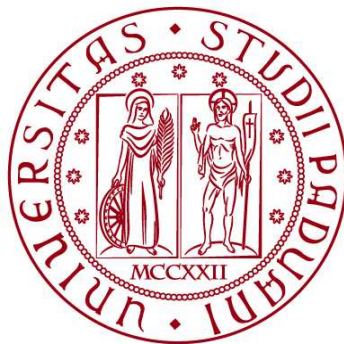


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**IDENTIFICAZIONE VIRALE E ANALISI DELLA
DISTRIBUZIONE TISSUTALE IN UN GRAVE CASO DI
PERITONITE INFETTIVA FELINA**

Tutor: Prof. Giovanni Franzo

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS)

Laureando: Thomas Dalla Zuanna

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	2
STATO DELL'ARTE.....	3
MATERIALI E METODI.....	10
Campionamento	10
Estrazione dell'RNA.....	10
Amplificazione tramite RT-qPCR.....	12
RISULTATI e DISCUSSIONE	14
CONCLUSIONE.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19

RIASSUNTO

La peritonite infettiva felina (FIP) è una malattia causata da un Feline coronavirus (FCoV), e rappresenta una causa importante di mortalità nel gatto.

Nella maggior parte dei casi l'infezione da FCoV non causa alcuna malattia se non blande forme enteriche, ma può succedere che, a causa di mutazioni del virus nell'ospite, acquisisca la capacità di replicare e diffondere a livello sistemico, determinando una patologia dall'esito tipicamente fatale.

Tuttavia, in questa forma, l'infettività è considerata assente o estremamente ridotta. Recentemente sono però emerse alcune evidenze della presenza dei ceppi ad alta virulenza caratterizzati da elevata trasmissibilità.

Lo studio descritto nella tesi ha come scopo la validazione di una metodica di laboratorio per l'identificazione e quantificazione del virus della FIP e la sua applicazione nella diagnosi di infezione in un outbreak potenzialmente causato da uno di questi ceppi.

Lo studio è cominciato con la titolazione del virus in diversi organi per valutarne preliminarmente la distribuzione tissutale e quindi la rilevanza. Successivamente è stata valutata la presenza di infezione in gatti che condividevano lo stesso ambiente. I risultati così ottenuti, che verranno integrati in futuro con dati epidemiologici, rappresentano un punto di partenza fondamentale per l'implementazione di un approccio diagnostico e di monitoraggio precoce, e per contribuire alla conoscenza della patogenesi e diffusione di questa patologia in Italia.

ABSTRACT

Feline Infectious Peritonitis (FIP) is a disease caused by a Feline coronavirus (FCoV) and represents an important cause of cat mortality.

In the majority of cases, the FCoV infection does not cause any disease other than mild enteric forms but, because of virus mutations inside the host, the virus can gain the ability to replicate and spread at a systemic level, causing a pathology that has a typically fatal outcome.

However, in this form, infectivity is considered absent or extremely reduced.

Recently, though, some evidence has emerged of the presence of highly virulent strains characterized by high transmissibility.

The study described in this thesis aims to validate a laboratory method for the identification and quantification of the FIP virus and its application in the diagnosis of infection in an outbreak potentially caused by one of these strains.

The study began with the titration of the virus in different organs to preliminarily evaluate its tissue distribution and therefore its relevance. Thereafter, the infection status of other cats sharing the same environment was also assessed.

The obtained results, which will be integrated in the future with epidemiologic data, represent a fundamental starting point for the implementation of an early monitoring and diagnostic approach, and to contribute to the knowledge of the pathogenesis and spread of this pathology in Italy.

STATO DELL'ARTE

La recente pandemia di SARS-CoV-2, così come altre infezioni emergenti causate da coronavirus (e.g. SARS-CoV e MERS) hanno rivelato quanto questi virus possano avere un impatto sulla salute dell'uomo a causa della loro flessibilità evolutiva ed elevatissima trasmissibilità.

Tuttavia, non sono solamente gli esseri umani a essere afflitti da questo tipo di virus. Al contrario, varie specie di coronavirus sono note da decenni come rilevanti patogeni animali.

Un esempio di coronavirus con tropismo per gli animali è il coronavirus felino (FCoV), che esiste in 2 genotipi diversi, FCoV-I e FCoV-II, entrambi divisi in 2 biotipi differenti: un biotipo presenta bassa virulenza ed è noto come coronavirus enterico felino (FECoV), mentre il secondo biotipo è caratterizzato da una virulenza molto più elevata ed è noto come virus della peritonite infettiva felina (FIPV) che causa la FIP.

Similmente agli altri coronavirus, FCoV è un virus con envelope, sulla cui superficie sono presenti delle strutture a forma di clava dette "Spike" che hanno un ruolo fondamentale nell'adesione del virus alle cellule target dell'ospite per cui presenta tropismo (Thayer et al., 2022).

Il genoma di FCoV (Figura 1), a RNA positivo a singolo filamento e lungo circa 29kb, presenta una regione 5'UTR di circa 310 nucleotidi che contiene la sequenza di regolazione della trascrizione (TRS Transcription Regulatory Sequence), conservata in tutti i FCoV. La regione 3'UTR è invece lunga approssimativamente 275 nucleotidi ed è seguita da una coda poliA. Indicativamente 2/3 del genoma sono costituiti dagli Open Reading Frames (ORFs) 1a e 1b, che codificano per delle poliproteine il cui clivaggio comporta la formazione delle proteine necessarie per l'assemblaggio del complesso di replicazione/trascrizione.

Il terzo rimanente del genoma di FCoV contiene 4 geni che codificano per 4 proteine strutturali fondamentali chiamate proteine Spike (S), dell'envelope (E), della membrana (M) e del nucleocapside (N) oltre a numerosi geni accessori (Tekes & Thiel, 2016).

La glicoproteina Spike ha il compito di mediare l'adesione del virus alla cellula target, cui seguirà l'internalizzazione e quindi l'infezione.

Strutturalmente può essere divisa in una metà amino-terminale (dominio S1) che contiene la regione volta al legame col recettore della cellula target, e una metà carbossi-terminale (dominio S2) che contiene strutture coinvolte nella fusione tra envelope e membrana cellulare come il peptide di fusione (Lewis et al., 2015).

Il gene M codifica per la proteina di membrana, una piccola proteina strutturale che interagisce con l'envelope e il core del virus.

Il gene E codifica invece per una proteina dell'envelope di minore importanza, mentre il gene N codifica per la proteina costituente i capsomeri del nucleocapside. Inoltre, sono presenti anche gli ORFs 3a, 3b, 3c (situati dopo il gene S) e gli ORFs 7a e 7b (situati dopo il gene N) che hanno una funzione non ancora nota (Kennedy, 2020).

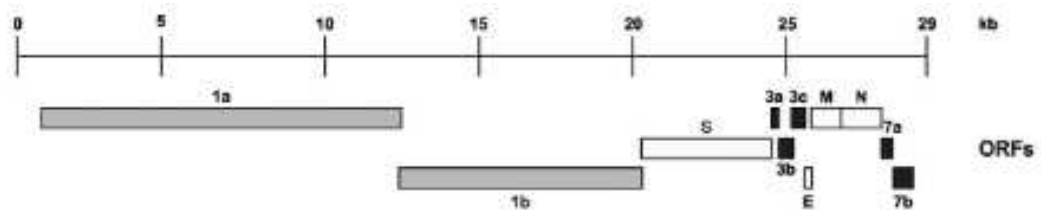


Figura 1 Rappresentazione del genoma di FCoV (Tekes & Thiel, 2016).

Questi virus sono in grado di trasmettersi orizzontalmente da gatto a gatto per via oro-fecale, attraverso secrezioni orali o le feci oppure verticalmente da madre a cucciolo e perciò la loro trasmissione è fortemente facilitata all'interno di gattili o altre strutture con affollamenti di gatti.

FECoV presenta tropismo per le cellule del tratto intestinale, causando così una patologia di lieve entità che si limita ad una leggera enterite, ossia, nel peggiore dei casi, una lieve infiammazione dell'intestino tenue.

Tuttavia, è possibile che FECoV durante la replicazione nell'ospite vada incontro a mutazioni che portano all'emergere del biotipo virulento FIPV (Decaro et al., 2021).

La replicazione di questo virus inizia con l'adsorbimento tra alcuni specifici recettori della cellula ospite e un ligando ad essi complementare posto sull'estremità della proteina Spike.

Questa interazione causa un cambiamento conformazionale nel peptide di fusione, il quale lega più saldamente il virus alla cellula e media la sua penetrazione tramite fusione all'interno dell'ospite.

Il virus viene quindi internalizzato nella cellula e il suo genoma, a seguito dello svestimento, viene rilasciato nel citosol dove può avvenire la sintesi delle proteine impiegate nella replicazione virale.

Alcune di queste proteine mediano la formazione del complesso di replicazione/trascrizione, comprensivo di una RNA polimerasi RNA-dipendente che crea copie complementari del genoma del virus, le quali verranno usate come template per la formazione di nuovi filamenti di RNA uguali a quello di partenza (Pedersen, 2014).

In quest'ultimo passaggio è possibile che avvengano mutazioni virali.

I virus a RNA come FECoV hanno infatti un alto tasso di mutazione in quanto le RNA polimerasi virali tendono a commettere errori più spesso rispetto alle controparti a DNA e sono prive di una attività di proofreading per correggere tali errori.

Naturalmente, maggiore è il numero di repliche maggiore è la probabilità dell'emergere e accumularsi di mutazioni biologicamente rilevanti. Ne consegue che un'infezione cronica di FECoV rappresenta il momento perfetto per sviluppare mutazioni (Kennedy, 2020).

A seguito della mutazione, FECoV perde il tropismo per gli enterociti e acquisisce tropismo per monociti e macrofagi, evento che gli permette di diffondere a livello sistemico dove causa una tempesta citochinica che può sfociare nell'apparizione di effusioni nelle cavità corporee oppure nella formazione di granulomi perivascolari in membrane sierose o organi (Decaro et al., 2021).

FIPV ha una maggiore tendenza a colpire gatti giovani fino ai 2 anni di età, mentre colpisce meno frequentemente i gatti con età maggiore ai 7 anni.

Sembra inoltre che i gatti maschi siano più colpiti dal virus rispetto alle femmine (Riemer et al., 2016).

Questo cambiamento nel tropismo, tuttavia, rende FIPV molto meno contagioso rispetto a FECoV e conseguentemente la maggioranza di nuovi individui infetti da FIPV deriva da un'infezione da parte di FECoV.

Diversi geni di FCoV sono stati proposti essere il punto in cui avviene la mutazione responsabile del cambiamento del biotipo da FECoV a FIPV e sono perciò stati analizzati. Il sequenziamento dell'ORF 3abc, che codifica per le proteine accessorie 3a, 3b e 3c, e la sua comparazione tra campioni di FECoV e campioni di FIPV ha rivelato che questi ultimi presentano una proteina 3c tronca, mentre in FECV è invece intatta.

Anche l'ORF 7ab, codificante per le proteine accessorie 7a e 7b, è stato soggetto a tali studi ma con risultati piuttosto contraddittori (Felten & Hartmann, 2019).

La FIP si può presentare in due forme cliniche: la FIP Umida e quella Secca. La FIP Umida (effusiva) si manifesta con accumulo di liquido nelle cavità corporee, come l'addome (ascite) o il torace (versamento pleurico), causato da vasculite. Fra i sintomi si osservano perdita di peso, febbre persistente, letargia, difficoltà respiratorie (a causa del versamento pleurico) e distensione addominale (a causa dell'ascite). Il versamento è tipicamente viscoso, di color paglierino, chiaro o moderatamente torbido e solitamente forma coaguli dovuti al suo alto contenuto di proteine. Purtroppo, la prognosi è generalmente infausta, con sopravvivenza limitata a settimane o pochi mesi dopo la comparsa dei sintomi.

La FIP Secca (non effusiva) si manifesta senza l'accumulo di liquido. Invece, si formano granulomi (noduli) infiammatori in vari organi, come il fegato, i reni, l'intestino, e il sistema nervoso centrale. I sintomi variano a seconda degli organi colpiti, ma possono includere febbre persistente, perdita di peso, ittero, sintomi neurologici (come atassia, convulsioni) e segni oculari (come uveite). Anche questa forma è generalmente letale, ma può avere un decorso più lento rispetto alla FIP umida, con sopravvivenza che può estendersi per mesi.

La distinzione tra le due forme di FIP non è, tuttavia, così netta. Vi sono casi di FIP che presentano effusioni ma anche lesioni granulomatose, oppure casi nei quali la FIP Umida col tempo evolve nella FIP secca o viceversa con relativo cambiamento dei segni clinici (Tasker et al., 2023).

Anormalità ematologiche sono molto comuni in gatti affetti da FIP. Tali irregolarità includono principalmente anemia, microcitosi, linfopenia (più comune in gatti con effusione) e trombocitopenia.

La maggioranza dei gatti affetti da FIP presenta anche anomalie del siero, che includono iperproteinemia, iperglobulinemia e ipoalbuminemia (Felten & Hartmann, 2019).

Nel Gennaio 2023 è avvenuto un enorme outbreak di FIP a Cipro, che fino a Luglio 2023 ha comportato la morte di ben 300.000 gatti secondo quanto riportato dalla Cat Protection and Welfare Society.

Questo non rispecchia la bassa capacità di trasmissione di FIPV da un gatto all'altro. È stato quindi condotto uno studio con l'obiettivo di scoprire le peculiarità di questo outbreak e del ceppo responsabile rispetto ai casi precedenti al 2023.

Sono stati prelevati 93 campioni derivati da casi di FIP dal 2021 al 2023, e sono stati sottoposti a sequenziamento tramite tecnologia Oxford Nanopore.

Questa tecnica di sequenziamento prevede il passaggio del DNA/RNA attraverso una proteina canale che collega 2 versanti di una membrana ai quali viene imposta una differenza di potenziale elettrico.

Durante il passaggio, in base alle caratteristiche chimico-fisiche dei nucleotidi impegnati nella proteina canale si determina una variazione della resistenza elettrica.

E' possibile quindi rilevare la variazione di corrente ionica che avviene per ogni base, e grazie al valore ottenuto è possibile identificare una ad una tutte le basi della sequenza.

Attenzione maggiore è stata posta al sequenziamento della regione di RNA che codifica per la proteina Spike essendo questa implicata nel tropismo cellulare e quindi un probabile fattore di virulenza per il virus.

A seguito di questo sequenziamento, avvenuto con successo in 45 campioni, sono state identificate 3 diverse versioni per la sequenza di RNA codificante la proteina Spike, che sono state confrontate con database di RNA virali tramite l'utilizzo di BLASTn per individuare RNA simili alle sequenze campione.

La prima versione della sequenza per la Spike, sequenziata solamente in 2 campioni, presenta una similarità del 79% con un FCoV-I.

La seconda e terza versione della sequenza per la Spike, invece, presentano un'alta percentuale di identità con la Spike di Coronavirus canino II (CCoV-II), integrata in un *backbone* rappresentato dalla sequenza di FCoV-I (Figura 2).

La Spike di CCoV-II per cui è stata trovata similarità appartiene al ceppo NA/09, un coronavirus canino pantropico (pCCoV) ipervirulento.

Quindi in 43 dei 45 campioni totali dei quali è stata sequenziata la Spike, si è evidenziata una quasi totale similarità con la spike di un CCoV-II, che quindi rappresenta probabilmente una caratteristica chiave dei virus circolanti nell'outbreak di Cipro. Inoltre, una delezione è stata osservata nella maggior parte delle sequenze osservate (Figura 2) (Warr, 2023).

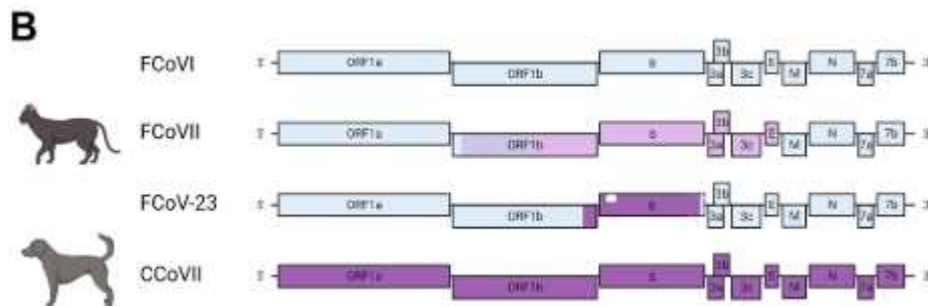


Figura 2 Rappresentazione schematica delle ricombinazioni tra FCoV e CCoV (Warr, 2023).

Poiché il virus sequenziato nei campioni di gatti derivati dall'outbreak di Cipro non era stato precedentemente descritto, è stato chiamato FCoV-23 e si caratterizza principalmente per contenere al suo interno una grande porzione di RNA derivata da CCoV-II.

Sulla base delle evidenze derivate dal sequenziamento, sembrerebbe che FCoV-23 derivi dal processo di ricombinazione tra un FCoV e CCoV-II.

Un'analisi di ricombinazione ha evidenziato come questa coinvolga una piccola porzione del gene Pol1b e la maggior parte del gene S per la proteina Spike. Infatti, il primo *breakpoint* è stato identificato prima del gene S, mentre il secondo è interno al gene stesso, vicino alla sua estremità 3', sebbene la scarsità di sequenze di genoma completo attualmente disponibili complichino una precisa definizione dei siti di ricombinazione.

Ciò giustificerebbe la gravità dei sintomi riferibili a FIP, derivanti da FIPV, e l'alta trasmissibilità derivata da CCoV-II.

La Spike di FCoV-23 determina il tropismo, oltre per monociti e macrofagi, anche per gli enterociti e ciò apre le porte alla trasmissione del virus per via oro-fecale tramite le feci.

Questo, unito all'aumentata stabilità al di fuori di un ospite animale, conferisce a FCoV-23 un grado di infettività molto elevato (Warr, 2023).

Recentemente, un outbreak di FIP apparentemente caratterizzato da alta trasmissibilità virale è stato segnalato in Italia, rendendo necessaria l'esecuzione di studi volti a verificare se questo sia causato da un virus in qualche modo correlato con FCoV-23 di Cipro.

MATERIALI E METODI

Lo step preliminare per confermare la relazione tra l'outbreak di FIP a Cipro e la comparsa di nuovi outbreak in Italia è stato l'esecuzione di un test diagnostico per dimostrare l'effettiva infezione da FCoV, seguito da un ulteriore test diagnostico per verificare l'elevata capacità di trasmissione del virus in ambienti chiusi ed affollati.

Campionamento

I campioni utilizzati in questo studio sono stati prelevati da gatti provenienti da un gattile del veronese.

In uno dei soggetti è stato eseguito un approfondito esame della distribuzione tissutale virale a partire da campioni di diversi tessuti prelevati durante l'esame necroscopico, quali cuore, omento, polmone, cervello, utero, rene, fegato, milza, linfonodo mediastinico, bile, versamento pleurico, versamento addominale, cervelletto, surrene e pancreas.

In aggiunta è stata effettuata l'analisi di campioni di sangue appartenenti a 9 diversi gatti residenti nello stesso gattile del soggetto precedentemente analizzato.

Estrazione dell'RNA

Per tutti i campioni inclusi nello studio lo step preliminare è rappresentato dall'estrazione dell'RNA, che è stata effettuata con il kit di estrazione Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology).

Per l'estrazione dell'RNA si è fatto riferimento al protocollo di preparazione del materiale riportato nel kit, che differisce a seconda che il campione sia solido, un versamento liquido, oppure del sangue.

Il procedimento è cominciato con l'omogeneizzazione dei campioni solidi.

Sono stati prelevati piccoli pezzi di circa 25mg dei tessuti campione tramite taglio con l'uso di un bisturi a partire da pezzi di tessuto più grandi, che sono poi stati inseriti all'interno di differenti buste di plastica assieme a 2mL di PBS (Phosphate Buffered Saline), che ha il compito di tamponare il pH.

Le buste sono poi state sigillate con il calore ed è stata effettuata un'omogeneizzazione meccanica dei campioni, in modo da disgregare il tessuto e facilitare la lisi delle cellule e la liberazione del loro contenuto sia nella presente fase che nel successivo step, con l'aggiunta del binding/lysis buffer fornito dal kit di estrazione.

Successivamente con una pipetta si è prelevata la quantità massima possibile di omogenato e posto all'interno di differenti provette (una per ciascun campione solido) per lo stoccaggio a lungo termine.

Per i campioni di versamento pleurico e addominale, prelevati tramite inserimento di un tampone nel liquido, è stato necessario tagliare la punta del tampone e inserirla all'interno di una provetta dentro la quale sono stati poi aggiunti 600 µl di PBS. La liberazione della matrice prelevata è stata facilitata tramite vortexing. Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente 500 µl della soluzione ottenuta sono stati poi trasferiti all'interno di 2 provette nuove.

Tutti i campioni così pre-processati sono stati centrifugati per 5 min a 2000rpm per far depositare i residui di tessuto e sono stati prelevati 100 µl di surnatante. Per quanto riguarda i campioni di sangue non è stato necessario eseguire alcun procedimento particolare, perciò è bastato prelevare 100 µl di campione. A questo sono stati aggiunti 400 µl di buffer di lisi e, dopo mescolamento tramite vortex, è stata effettuata un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente.

Sono quindi stati aggiunti 250 µl di isopropanolo a ciascuna provetta.

Il contenuto di ogni Eppendorf è poi stato mescolato tramite ripetute inversioni della provetta e trasferito all'interno di colonnine, ovvero delle strutture che presentano sul fondo una matrice di silicio che trattiene gli acidi nucleici, le quali sono a loro volta poste all'interno di normali provette.

L'isopropanolo aggiunto precedentemente agisce da agente flocculante, che ha il compito di far aggregare gli acidi nucleici in modo che si leghino più facilmente alla matrice silicea della colonnina.

A seguito di una centrifugazione a 14000rpm per 1 minuto, gli acidi nucleici saranno rimasti legati alla matrice silicea mentre il resto del materiale biologico viene rimosso e si deposita sul fondo della provetta.

Dopo la centrifugazione si elimina la provetta con il liquido depositato sul fondo per sostituirla con una nuova e si aggiungono 700 µl di Wash Buffer che ha la

funzione di rimuovere tutti i contaminanti residui dalla matrice silicea, separandoli definitivamente dagli acidi nucleici.

Segue un'ulteriore centrifugazione a 14000rpm per 1 minuto, si elimina nuovamente la provetta con il liquido depositato sul fondo per cambiarla con un'altra provetta e si ripete questo ultimo passaggio.

Per il terzo ciclo di wash si aggiungono solamente 300 µl di Wash Buffer alla colonnina, per poi centrifugarla per 2 minuti a 14000 rpm.

Come per i passaggi precedenti si sostituisce la provetta eliminando il liquido depositato sul fondo. L'ultimo step è rappresentato dall'eluizione degli acidi nucleici così purificati. Si procede quindi con l'aggiunta di 50 µl di acqua e incubazione per 3 minuti, per rompere i legami tra acidi nucleici e matrice silicea.

A seguito di una ulteriore centrifugazione a 14000rpm per 1 minuto, tutti gli acidi nucleici estratti si ritroveranno sul fondo della nuova eppendorf, perciò è stata eliminata la colonnina.

Amplificazione tramite RT-qPCR

Sugli estratti di RNA così ottenuti è stata eseguita la RT-qPCR per determinare la presenza del genoma di FCoV e caratterizzarne la distribuzione tissutale.

Per fare ciò è stato utilizzato il kit VetMAX™ FIP Dual IPC, seguendo il protocollo indicato dal produttore.

Si sono trasferiti all'interno di una strip di provette da PCR 12,5 µl di una mix di PCR specifica per la reazione desiderata (che contiene i primer, le sonde FAM, un buffer da PCR, i dNTPs, una trascrittasi inversa e una DNA polimerasi) e 2,5 µl di acido nucleico di uno dei campioni per ciascuna provetta.

Nella provetta per il controllo negativo, invece dell'RNA sono stati inseriti 2,5 µl di acqua, mentre nella provetta per il controllo positivo sono stati inseriti 2,5 µl di C+.

Le strip di provette sono poi state centrifugate molto brevemente e la real-time RT-PCR è stata eseguita in un MyGo Pro ESR real-time PCR (IT-IS International Ltd (Novacyt Group)).

Grazie al programma per pc MyGo Pro è stato definito il protocollo termico, che prevede una prima fase a temperatura costante di 45°C per 10 minuti, una seconda

fase a temperatura costante di 95°C per altri 10 minuti seguita poi da un'ultima fase composta da uno step a 95°C per 15 secondi e un altro step a 60°C per 45 secondi, ripetuta per 45 volte.

Come prima cosa, in questa reazione è importante la conversione dell'RNA in DNA che avviene grazie all'azione della trascrittasi inversa, enzima che copia il filamento singolo di RNA e crea un filamento di DNA complementare ad esso.

La fase a 95°C per 2 minuti serve ad inattivare la retrotrascrittasi e attivare la polimerasi, mentre nei successivi cicli la fase a 95°C è la fase di denaturazione, che prevede la rottura dei legami tra i 2 filamenti complementari di una molecola di DNA i quali si staccheranno rimanendo filamenti singoli.

La fase a 60°C è invece la fase di annealing/extension, che permette l'appaiamento dei primer con la regione complementare dei filamenti di DNA.

Questi primer verranno poi utilizzati nella fase di estensione dalla Taq DNA polimerasi che ha lo scopo di amplificare la porzione del filamento compresa fra i primer.

I primer sono disegnati in modo da essere complementari a specifiche regioni del genoma, che spesso codificano proteine virali, in modo che, se sono presenti tracce del virus nei campioni, queste regioni verranno amplificate esponenzialmente.

Le sonde usate in questo esperimento sono le sonde TaqMan (in questo caso marcate con fluoroforo FAM) che si legano ai filamenti singoli di DNA dopo la sua denaturazione.

Il funzionamento di questo tipo di sonde si basa sulla presenza di una molecola di reporter e una di quencher poste alle estremità opposte della sonda.

Quando la sonda è intatta la fluorescenza prodotta dal reporter viene assorbita dal quencher, prevenendo così l'emissione di fluorescenza da parte della sonda.

Tuttavia, la Taq polimerasi durante la sintesi del nuovo filamento raggiungerà il punto in cui è legata una sonda FAM e per amplificare il DNA, sfruttando l'attività 5'→3' esonucleasica, l'enzima scinderà il fluoroforo dal resto della molecola.

La separazione del reporter dal quencher farà sì che questo non sia più in grado di assorbire la fluorescenza prodotta dal reporter. In questo modo la sonda potrà emettere una fluorescenza con un'intensità che cresce con l'aumento del numero di filamenti di DNA amplificati.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Un totale di 15 tessuti ottenuti tramite necropsopia e 9 campioni di sangue ottenuti da gatti residenti in ambienti a rischio di contatto sono stati inclusi nello studio e testati per la ricerca di FCoV.

Al termine della real time RT-PCR è stato possibile ottenere il grafico delle fluorescenze qui sotto riportato (Figura 3).

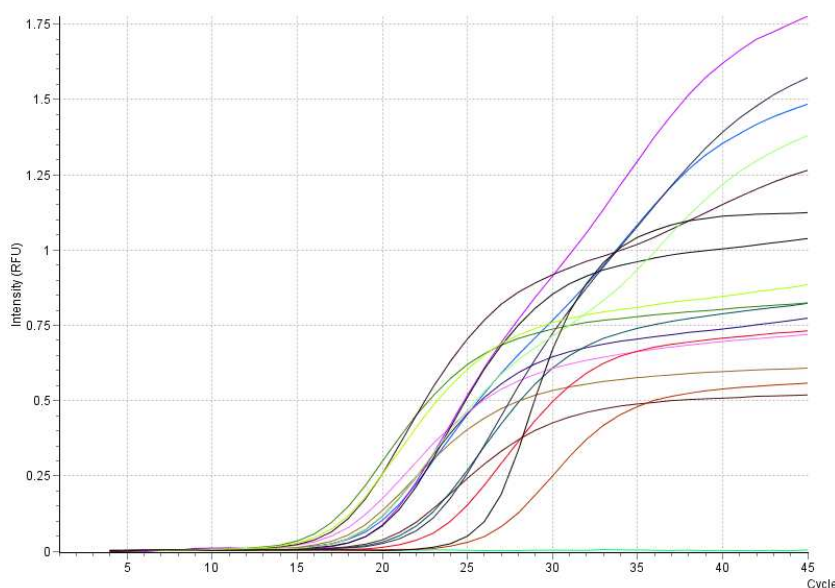


Figura 3 Curve di fluorescenza ottenute durante l'amplificazione del genoma di FCoV nei tessuti campionati.

Dal grafico qui riportato è possibile osservare come tutti i 15 campioni analizzati, e il controllo positivo, risultano positivi per FCoV con l'unica reazione negativa rappresentante il controllo negativo.

Perciò è possibile determinare che il soggetto sottoposto a diagnosi è infetto da FCoV e che questo abbia un'ampia ed elevata distribuzione tissutale, come desumibile dai bassi Ct riscontrati nei diversi tessuti (Tabella 1).

Sample	Ct
C-	
Utero	18,65347647
Rene	19,62569705
Cervello	17,98697659
Cuore	20,93951449
Fegato	16,68815273
Milza	15,63260977
Linf. Med.	17,15304501
Omento	19,09940151
Bile	25,38016031
Vers. pleurico	22,39141671
Vers. addominale	21,89562152
Cervelletto	19,31087123
Surrene	16,7839638
Polmone	16,19878222
Pancreas	18,12203365
C+	25,03506919

Tabella 1 Cicli soglia (Ct) dei campioni di tessuto sottoposti a PCR

Il ciclo soglia rappresenta il ciclo frazionario di una PCR real-time in cui la fluorescenza emessa emerge al di sopra del background e, indipendentemente dal metodo usato per determinarlo, permette di indagare e comparare in modo oggettivo e quantitativo la fase esponenziale della reazione in campioni differenti.

Com'è possibile osservare nella tabella 1, campioni come la milza e il polmone presentano cicli soglia più bassi rispetto agli altri, questo indica che la quantità di RNA virale presente in questi campioni è maggiore.

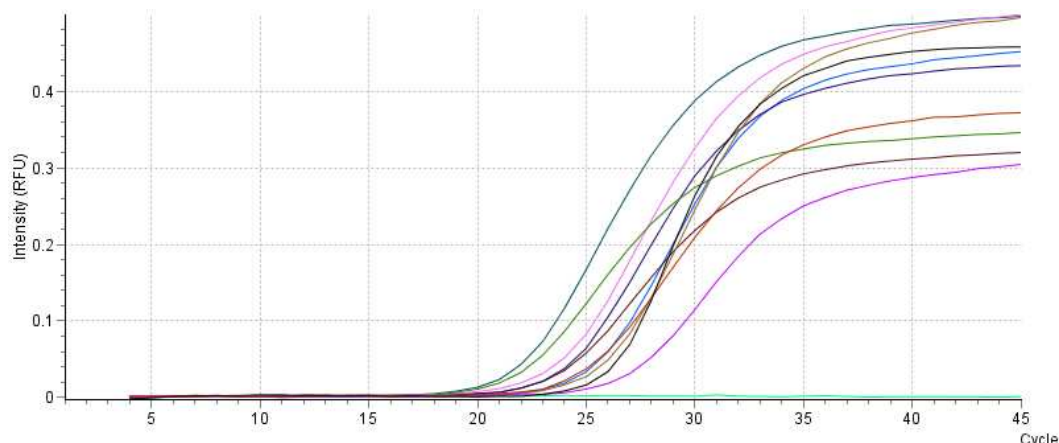


Figura 4 Curve di fluorescenza ottenute durante l'amplificazione del genoma di FCoV nel sangue dei gatti campionati.

Successivamente è stata valutata la presenza di FCoV in gatti potenzialmente esposti all'infezione.

Dal grafico qui riportato (Figura 4) è possibile osservare che tutti e 9 i nuovi campioni di gatto risultano infetti con FCoV, provando quindi l'elevata capacità di trasmissione di questo virus in luoghi affollati.

Sample	Ct
C-	
Teo	24,49741318
Liu	22,83484701
Selvaggia	23,18010322
Mindy	21,11560175
Ima	22,99493606
Miky	21,01025227
Edo	25,01695709
Abby	26,05283515
Diana	24,06228103
C+	25,16066506

Tabella 2 Cicli soglia dei campioni di sangue

Nella tabella 2 è possibile osservare come in tutti i campioni sia stata rilevata una quantità di RNA virale differente, con il campione Miky che presenta il ciclo soglia più basso e sembra perciò probabile che si tratti del caso più grave di FIP tra quelli analizzati.

Poiché in ogni ciclo di PCR avviene una duplicazione dell'RNA virale è possibile dire che il campione con il Ct minore (Miky) presenti una quantità di RNA virale

iniziale attorno a 32 (2^5) volte maggiore rispetto al campione con il Ct maggiore (Abby) in quanto i cicli soglia differiscono di circa 5.

CONCLUSIONE

Nel presente studio è stato possibile osservare come tutti i 10 gatti dei quali sono stati analizzati i campioni sono risultati infetti da FCoV. Sebbene al momento una precisa definizione dei ceppi coinvolti non sia ancora possibile, i rilievi ottenuti dimostrano l'ampio tropismo tissutale e l'elevata capacità di trasmissione del virus in luoghi affollati, considerato che i 10 gatti provenivano dallo stesso gattile o da strutture ad esso associate.

Al fine di tipizzare il ceppo coinvolto, i campioni positivi analizzati in questa tesi saranno sequenziati tramite sequenziamento Sanger o Next Generation Sequencing (NGS) per determinare se il virus rilevato derivi da quello che ha causato l'outbreak di Cipro oppure se è un virus emerso indipendentemente ma con caratteristiche simili.

Questa informazione è di fondamentale importanza in quanto permetterebbe di comprendere le eventuali fonti di introduzione del patogeno nel nostro paese o i fattori di rischio per l'emergere di nuovi varianti. Inoltre, tali conoscenze permetteranno di implementare opportune strategie di diagnosi precoce e monitoraggio epidemiologico, contribuendo al controllo di queste gravi forme infettive.

BIBLIOGRAFIA

- Decaro, N., Mari, V., Lanave, G., Lorusso, E., Lucente, M. S., Desario, C., Colaianni, M. L., Elia, G., Ferringo, F., Alfano, F., & Buonavoglia, C. (2021). Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences. *Research in Veterinary Science*, *135*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.023>
- Felten, S., & Hartmann, K. (2019). Diagnosis of feline infectious peritonitis: A review of the current literature. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11111068>
- Kennedy, M. A. (2020). Feline Infectious Peritonitis: Update on Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 50, Issue 5, pp. 1001–1011). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.05.002>
- Lewis, C. S., Porter, E., Matthews, D., Kipar, A., Tasker, S., Helps, C. R., & Siddell, S. G. (2015). Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *Journal of General Virology*, *96*, 1358–1368. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000084>
- Pedersen, N. C. (2014). An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. In *Veterinary Journal* (Vol. 201, Issue 2, pp. 123–132). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.017>
- Riemer, F., Kuehner, K. A., Ritz, S., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2016). Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *18*(4), 348–356. <https://doi.org/10.1177/1098612X15586209>
- Tasker, S., Addie, D. D., Egberink, H., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Truyen, U., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Thiry, E., Möstl, K., & Hartmann, K. (2023). Feline Infectious Peritonitis: European Advisory Board on Cat Diseases Guidelines.

In *Viruses* (Vol. 15, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v15091847>

Tekes, G., & Thiel, H. J. (2016). Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. In *Advances in Virus Research* (Vol. 96, pp. 193–218). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.002>

Thayer, V., Gogolski, S., Felten, S., Hartmann, K., Kennedy, M., & Olah, G. A. (2022). 2022 AAEP/EveryCat Feline Infectious Peritonitis Diagnosis Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(9), 905–933. <https://doi.org/10.1177/1098612X221118761>

Warr, A. (2023). *Emergence and spread of feline infectious peritonitis due to a highly pathogenic canine/feline recombinant coronavirus.* <https://doi.org/10.1101/2023.11.08.566182>