

CORRELAZIONE SIEROLOGICA FRA GLI STIPITI DI CALICIVIRUS FELINO (FCV) ISOLATI IN ITALIA E LO STIPITE VACCINALE F9

DOMENICO BUONAVOGLIA*, MARIA GLORIA DE PALMA**, MICHELE CAMERO**,
FRANCESCO CIRONE**, ANNAMARIA PRATELLI**, VITO MARTELLA**,
FULVIO MARSILIO***, VITTORINA COLOMBATTI****

* Istituto di Malattie Infettive - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Messina;

** Dipartimento di Sanità e Benessere degli animali - Sezione Malattie Infettive - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Bari;

*** Istituto di Malattie Infettive - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Teramo;

**** Teknofarma - Torino

Riassunto

Vengono riportati i risultati di prove di neutralizzazione *in vitro* effettuate per valutare la correlazione antigenica di 16 stipiti di calicivirus felino (FCV) nei confronti dello stipite vaccinale F9.

Nelle prove sono stati utilizzati 2 antisieri verso F9 prodotti nel gatto e nel coniglio.

I risultati hanno evidenziato un generale basso livello di correlazione sierologica tra lo stipite vaccinale e gli stipiti FCV attualmente circolanti.

Summary

The results of in vitro neutralization tests, carried out to evaluate the antigenic correlation between 16 feline calicivirus (FCV) strains and the vaccinal strain F-9, are reported. Two antisera to FCV-F9, developed in rabbit and cat, were used.

A low level of antigenic correlation between the vaccinal strain and FCV strains circulating in cat populations, was revealed.

INTRODUZIONE

Il calicivirus felino (FCV) è responsabile nel gatto di una forma morbosa che si manifesta con sintomi a carico delle vie aeree superiori e con ulcerazioni del cavo orale o, più raramente, con stomatite cronica^{1,2,3}; talvolta può causare una forma transitoria di zoppia^{4,5}.

La malattia decorre, generalmente, in maniera benigna esitando nella completa guarigione del soggetto, sebbene una percentuale significativa dei gatti colpiti possa diventare portatore asintomatico del virus^{6,7}.

Nel corso degli ultimi 15 anni, la profilassi vaccinale della calicivirosi è stata effettuata sia con vaccini inattivati che attenuati, questi ultimi somministrati per via nasale oltre che parenterale. Nonostante il loro uso su larga scala, FCV è tuttora molto diffuso poiché i vaccini utilizzati proteggono dalla malattia ma non dall'infezione, tanto che anche gli animali vaccinati possono diventare portatori asintomatici⁷. FCV può essere quindi isolato non solo da animali con sintomatologia clinica manifesta, ma anche da gatti clinicamente sani².

Nel corso degli anni sono state anche descritte reazioni post-vaccinali e rotture di immunità, inquadrabili come forme cliniche che si sviluppano, rispettivamente, entro 21 giorni o tra 21 giorni ed un anno dalla vaccinazione^{8,9,10}.

Questo dato, associato all'aumentata frequenza di isolamento di FCV dai gatti, potrebbe essere correlato alla circolazione di ceppi che, per quanto assimilabili all'unico sierotipo noto, denominato FCV-F9¹¹, differiscono dallo stesso per potere patogeno e struttura antigenica. L'elevata cross-reattività del sierotipo FCV-F9 con i virus di campo ha rappresentato la base immunologica del suo impiego, a partire dagli anni '70, per la preparazione dei vaccini.

Recenti studi hanno però evidenziato la circolazione di ceppi FCV diversi da un punto di vista antigenico dallo stipite vaccinale F9 e, quindi, responsabili di episodi di "rottore di immunità"^{5,12,13}.

Nella presente nota sono riportati i risultati di prove *in vitro* di correlazione antigenica fra lo stipite vaccinale F9 e 16 stipiti FCV isolati in Italia da gatti con forme cliniche riconducibili alla calicivirosi.

MATERIALI E METODI

Campioni in esame

Le prove di isolamento sono state effettuate a partire da trentacinque tamponi oro-faringei e congiuntivali prelevati da gatti con sintomi clinici riferibili a calicivrosi (rino-tracheite, congiuntivite, ulcere linguali, stomatite).

Cellule

L'isolamento e la coltivazione degli stipiti FCV sono stati realizzati su cellule in linea continua di rene di gatto Crandell Feline Kidney (CrFK) sviluppate in terreno RPMI addizionato di L-glutamina ed antibiotici ed arricchito con il 10% di siero fetale bovino.

Isolamento virus

I tamponi oro-faringei e congiuntivali in esame sono stati stemperati in 2 ml di RPMI e successivamente filtrati con filtri da 0,22 μm . Il filtrato ottenuto è stato utilizzato per inoculare monostrati di cellule sviluppati in piastre a 6 pozzetti. Le cellule sono state incubate a 37°C per 5 giorni ed osservate quotidianamente per valutare la comparsa di effetto citopatico (ecp). In assenza di ecp è stato effettuato un secondo passaggio seguendo le stesse modalità. In presenza di ecp riferibile ad FCV, le cellule sono state sottoposte a 3 cicli di congelamento e scongelamento. Il criolizzato è stato sottoposto a centrifugazione a 6000x per 20 minuti a +4°C ed il surnatante è stato aliquotato e quindi titolato con il metodo di Karber.

Produzione antisieri

Nei confronti dello stipite vaccinale FCV-F9 sono stati prodotti 2 antisieri, uno su gatto e uno su coniglio.

Per la produzione dell'antisiero su gatto è stato utilizzato un soggetto di 3 mesi d'età, privo di anticorpi sieroneutralizzanti nei confronti di FCV. L'animale è stato inoculato per via nasale con 3 ml (1,5 ml per narice) dello stipite F9 con titolo pari a $10^{6,50}$ TCID₅₀/50 μl . Dopo 30 giorni dalla inoculazione sono stati prelevati 10 ml di sangue per la raccolta del siero. L'antisiero su coniglio è stato preparato utilizzando lo stesso stock-virus dello stipite F9 utilizzato per la produzione dell'antisiero nel gatto. La sospensione virale, preventivamente centrifugata per allontanare i detriti cellulari, è stata emulsionata con adiuvante incompleto di Freund. Sono state effettuate 4 inoculazioni per via sottocutanea, a distanza di 15 giorni l'una dall'altra, utilizzando, per ogni inoculazione, 2cc dell'emulsione. Dopo 7 giorni dall'ultima inoculazione è stato prelevato un campione di sangue per la raccolta del siero.

Identificazione degli stipiti virali

Ciascun isolato è stato identificato come stipite FCV mediante il test di sieroneutralizzazione (SN) utilizzando

l'antisiero monospecifico di coniglio preparato nei confronti dello stipite di riferimento F9. Diluizioni logaritmiche del virus sono state messe a contatto con una diluizione 1:5 di siero. Dopo 2 ore di contatto a 37°C, a ciascuna miscela siero-virus sono state aggiunte cellule CrFK. La lettura dei risultati è stata effettuata dopo 3 giorni di incubazione. Gli stipiti virali che non venivano neutralizzati sono stati caratterizzati con prove chimico-fisiche: resistenza al pH, determinazione dell'acido nucleico con la bromodeossiridina (BUDR), resistenza all'etere e cloroformio, temperatura, secondo quanto riportato da Castrucci et al.¹⁴.

Come virus di riferimento è stato utilizzato lo stipite vaccinale FCV-F9, gentilmente fornito dal Prof. G. Chappuis (Merial; Lione-Francia).

Sieroneutralizzazione

Diluizioni a raddoppio, partendo da 1:2, di ciascun antisiero sono state messe a contatto con 100TCID₅₀ dello stipite F9 per 2h a 37°C in piastre microtiter a 96 pozzetti. Trascorso tale periodo in ciascun pozzetto sono state aggiunte 20.000 cellule CrFK e le piastre sono state incubate a 37°C per 3 giorni in termostato a CO₂.

Il titolo del siero (1 Unità Neutralizzante -UN) corrisponde al reciproco della più alta diluizione del siero in grado di neutralizzare completamente il virus.

Per la valutazione della correlazione sierologica, 100TCID₅₀ di ciascuno stipite FCV sono state mescolate con una eguale quantità standardizzata di antisiero, diluito in maniera da contenere 10 UN e 2,5 UN, secondo quanto riportato da altri autori¹³.

Sono state utilizzate due diverse quantità di UN di antisiero, per poter evidenziare anche minime differenze di correlazione sierologica fra gli stipiti virali.

Ciascuna miscela siero-virus è stata quindi incubata a 37°C per 2h e poi distribuita in 5 pozzetti di una piastra a 96 pozzetti.

La lettura dei risultati è stata effettuata dopo 3 giorni di incubazione a 37°C in termostato a CO₂, considerando ciascun pozzetto in cui non era presente ecp pari al 10% di neutralizzazione.

RISULTATI

Dei 35 campioni in esame, 16 hanno indotto ecp riferibile ad FCV (cellule rotondeggianti, aumento della rifrangenza e lisi delle cellule). La successiva tipizzazione mediante test SN utilizzando l'antisiero prodotto su coniglio, ha permesso di identificare 9 dei 16 isolati come stipiti FCV.

I risultati delle prove di caratterizzazione chimico-fisica hanno evidenziato che anche gli altri 7 isolati possedevano le caratteristiche chimico-fisiche dei calicivirus (acido nucleico di tipo RNA; inattivazione a pH 3; stabilità ai solventi dei lipidi come etere e cloroformio; inattivazione al calore a 50°C per 30').

Gli antisieri prodotti su gatto e su coniglio hanno evidenziato un titolo SN nei confronti dello stipite omologo F9 pari rispettivamente a 1:256 e 1:128.

Tabella 1
Risultati delle prove di neutralizzazione di stipiti FCV con gli antisieri nei confronti di FCV-F9

UN	1/Ba		2/Ba		3/To		4/Ba		5/Ba		6/Te		7/Ba		8/Ba	
	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C
10	40#	30	0	0	0	0	40	30	30	40	0	0	40	30	50	50
2,5	0	10	0	0	0	0	30	0	0	50	0	0	0	10	50	40
	Tot.	40	40	0	0	0	70	30	30	90	0	0	40	40	100	90

UN	9/Ba		10/Ba		11/Ba		12/Ba		13/To		14/To		15/To		16/To	
	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C
10	50	30	50	50	40	50	50	0	0	0	50	30	50	0	0	0
2,5	40	0	30	0	0	20	20	0	0	0	50	0	0	0	0	0
	Tot.	90	30	80	50	40	70	0	0	0	100	30	50	0	0	0

UN: Unità Neutralizzanti; **G:** antisiero gatto; **C:** antisiero coniglio; #: valore percentuale di neutralizzazione (1 pozzetto=10%); **Ba** = isolato a Bari; **To** = isolato a Torino; **Te** = isolato a Teramo.

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati, espressi in valori percentuali, dell'attività neutralizzante degli antisieri per lo stipite F9 nei confronti dei 16 isolati FCV.

Il siero di coniglio ha mostrato attività neutralizzante elevata (90%) solo nei confronti degli stipiti 5/Ba e 8/Ba; nei confronti di sette stipiti (2/Ba; 3/To; 6/Te; 12/Ba; 13/To; 15/To; 16/To) il siero di coniglio non ha evidenziato alcuna attività neutralizzante; nei confronti degli altri stipiti le percentuali di neutralizzazione sono risultate oscillanti su valori compresi fra il 30% e il 70%.

Il siero di gatto ha evidenziato, in generale, una più spiccata attività neutralizzante.

Gli stipiti 8/Ba e 14/To sono stati neutralizzati completamente (100%); nove stipiti (1/Ba; 4/Ba; 5/Ba; 7/Ba; 9/Ba; 10/Ba; 11/Ba; 12/Ba; 15/To) sono stati neutralizzati in percentuale variabile dal 30% al 90%, mentre gli altri cinque stipiti (2/Ba; 3/To; 6/Te; 13/To; 16/To) non sono stati neutralizzati.

DISCUSSIONE

I risultati delle prove di sieroneutralizzazione effettuate nel presente studio evidenziano che gli stipiti FCV circolanti in Italia risultano scarsamente correlati, sul piano antigenico, allo stipite vaccinale F9.

In effetti, l'antisiero di gatto che, in generale, ha mostrato attività neutralizzante maggiore rispetto all'antisiero preparato su coniglio, ha neutralizzato completamente solo 2 stipiti sui 16 esaminati, mentre nei confronti di 5 stipiti non ha evi-

denziato alcuna attività neutralizzante e verso altri 4 stipiti la neutralizzazione si è attestata su valori inferiori al 50%.

Nelle prove effettuate con l'antisiero di coniglio che, come già detto, ha evidenziato una più ridotta attività neutralizzante, nessuno stipite è stato neutralizzato completamente e ben 7 stipiti non sono stati neutralizzati.

Diversi autori hanno utilizzato antisieri prodotti su coniglio per valutare le correlazioni sierologiche fra stipiti FCV^{15,16,17}. In base ai risultati ottenuti nella presente indagine, si può tuttavia ritenere che tali antisieri possono fornire risultati non completamente attendibili. Nelle prove di correlazione sierologica crociata fra stipiti FCV è pertanto, preferibile, utilizzare antisieri preparati su gatto.

Nella presente sperimentazione non sono state effettuate prove crociate di neutralizzazione utilizzando antisieri preparati nei confronti degli stipiti non riconosciuti dall'antisiero verso F9. La mancanza di dati su questo aspetto non permette, pertanto, di fare un'analisi più approfondita dei risultati ottenuti e di avere precise indicazioni sulla reale efficacia dei vaccini attualmente in uso.

Anche se le prove di neutralizzazione *in vitro* non possono essere completamente indicative dello status immunitario dei gatti vaccinati, in quanto nella protezione nei confronti di FCV patogeni potrebbero essere coinvolti altri meccanismi, risulta tuttavia evidente che, nella popolazione felina presa in esame, circolano stipiti FCV molto diversi, sul piano antigenico, dallo stipite F9 vaccinale. Questo dato, che conferma quanto già riportato da altri Autori,^{13,18,19,20} evidenzia la necessità che vengano formulati nuovi vaccini allestiti con le varianti antigeniche FCV e, possibilmente, in forma polivalente.

Parole chiave

Gatto, calicivirus felino, correlazione antigenica, antisiero, vaccino.

Key words

Cat, feline calicivirus, antigenic correlation, antiserum, vaccine.

Abbreviazioni

FCV: Feline Calicivirus; CrFK: Crandell Feline Kidney; SN: sieroneutralizzazione; BUDR: bromodesossiridina; TCID: dosi infettanti tessuto colture.

Bibliografia

1. Thompson RR, Wilcox GE, Clark WT, Jansen KL: Association of caliciviruses with chronic gingivitis and pharyngitis in cats. *J Small An Pract* 25: 207-210, 1984.
2. Knowles GO, Gaskell RM, Gaskell CJ, et al.: Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *Vet Rec* 124: 336-338, 1989.
3. Tenorio AP, Franti CE, Madewell BR, Pedersen, NC: Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukaemia viruses. *Vet Immunol Immunopathol* 29:1-14, 1991.
4. Studdert MJ: Caliciviruses: brief review. *Arch. Virol* 58:157-191, 1978.
5. Pedersen NC, Laliberte L, Ekman S: A transient febrile "limping" syndrome of kittens caused by two different strains of feline calicivirus. *Feline Pract* 13: 26-35, 1983.
6. Wardley RC, Povey R.C: The pathology and sites of persistence associated with three different strains of feline calicivirus. *Res Vet Sci* 23: 15-19, 1977.
7. Gaskell CJ, Gaskell RM, Dennis PE, Wooldridge MJA.: Efficacy of an inactivated feline calicivirus (FCV) vaccine against challenge with United Kingdom field strains and its interaction with the FCV carrier state. *Res Vet Sci* 32: 23-26, 1982.
8. Gaskell RM.: An assessment of the use of feline respiratory virus vaccines, in Grunsell CSG, Hill FWG (eds.): *the Veterinary Annual*, 21st Issue. Bristol, Wright-Scientifica, 1981, pp. 267-274.
9. Gaskell RM., Dawson S: Viral-induced upper respiratory disease, in Chandler EA, Gaskell CJ, Gaskell RM (eds): *Feline Medicine and Therapeutics*, ed 2. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1994, pp. 453-472.
10. Dawson S, McArdle F, Bennett D, et al.: Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination *Vet Rec* 132: 346-350, 1993.
11. Povey RC: Serological relationships among feline caliciviruses. *Infect Immun* 10: 1307-1314, 1974.
12. Harbour DA, Howard, PE, Gaskell RM: Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Vet Rec* 128: 77-80, 1991.
13. Lauritzen A, Jarrett O, Sabara M: Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. *Vet Microbiol* 56: 55-63, 1997.
14. Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, et al.: A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 6(3): 253-264, 1983.
15. Tohya Y, Taniguchi Y, Tsubakimoto M, et al.: Preparation and Characterization of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Feline Calicivirus. *Jpn J Vet Sci* 52(2): 251-256, 1990.
16. Geissler K, Schneider K, Platzer G, et al.: Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations. *Virus Res* 48(2): 193-206, 1997.
17. Van Vuuren M, Geissler K, Gerber D, et al.: Characterisation of a potentially abortigenic strain of feline calicivirus isolated from a domestic cat. *Vet Rec* 144: 636-638, 1999.
18. Knowles JO, Dawson S, Gaskell RM. et al.: Neutralisation patterns among recent British and North American feline calicivirus isolates from different clinical origins. *Vet Rec* 127: 125-127, 1990.
19. Dawson S, McArdle F, Bennett N, et al.: Typing of feline calicivirus isolated from different clinical groups by virus neutralization tests. *Vet Rec* 133: 13-17, 1993.
20. Hohdatsu T, Sato K, Tajima T, Koyama H: Neutralizing feature of commercially available feline calicivirus (FCV) vaccine immune sera against FCV field isolates. *J Vet Med Sci* 61 (3): 299-301, 1999.