

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DEI CORONAVIRUS FELINI (FCOV) IN GATTI DI PROPRIETÀ E DI COLONIA

MARA BATTILANI¹, TIZIANA CORADIN¹, MAURIZIO ZULIAN²,
MAURIZIO BATTISTINI³, LUIGI MORGANTI¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

²Libero professionista

³Istituto Sicurezza Sociale - Repubblica di San Marino

Riassunto

Ai fini di valutare la diffusione dei coronavirus felini (FCoV) in gatti di proprietà e di colonia, sono stati testati mediante RT-PCR 100 tamponi rettali prelevati da gatti di diversa età e provenienza. Il 55% dei campioni esaminati sono risultati positivi e non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa relativamente alla distribuzione dei soggetti positivi in funzione del sesso, dell'età e della provenienza degli animali. I risultati confermano le strette relazioni esistenti tra diffusione dei FCoV e incidenza della peritonite infettiva felina, in particolare nelle collettività feline e l'utilità della RT-PCR quale test per il monitoraggio periodico dei gatti ai fini di evidenziare i portatori asintomatici eliminatori del virus.

Summary

Survey on feline coronaviruses diffusion in household and feral cats was performed and 100 rectal swabs were analysing using RT-PCR test. Fifty-five per cent of examined samples resulted positive and the prevalence rates in the different catteries and group of animals were statistically not significant. Our results confirming the large diffusion of FCoV and the validity of RT-PCR test to detect healthy carriers.

INTRODUZIONE

I coronavirus felini (FCoV) sono virus a RNA a singolo filamento con polarità positiva, provvisti di envelope, appartenenti all'ordine *Nidovirales*, famiglia **Coronaviridae**¹; colpiscono i felidi domestici e selvatici nei quali provocano un'infezione enterica subclinica o di lieve entità e talvolta una rara e fatale malattia immuno-mediata, la peritonite infettiva felina (PIF)².

Dal punto di vista patogenetico si distinguono due biotipi, il coronavirus enterico felino (FECV) e il virus della peritonite infettiva felina (FIPV)³.

I due biotipi FECV e FIPV sono strettamente correlati fra loro ed è stato dimostrato che il virus responsabile della malattia, il FIPV, deriva dall'innocuo FECV in seguito a mutazioni del genoma virale che si determinano nell'organismo dell'animale infetto: il termine FIPV di conseguenza indica quei virus che veicolano le mutazioni responsabili dell'aumento della virulenza⁴.

Sulla base delle caratteristiche antigeniche vengono riconosciuti due sierotipi, tipo I e tipo II^{5,6}. Il tipo I è il coronavirus del gatto predominante in Europa, difficile da adattare in coltura cellulare, mentre il tipo II si adatta con facilità su linee cellulari di origine felina e reagisce dal punto di vista antigenico con il coronavirus del cane (CCV), con il quale condivide una elevata omologia di sequenza a livello di spike: infatti è stato ipotizzato che il sierotipo II sia il risultato di fenomeni di ricombinazione avvenuti tra tipo I e CCV⁷.

Prerogativa dei FCoV è di determinare infezioni persistenti, in particolare nei soggetti che vivono nell'ambito delle collettività feline (oasi, gattili, allevamenti), creando uno stato di portatore cronico per lo più asintomatico che gioca un ruolo epidemiologico estremamente importante ai fini dell'eliminazione del virus con le feci e del mantenimento dell'infezione nell'ambiente mediante un ciclo oro-fecale⁸.

Si può quindi affermare che la maggior parte di questi virus sono innocui e perfettamente adattati a crescere nell'intestino senza provocare alcuna sintomatologia evidente e che la malattia non è altro che la punta fatale di una infezione estremamente diffusa nella popolazione felina. La

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 7/11/2002 ed accettato per pubblicazione dopo revisione l'11/2/2003".

peritonite infettiva felina presenta un andamento sporadico, con un'incidenza del 5%, ma in alcune situazioni, quali quelle che si creano nelle collettività feline, può assumere il carattere di una vera e propria epidemia con una mortalità pari anche al 40%⁹.

La conoscenza della diffusione dei FCoV fornisce importanti informazioni circa il rischio di sviluppo della malattia, in quanto maggiore è la diffusione dell'infezione, maggiore è la possibilità che si verifichino quelle mutazioni del genoma virale responsabili dell'incremento della virulenza⁴. Risulta quindi estremamente utile il monitoraggio dei gatti allo scopo di valutare l'incidenza dell'infezione da FCoV. Poiché l'isolamento su coltura cellulare è difficoltoso, è stata proposta l'applicazione dell'amplificazione genica (RT-PCR) come test per il rilievo dei portatori asintomatici^{10,11}.

Mentre diverse indagini sono state condotte negli Stati Uniti e in Europa per valutare la diffusione dei FCoV utilizzando l'RT-PCR^{11,12}, in Italia non esistono dati circa la prevalenza dei FCoV; a tale scopo abbiamo condotto la presente indagine, analizzando mediante RT-PCR sia gatti di proprietà che gatti provenienti da collettività.

MATERIALI E METODI

Campioni

Nel periodo marzo 2000-marzo 2002 sono stati raccolti 100 tamponi rettali prelevati da gatti di età variabile dai 3 mesi agli 11 anni, provenienti da diverse regioni del Nord Italia. I gatti esaminati non mostravano segni clinici riferibili alla peritonite infettiva felina.

L'86% degli animali testati viveva a stretto contatto con altri gatti in rifugi gestiti da volontari o in allevamento: in particolare sono stati esaminati 3 gattili indicati come A, B, C.

Il 14% era rappresentato da gatti di proprietà testati in ambulatorio nell'ambito di visite routinarie (Tabella 1).

RT-PCR

I tamponi rettali sono stati stemperati in 200 µl di tampone fosfato pH 7,2 e sottoposti a trattamento termico alla temperatura di 95°C per 5 minuti per inattivare sostanze inibenti l'attività della DNA polimerasi¹¹. La sospensione fecale così ottenuta è stata sottoposta ad

amplificazione genica mediante RT-PCR eseguita secondo la tecnica descritta da Gut et al.¹³ utilizzando i primer FCoV1128f 5'-TTG ATT TGG CAA TGC TAG ATT TA-3' e FCoV1229r 5'-AGC TCT GGA TCT AGT GAT TGT TT-3' disegnati su una zona particolarmente conservata dell'ORF 7b, regione genomica che codifica una glicoproteina strutturale a funzione sconosciuta. Tali primer consentono l'amplificazione di un frammento specifico di cDNA di 102 bp. L'RT-PCR è stata realizzata in un unico step utilizzando un kit del commercio (Advantage one-step RT-PCR, Clontech-USA), che consente di retrotrascrivere ed amplificare RNA ricco in GC, a struttura secondaria complessa quale il genoma virale dei FCoV. La reazione di amplificazione genica è stata eseguita su un volume finale di 50 µl contenenti 5 µl della sospensione fecale, 5 µl di One Step Buffer 10X (contenente 30 mM di MgCl₂), 1 µl di dNTPs mix (10mM ciascuno), 20 U di RNase Inhibitor, 45 picomoli di ciascun primer, 25 µl di ThermoStabilizing Reagent che permette la conduzione della trascrizione inversa anche ad elevate temperature, 10 µl di GC melt che destabilizza le strutture secondarie dell'RNA nelle regioni ricche in GC e 1 µl di RT-Advantage Taq Plus enzyme mix. La retrotrascrizione dell'RNA in cDNA prevedeva un primo step a 50°C per 1 ora, seguito da una fase di inattivazione a 94°C per 5 minuti; l'amplificazione genica è stata realizzata mediante 35 cicli, ciascuno dei quali costituito da una fase di denaturazione di 94°C per 30 secondi, una di annealing a 62°C per 1 minuto e una di estensione a 68°C per 1 minuto. La reazione è stata completata da una fase di estensione finale a 68°C per 5 minuti. Contemporaneamente ai campioni, esaminati a gruppi di 5-8 per volta, sono stati processati un controllo positivo, un controllo negativo e un bianco (acqua ultrapura sterile). Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo di FCoV e come controllo negativo un campione di feci provenienti da un gatto negativo per FCoV, entrambi forniti dal prof. H. Lutz dell'Università di Zurigo (Svizzera).

I prodotti della PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio e visualizzati mediante raggi UV.

ANALISI STATISTICA

È stata valutata mediante il test chi-quadrato la proporzione dei soggetti positivi in funzione del sesso, delle classi di età (<1 anno, 1-5 anni, >5 anni) e della provenienza degli animali, distinguendo i gatti di proprietà dai gatti provenienti da colonie.

RISULTATI

55 animali sui 100 testati (55%) hanno evidenziato alla RT-PCR il prodotto di amplificazione atteso di 102 bp, analogamente al ceppo utilizzato come controllo positivo (Figura 1).

La prevalenza dei coronavirus felini è risultata distribuita omogeneamente tra le classi di età, con il 55,5% dei soggetti positivi tra i gatti di età inferiore ad 1 anno, il

Tabella 1
Caratteristiche dei campioni esaminati e relativi risultati

Provenienza	N° soggetti esaminati	Positivi	Negativi
Proprietà	14	6 (42,9%)	8
Gattile A	44	27 (61,4%)	17
Gattile B	13	7 (53,8%)	6
Gattile C	22	9 (41%)	13
Altro	7	6	1
TOTALE	100	55 (55%)	45

55,9% tra gli animali di 1-5 anni e il 58,8% tra i gatti di età superiore a 5 anni (Figura 2a). Nell'ambito delle collettività oggetto della presente indagine la prevalenza è risultata del 61,4% per il gattile A, 53,8% per il gattile B, 41% per il gattile C (Tabella 1).

Nei gatti di proprietà la prevalenza dei FCoV è risultata del 42,9%. Nella figura 2b e 2c è visualizzata graficamente la positività alla RT-PCR in funzione del sesso e della provenienza degli animali.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative relativamente alla distribuzione dei soggetti positivi in funzione del sesso, dell'età e della provenienza degli animali ($p < 0,05$).

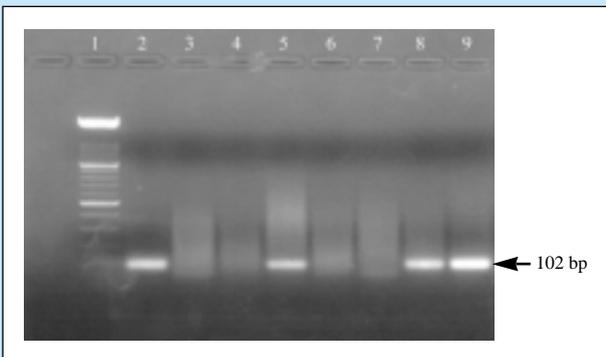


FIGURA 1 - Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione di alcuni dei campioni analizzati. Lanes: (1) DNA marker di peso molecolare; (2) controllo positivo; (3) controllo negativo; (4) bianco; (5, 8, 9) aspetto di alcuni campioni risultati positivi; (6, 7) aspetto di alcuni campioni risultati negativi.

DISCUSSIONE

Recentemente è stata messa a punto una tecnica di RT-PCR quale test per il rilievo dei coronavirus felini nelle feci e nei tessuti^{8,10}. Indagini precedentemente effettuate nell'ambito di collettività feline e tra i gatti di proprietà hanno riportato una elevata diffusione dei FCoV con positività variabili tra il 30-70%^{11,14}.

Nella presente indagine il 55% dei gatti analizzati è risultato positivo alla RT-PCR, analogamente a quanto riportato da altri Autori^{11,12}; nei gatti di colonia la prevalenza dei soggetti positivi era del 57%, mentre nei gatti di proprietà del 42,9%. Non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa riguardo il sesso e l'età, nonostante fosse prevedibile una maggiore diffusione dell'infezione tra gli animali giovani, in considerazione della maggiore incidenza della PIF tra i soggetti di età compresa tra i 4 mesi e i 2,5 anni¹⁴.

La proporzione dei soggetti positivi è risultata omogenea anche sulla base della provenienza degli animali, nonostante nelle collettività si creino quelle condizioni che favoriscono l'endemizzazione dell'infezione. L'anamnesi ha peraltro evidenziato che i gatti di proprietà esaminati erano stati adottati in rifugi o oasi feline, o avevano libero accesso all'esterno con possibilità di contatto con altri gatti.

Nei gattili esaminati, la prevalenza dell'infezione è risultata particolarmente elevata, in particolare nei gattili A e B, dove negli anni precedenti alla presente indagine si erano verificati numerosi casi di malattia con puntate epidemiche che avevano drasticamente ridotto la popolazione: questo dato conferma ancora una volta le strette relazioni

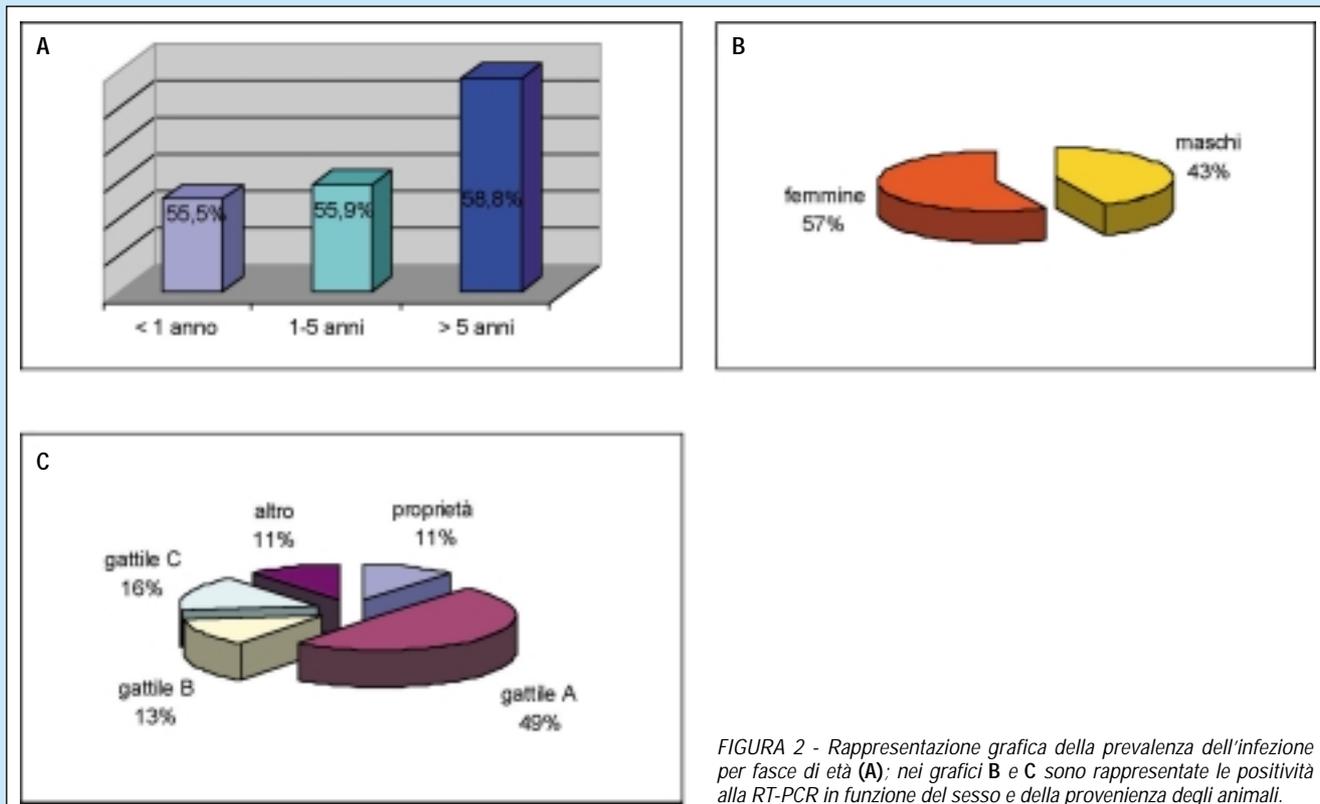


FIGURA 2 - Rappresentazione grafica della prevalenza dell'infezione per fasce di età (A); nei grafici B e C sono rappresentate le positività alla RT-PCR in funzione del sesso e della provenienza degli animali.

esistenti tra diffusione dei FCoV e incidenza della PIF e come l'eliminazione della malattia dalle collettività sia possibile solamente con la completa eradicazione dell'infezione da FCoV.

L'eradicazione dell'infezione da FCoV nelle comunità feline risulta però estremamente difficoltosa per la presenza di portatori asintomatici. L'eliminazione virale attraverso le feci può essere intermittente⁸, da cui la necessità di controlli mensili e protratti nel tempo per identificare i portatori cronici asintomatici. A tale proposito la RT-PCR si è dimostrata una metodica efficace all'evidenziazione di questi soggetti³.

La sola separazione dei soggetti identificati come portatori asintomatici mediante RT-PCR non è di per sé sufficiente se non quando associata ad appropriate misure di gestione delle collettività feline:

- sensibilizzazione del personale addetto in quanto tramite le scarpe e i vestiti contaminati possono diffondere il virus tra gli animali sensibili;
- progettazione dei gattili in modo da consentire la separazione tra i soggetti giovani maggiormente sensibili all'infezione dagli adulti;
- contenimento della densità di popolazione (massimo 8-10 soggetti per gruppo);
- svezzamento precoce dei gattini
- utilizzo di materiali impermeabili per le strutture dei gattili che devono essere lavate e disinfettate frequentemente;
- cambio quotidiano della lettiera.

La combinazione di queste misure di profilassi unitamente a un controllo periodico dei soggetti potrà impedire l'endemizzazione dell'infezione da FCoV nell'ambito delle colonie feline e il conseguente rischio di sviluppo della peritonite infettiva felina.

Parole chiave

Coronavirus felini, FCoV, gatti, RT-PCR.

Key words

Feline coronaviruses, FCoV, cats, RT-PCR.

Bibliografia

1. De Vries AAF, Horzineck MC, Rottier PJM, De Groot R: The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Sem Virol* 8: 33-47, 1997.
2. Horzinek MC, Lutz H: An update of feline infectious peritonitis. *Vet Sci Tomorrow*, 1, http://www.vetscite.org/cgi-bin/pw.exe/vst/reviews/ndex_1_0800.htm, 2001.
3. Pedersen NC: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infection. *Feline Practice* 23: 7-22, 1987.
4. Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC: Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243: 150-157, 1998.
5. Hohdatsu T., Sasamoto T., Okada S., Koyama H: Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1863. *Vet Microbiol* 28: 13-24, 1991.
6. Hohdatsu T, Okada S, Koyama H: Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. *Arch Virol* 117: 85-95, 1991.
7. Herrewegh AAPM, Smeenk I., Horzineck MC., et al.: Feline coronavirus type II strains 79-1863 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* 72: 4508-14, 1998.
8. Herrewegh AAPM, Mahler M., Hedrich HJ, et al.: Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat breeding colony. *Virology* 234: 349-363, 1997.
9. Pedersen NC: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infection. *Feline Practice* 23: 7-22, 1995.
10. Herrewegh AAPM, De Groot R, Cepica A, et al.: Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clinical Microbiol* 33: 684-689, 1995.
11. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC: Pattern of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *JAVMA* 210: 1307-1312, 1997.
12. Kiss I, Kecskeméti S, Tanyi J et al.: Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet J* 159: 64-70, 2000.
13. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, et al.: One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 77: 37-46, 1999.
14. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC: Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *JAVMA* 210: 1313-1318, 1997.