

CORONAVIRUS E IIZZSS

L'esperienza dell'IZSLT durante la pandemia da COVID-19: tra diagnostica e ricerca, l'impronta One Health



MARCELLO GIOVANNI SALA, LUISA GAROFALO, AZZURRA CARNIO, CLAUDIA ELENI,
MANUELA SCARPULLA, ANTONIO MASTROMATTEI, ANTONELLA NAGNI, PASQUALINA IAQUINTA,
SILVIA TOFANI, ANTONELLA CERSINI, MARIA TERESA SCICLUNA, ROBERTO NARDINI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"

Sin dall'inizio della pandemia da COVID-19, causata dalla rapida e violenta diffusione mondiale del virus SARS-CoV-2 e che ha visto l'Italia tra i primi Paesi europei coinvolti, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali si sono attivati per effettuare la diagnostica virale su campioni umani, a supporto del Sistema Sanitario Nazionale. Per quel che riguarda l'Italia centrale, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri* (IZSLT)

si è immediatamente unito alla rete regionale di laboratori altamente specializzati del Lazio CoroNet (Ordinanza Regione Lazio n. 3 del 06.03.2020) e successivamente anche alla rete WGS-Net (Deliberazione Regione Lazio G08714 del 30.06.2021), istituite dal Sistema Sanitario Regionale al fine di assicurare il necessario supporto diagnostico ai cittadini in risposta alla pandemia da COVID-19. In quanto ente accreditato da ACCREDIA, l'IZSLT ha

eseguito test diagnostici per la ricerca viologica del virus SARS-CoV-2 nell'uomo e l'analisi sierologica per la ricerca di anticorpi. Inizialmente la sorveglianza sanitaria condotta presso l'IZSLT, in piena fase emergenziale, è stata incentrata sui test molecolari eseguiti su campioni di pazienti ricoverati in case di cura e di riposo, su personale delle forze dell'ordine, su operatori sanitari. Successivamente, con l'attivazione di un drive-through all'interno della sede centrale IZSLT di Ciampino (Roma), l'attività diagnostica è stata ampliata anche a test rapidi antigenici richiesti nell'ambito delle misure di mitigazione del rischio di diffusione dell'infezione (ad esempio, controllo per l'espatrio, pre-ospedalizzazioni, uscita dalla quarantena, ecc.). Dal 6 aprile 2020 al 31 maggio 2022 sono stati analizzati dall'IZSLT 4.011 campioni sierologici e 131.600 tamponi diagnostici, di cui 84.824 molecolari (64% del totale) e 46.776 antigenici (36% del totale), appartenenti a più di 83.000 persone diverse. A partire da febbraio 2021, l'IZSLT ha iniziato inoltre l'attività di sequenziamento NGS del virus SARS-CoV-2, con l'obiettivo di contribuire alla sorveglianza genomica delle varianti dell'agente eziologico di COVID-19 nel contesto del network regionale coordinato da INMI – Spallanzani e come parte integrante dell'attività di sorveglianza sull'intero territorio italiano. Nello stesso periodo, è stata avviata anche l'analisi delle acque reflue urbane nell'ambito della "Istituzione di una sorveglianza sistematica di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue" (Rete SARI), il cui capofila è l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Ricerca scientifica in ambito veterinario

Parallelamente all'attività diagnostica condotta su campioni umani durante la pandemia, oggetto di pubblicazioni scientifiche, l'IZSLT ha condotto specifiche attività di ricerca in ambito di Sanità Pubblica Veterinaria e a livello di interfaccia uomo-animale. In dettaglio, l'IZSLT ha collaborato come partner con gli altri IZS italiani al Progetto strategico di ricerca corrente (IZSVE 01/20 RCS) "Suscettibilità dei mammiferi a SARS-CoV-2: rischi di zoonosi inversa e possibilità in medicina traslazionale", articolato in diversi filoni di ricerca, tra i quali l'analisi viologica e il sequenziamento pan-Coronavirus di specie animali selvatiche, campionate su tutto il territorio italiano durante il periodo pandemico. Relativamente al comparto degli animali domestici (controllo zootecnico e animali d'affezione), l'Osservatorio epidemiologico dell'IZSLT ha condotto, di concerto con le altre strutture dell'ente e con alcune ASL veterinarie del territorio, una Ricerca corrente dal titolo "Acquisizione di evidenze scientifiche ed epidemiologiche di campo sulla suscettibilità degli animali a SARS-CoV-2 e altri Coronavirus in ottica One Health" (IZSLT 10/20 RC). Questo studio parte nel 2020 in seguito alle evidenze preliminari

che avevano mostrato la capacità del virus di infettare anche alcune specie animali, roditori, cervidi, grandi felini ospitati in zoo, nonché visoni allevati, per i quali era stata ipotizzata e poi dimostrata la possibilità di ritrasmettere il virus sia ad altri visoni sia all'uomo (*spill-back*) [8]. Da qui è emersa la necessità di approfondire le conoscenze sulla suscettibilità delle diverse specie animali e il loro potenziale ruolo di reservoir per il mantenimento del virus in contesti di comunità. L'obiettivo principale di questa ricerca è stato quindi quello di verificare la possibile esposizione al virus degli animali d'affezione conviventi con proprietari infetti, nonché l'eventuale presenza di questo e di altri Coronavirus potenzialmente zoonotici in animali conviventi con soggetti della stessa o di altre specie (ad esempio, in colonie feline e zoo).

Nell'ambito delle attività di supporto alle Regioni Lazio e Toscana per la gestione degli animali sospetti SARS-CoV-2, le attività della RC IZS LT10/20 si sono articolate in diverse componenti di monitoraggio/sorveglianza:

1. sorveglianza passiva su animali da compagnia deceduti con lesioni anatomico-patologiche potenzialmente riferibili a infezione da SARS-CoV-2, pervenuti presso l'IZSLT nell'ambito della diagnostica cadaverica con anamnesi muta;
2. sorveglianza sindromica su sospetti clinici, includendo animali vivi o deceduti con anamnesi di sospetto clinico e animali vivi o deceduti conviventi con casi umani confermati COVID-19;
3. sorveglianza attiva su gatti di colonia, in collaborazione con la ASL Roma 4;
4. sorveglianza sanitaria su primati ospitati in zoo e altre collezioni. La programmazione è stata effettuata in fasi preparatorie successive:
 - a. sono state selezionate ed elencate le specie target dello studio tra gli animali da compagnia e da zoo, inclusi i primati;
 - b. sono state definite le matrici da campionare (dall'apparato enterico e respiratorio);
 - c. sono stati definiti i protocolli per la diagnostica istopatologica, per la diagnostica diretta del virus SARS-CoV-2 e degli altri Coronavirus, nonché per la diagnosi indiretta, sierologica, di esposizione recente o pregressa all'infezione da Coronavirus mediante rilevazione e titolazione delle IgG [1].

In dettaglio, per l'analisi viologica:

- adozione della procedura "Pancorona" [4], mirata a individuare tutti i Coronavirus possibilmente presenti tramite amplificazione e sequenziamento di un tratto genico target (PCR end-point);
- analisi molecolari specifiche per rilevare SARS-CoV-2 (RealTime PCR) [Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit v4 (Anatolia Geneworks) e RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0].

Sono state infine elaborate e validate apposite schede di

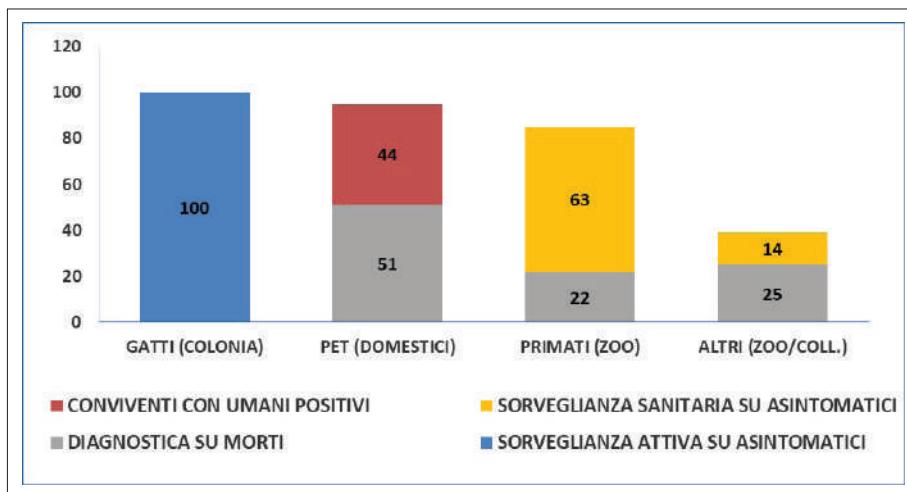


Figura 1. Numero di individui campionati per ciascun gruppo di specie animali, suddivisi per ambiente di vita e tipo di sorveglianza applicata (RC IZS LT10/20).

rilevamento dei metadati anagrafici, anamnestici e di esposizione relativi ai campioni raccolti nell'ambito delle diverse attività di monitoraggio/sorveglianza.

Nel periodo 2021-2023 sono stati campionati a livello bi-regionale 319 individui (100 per sorveglianza attiva, 98 per sorveglianza passiva, 44 per sorveglianza sindromica e 77 per sorveglianza sanitaria (figura 1), appartenenti a 36 specie diverse e comprendenti: animali d'affezione (cani, gatti, furetti, conigli e cavie), animali ospitati in zoo o collezioni (roditori, mustelidi, primati, altri gruppi tassonomici) e gatti di comunità campionati attivamente

dai medici veterinari della ASL Roma 4 all'interno di 38 colonie feline (figura 2). I materiali biologici sono stati prelevati (apparato enterico e respiratorio da animali morti, tamponi rettali, nasofaringei e sangue da animali vivi) e analizzati tramite test virologici molecolari (837, di cui 255 in RealTime PCR per ricerca diretta di SARS-CoV-2, 582 in PCR endpoint PanCorona), sierologici (100) ed istologici (20).

I risultati principali di questo lavoro sono di seguito riportati:

- tutti gli individui delle diverse specie esaminate sono risultati negativi alla ricerca diretta del virus SARS-CoV-2, tramite analisi in RealTime PCR;
- in una proporzione pari al 6,3% degli individui (20 su 319) sono stati rilevati

altri Coronavirus tipici della specie analizzata, tramite PCR end-point PanCoV. Di questi, 10 erano gatti campionati durante la survey attiva condotta sulle colonie feline, 9 individui (5 gatti, 3 cani e 1 furetto) sono stati campionati per sorveglianza passiva sui morti e 1 gatto per essere stato convivente di un padrone positivo. I campioni positivi sono stati sequenziati con metodica Sanger per un tratto di 440 bp nel gene RdRp. Il confronto con le sequenze depositate in GenBank¹ ha confermato l'assenza di SARS-CoV-2, mentre ha restituito l'appartenenza ai Feline (16 gatti), Canine (3 cani) e Ferret (1 furetto) Coronavirus. In 16 casi la sequenza è stata ottenuta da un campione enterico, in 2 da un campione respiratorio, in altri 2 casi da campioni provenienti da entrambi gli apparati. Nessun individuo risultato positivo al marcitore Pan-CoV ha mostrato inoltre lesioni evidenti della malattia COVID-19 all'esame anatomico ed istologico;

- l'indagine sierologica, condotta mediante tecniche ELISA e IFI, ha rivelato una positività al test IgG anti-Coronavirus felino nel 69% dei 100 gatti di colonia analizzati, indicando un'elevata prevalenza apparente del virus nella popolazione studiata (IC 95% = 60,4-77,6%). Tuttavia, l'analisi dei titoli anticorpali dei soggetti positivi ha mostrato valori mediamente bassi, vicini al cut-off soglia di positività per il 72,8% dei casi (mediana titolo: 20; min: 1:20, max: 1:1280) [1].

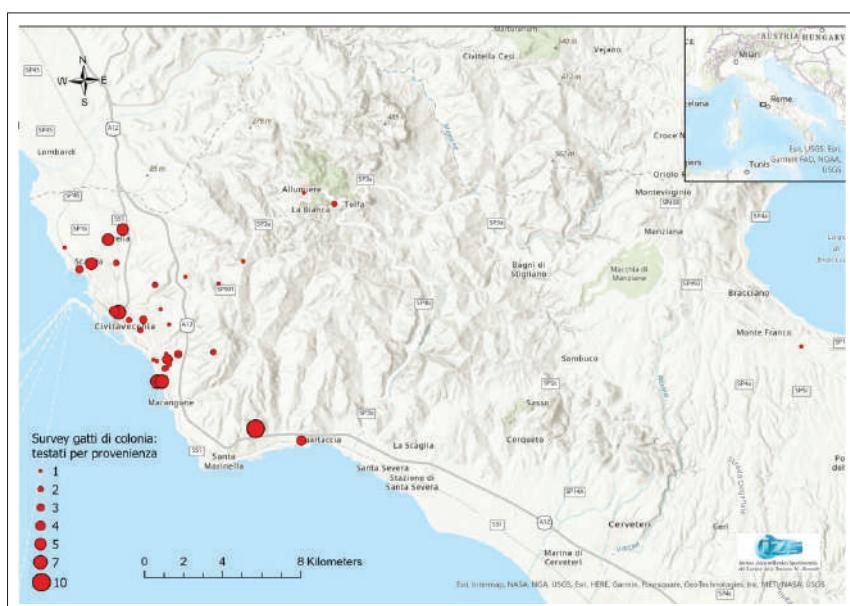


Figura 2. Distribuzione delle 38 colonie feline campionate nell'ambito della sorveglianza attiva condotta dalla ASL Roma 4 nel periodo 30.11.2022 - 24.05.2023 (RC IZS LT10/20). Mappa realizzata con ArcGIS (Desktop 10.8.2 Esri®).

Discussione

I dati ottenuti dallo studio non hanno rilevato nel complesso una circolazione rilevante di

SARS-CoV-2 nelle specie e nei soggetti esaminati nel periodo e negli ambiti territoriali monitorati. Tuttavia, non si può escludere che l'infezione possa essere stata presente nelle sub-popolazioni indagate, ma a livelli di prevalenza inferiori alla sensibilità del sistema di monitoraggio utilizzato. Il risultato complessivo è in linea con quanto rilevato nel lavoro parallelo condotto sulle specie selvatiche a livello nazionale dai vari IZS [6] ed è in accordo con la letteratura scientifica, non evidenziando un possibile ruolo prevalente di queste specie animali come reservoir e/o veicolo di trasmissione del virus all'uomo [5, 9]. Tuttavia, è importante sottolineare che lo studio è stato condotto su un campione non rappresentativo di animali delle diverse provenienze, ad eccezione della survey campionaria sui gatti di colonia. Inoltre, la capacità di reclutamento di animali domestici conviventi con casi umani COVID-19 è stata limitata dalla scarsa disponibilità in fase epidemica delle autorità sanitarie in relazione alla segnalazione dei casi umani e all'avvio dei rispettivi animali domestici al percorso diagnostico. Per tale motivo, non è possibile alcuna inferenza dei risultati ottenuti verso le singole popolazioni di riferimento delle specie indagate.

Nel periodo pandemico i pet e gli animali da zoo risultati positivi in seguito a contagio antropico da parte di padroni



conviventi e/o zoo-keeper sono stati infatti diversi² [2, 7, 10] ma non sono stati osservati casi analoghi nel presente studio. D'altra parte, sono stati rilevati Coronavirus tipici delle specie indagate tra gli animali domestici (gatti, cani, furetti) e selvatici (pipistrelli, ricci e lupi) campionati e analizzati dall'IZSLT per le due Regioni Lazio e Toscana tra il 2021 e il 2023, nonché un'attesa elevata prevalenza



Figura 3. Attività di sorveglianza integrata dei Coronaviruse durante la pandemia da SARS-CoV-2 nell'ambito dell'attività diagnostica e di ricerca scientifica condotte dall'IZSLT nel Lazio e in Toscana tra il 2020 e il 2023.

sierologica per Coronavirus felini in gatti di colonia provenienti dalla ASL Roma 4. Quest'ultima osservazione è in linea con altri studi effettuati sulla specie anche prima dell'era pandemica [3] e appare meritevole di ulteriori indagini volte a caratterizzare la predisposizione e l'evoluzione di varianti potenzialmente patologiche.

Conclusioni

Il ruolo svolto dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali italiani nel contesto del Sistema Sanitario Nazionale si è rivelato ancora una volta fondamentale come supporto tecnico-scientifico in caso di epidemie e di emergenze sanitarie che coinvolgano sia la popolazione umana sia quelle animali.

Nel contesto nazionale, anche le attività di diagnostica ordinaria e di ricerca scientifica condotte da IZSLT per le regioni di competenza, nel periodo emergenziale pandemico e nella fase immediatamente successiva, sono state fortemente orientate alla “*Salute unica*”, tenendo quindi conto della stretta relazione tra salute umana, salute animale di specie sinantropiche (pet, animali da zoo e gatti conviventi in colonie urbane) e di specie selvatiche (possibili serbatoi di malattie a carattere zoonosico) e ambiente (figura 3). Un obiettivo ulteriore raggiunto dalle ricerche condotte dall'IZSLT, infatti, è stata la sperimentazione di un framework di sorveglianza integrata (attiva, passiva e sindromica), che può rappresentare un utile modello per il miglioramento dell'efficacia preventiva della sorveglianza delle infezioni da coronavirus e da altri patogeni nelle specie serbatoio candidate. Si ritiene quindi possibile poter applicare in modalità sistematica questo approccio al fine di monitorare i trend di prevalenza dei Coronavirus nelle diverse specie e identificare precocemente, adottando appropriate procedure di caratterizzazione genomica (WGS) degli isolati rilevati, la presenza di nuove varianti e virus potenzialmente zoonotici.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale dell'IZSLT, che ha lavorato con dedizione e passione per realizzare l'attività diagnostica e scientifica legata alla pandemia da COVID-19, nonché il personale dei Servizi Veterinari del territorio per la collaborazione operativa e in particolare il Dottor Roberto Micciulli della ASL Roma 4.

Bibliografia

1. Addie D.D., Le Poder S., Burr P., et al. Utility of feline coronavirus antibody tests. *Journal of feline medicine and surgery*, 2015, 17(2):152–162. doi: 10.1177/1098612X14538873.
2. Alberto-Orlando S., Calderon J.L., Leon-Sosa A., et al. SARS-CoV-2 transmission from infected owner to household dogs and cats is associated with food sharing. *International journal of infectious diseases*, 2022, 122:295–299. doi: 10.1016/j.ijid.2022.05.049.
3. Benetka V., Küpper-Heiss A., Kolodziejek J., et al. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99(1):31-42. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.07.010.
4. Drzewniová P., Festa F., Panzarini V., et al. Best molecular tools to investigate coronavirus diversity in mammals: a comparison. *Viruses*, 2021, 13(10):1975. doi: 10.3390/v13101975.
5. Klaus J., Zini E., Hartmann K., et al. SARS-CoV-2 infection in dogs and cats from Southern Germany and Northern Italy during the first wave of the COVID-19 pandemic. *Viruses*, 2021, 13(8):1453. doi: 10.3390/v13081453.
6. Leopardi S., Desiato R., Mazzucato M., et al. One health surveillance strategy for coronaviruses in Italian wildlife. *Epidemiology & Infection*, 2023, 151:e96. doi: 10.1017/S095026882300081X.
7. McAloose D., Laverack M., Wang L., et al. From People to panthera: natural SARS-CoV-2 infection in tigers and lions at the Bronx zoo. *mBio*, 2020, 11(5):e02220-20. doi: 10.1128/mBio.02220-20.
8. Rabalski L., Kosinski M., Mazur-Panasiuk N., et al. Zoonotic spill-over of SARS-CoV-2: mink-adapted virus in humans. *Clinical microbiology and infection*, 2022, 28(3):451.e1–451.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2021.12.001.
9. Stranieri A., Lauzi S., Giordano A., et al. Absence of SARS-CoV-2 RNA and anti-SARS-CoV-2 antibodies in stray cats. *Transboundary and emerging diseases*, 2022, 69(4):2089–2095. doi: 10.1111/tbed.14200.
10. Zoccola R., Beltramo C., Magris G., et al. First detection of an Italian human-to-cat outbreak of SARS-CoV-2 Alpha variant - lineage B.1.1.7. *One Health*, 2021, 13:100295. doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100295.

¹ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

² Per aggiornamenti: <https://promedmail.org/>