious Diseases, 2010, Vol. 16, No.4
2. C. Terregino, R. De Nardi, R. Nisi, F. Cilloni, A. Salviato, M. Fasolato, I.

- Capua. *Resistance of turkeys to experimental infection with an early 2009 Italian human Influenza A(H1N1)v virus isolate*. Eurosurveillance, 2009, 14:19360
3. M. Pantin-Jackwood, J.L. Wasilenko, E. Spackman, D. Suarez, D. Swayne. *Susceptibility of turkeys to pandemic-H1N1 virus by reproductive tract insemination*. Virology Journal, 2010, 7:27
  4. -Y. Berhane, D. Ojkic, N. Pople, O. Lung, J. Pasick. *Reoccurrence of suspected hyman-to-turkey transmission of H1N1 Pandemic 2009 Virus in Turkey Breeder Flocks in Ontario and Manibota, 2016*. Transboundary and Emerging Diseases, 2016, Vol 63:6
  5. Sjurseth, Siri & Gjerset, Britt & Bragstad, Karoline & Hungnes, Olav & Wisløff, Helene & Er, Chiek & Valheim, Mette & M. Løtvedt, Siri & David, Bruce & A. Hanssen, Skjalg & H. Hauge, Siri & Hofshagen, Merete. (2017). *Human to animal transmission of influenza A(H1N1)pdm09 in a turkey breeder flock in Norway*. Infection Ecology & Epidemiology, 2017, Vol. 7, 1416249