

Grazie a reagenti forniti da AGaBi e al contributo degli allevatori di Sacri di Birmania e di altre razze, che hanno partecipato con i campioni dei loro gatti allo studio finanziato dalla Winn Feline Foundation sulla valutazione dell'assetto immunitario di gatti Birmani in rapporto ad altre razze, nel 2014 hanno finalmente visto la luce i lavori eseguiti presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dal gruppo di lavoro da me coordinato e costituito principalmente dai Dr. Alessia Giordano e Gabriele Rossi. In questa sede verranno brevemente riassunti i principali risultati ottenuti e in calce verranno riportati gli estremi dei lavori pubblicati di modo che chi è interessato possa accedere direttamente agli abstract (spesso disponibili gratuitamente) o accedere al lavoro completo tramite il sito del convegno o della rivista.

Il primo studio, preliminare al successivo sulla valutazione dell'immunità nei gatti Birmani, è consistito nella valutazione di tecniche di isolamento di globuli bianchi (leucociti) da sangue felino, ed è stato presentato al convegno dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria.¹ Lo scopo dello studio era quello di provare l'efficacia dei metodi più comunemente usati per isolare i globuli bianchi da sangue di gatto. Questo perché tutti gli studi ad oggi pubblicati e tesi a valutare come funzionano e come rispondono a virus o batteri queste cellule di difesa sono svolti su cellule che vengono isolate e valutate in vitro. Purtroppo però per ottenere quantità di cellule sufficienti a svolgere uno studio in vitro bisogna partire da grandi quantità di cellule e quindi prelevare molto sangue, tanto che pochissimi lavori sono eseguiti su gatti malati (nei quali il prelievo di grosse quantità di sangue può mettere a rischio la vita del paziente) e anche i lavori eseguiti su gatti sani vengono di solito effettuati nell'ambito di studi sperimentali e non in studi di campo su gatti di allevamento o di proprietà. Abbiamo quindi voluto verificare se le procedure più comuni permettono di isolare sufficienti globuli bianchi da prelievi eseguiti di routine durante visite veterinarie per valutare se lo studio delle risposte dei leucociti possa essere eseguito anche in condizioni "di campo", che a nostro parere forniscono informazioni più attendibili di quelle ottenute da animali da esperimento.

A questo scopo abbiamo confrontato la "resa" di metodi di isolamento tradizionali (basati su una serie di centrifugazioni del sangue dopo miscelazione con composti a diversa densità), con quella di un nuovo metodo basato sull'uso di anticorpi legati a piccole sfere di ferro, forniti per l'appunto da AGaBi. In pratica, dopo il legame tra questi anticorpi e i globuli bianchi è possibile separare i globuli bianchi dal sangue con un magnete.

I risultati di questo studio hanno però evidenziato che nessuna delle metodiche utilizzate, compreso quella più innovativa, è in grado di separare, in un comune prelievo di sangue, un numero sufficiente di globuli bianchi da poter effettuare successive prove in vitro. Nei rari casi in cui il numero totale avrebbe potuto essere sufficiente, le caratteristiche delle diverse cellule isolate non erano corrispondenti, in termini di tipi di cellule isolate, a quelle del sangue di partenza e quindi eventuali prove in vitro potrebbero fornire risultati diversi da quello che invece accade in vivo, dove gli eventuali patogeni interagiscono con una popolazione cellulare diversa da quella che si ottiene "in provetta".

In quest'ottica lo studio delle risposte immunitarie ad agenti esterni, e in particolare a coronavirus, non può essere eseguito in condizioni di campo (e cioè su campioni routinariamente raccolti da gatti portati a visita veterinaria) su cellule isolate in quanto nella migliore delle ipotesi fornirebbe un quadro diverso da quello che probabilmente si verifica durante l'interazione tra patogeni e sistema immunitario del gatto.

Alla luce dei risultati di questo studio, il lavoro finanziato dalla Winn Feline Foundation e relativo alle risposte immunitarie di gatti Birmani in funzione del tasso di infezione da coronavirus felino (FCoV) non è stato eseguito su cellule isolate ma direttamente sui campioni di sangue. In particolare si è cercato di ottenere una specie di "fotografia" dell'interazione tra virus e risposta immunitaria, andando a valutare, da un lato il tasso di infezione da coronavirus (sia misurando il titolo anticorpale, sia cercando con PCR il virus nelle feci degli animali sani, sia valutando la frequenza di FIP nei vari gruppi di animali che hanno partecipato allo studio) e dall'altro misurando una serie di parametri della risposta immunitaria (numero e tipo di leucociti, proteine infiammatorie, citochine, cioè piccole proteine in grado di influenzare il tipo e

l'efficienza della risposta immunitaria) in gatti Birmani e di altre razze. I risultati sono stati abbastanza interessanti e per alcuni aspetti sorprendenti, e sono stati pubblicati sulla rivista internazionale "Research in Veterinary Sciences".²

In totale, sono stati raccolti campioni di sangue e feci da 169 gatti sani sia dal punto di vista clinico che di esami di laboratorio appartenenti a 21 allevamenti e due colonie. Tra i gatti inclusi nello studio 75 erano sacri di Birmania e 94 appartenevano a altre razze (6 Certosini, 24 Comuni Europei, 6 Maine Coon, 15 Norvegesi delle Foreste, 4 Persiani e 39 Siberiani). Come prevedibile, ad eccezione delle due colonie di gatti europei, i 21 allevamenti presentavano caratteristiche simili tra loro in termini di gestione (conduzione familiare, numeri di gatti variabili tra 2 e 10 soggetti per razza, condivisione degli ambienti ad eccezione di casi particolari quali aggressività o calore nelle femmine) ma anche in termini di stato sanitario generale: in tutti gli allevamenti lo stato di salute era ottimale ad eccezione, in alcuni casi, di ricorrenti fenomeni di riniti, dermatiti o enteriti di lieve entità. Quindi, gli animali inclusi nello studio rappresentavano la condizione ideale per valutare lo stato immunitario "a riposo" (non stimolato da malattie infettive in forma attiva al momento del prelievo) e per verificare l'eventuale diverso assetto immunitario e l'eventuale variabilità tra livello di infezione con FCoV nei Sacri di Birmania rispetto ad altre razze.

Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, è risultato sorprendente, rispetto a quanto riportato in studi precedenti, il fatto che i Sacri di Birmania non presentassero un livello di infezione particolarmente elevato rispetto agli altri gatti: sia tra i Sacri di Birmania che tra le altre razze infatti, il livello di infezione è risultato essere "molto alto" o "alto" (più del 50% degli animali risultavano sieropositivi o con PCR fecale positiva). Gli allevamenti con tasso di infezione basso (meno del 50% dei gatti risultavano sieropositivi o con PCR fecale positiva) o negativo, sono stati rari sia tra i Birmani sia tra gli altri gatti. I Birmani eliminatori di virus con le feci erano significativamente meno (31% dei campioni esaminati) rispetto agli eliminatori di altre razze (46.8%) mentre la proporzione di sieropositivi è risultata simile (73.3% contro 77.7%) così come il titolo anticorpale medio (1:200 nei Birmani, 1:100 nelle altre razze). Anche la frequenza di FIP conclamata non è risultata superiore nei gatti Birmani, anzi, nel periodo di osservazione si sono registrati 5 casi di FIP tra i Birmani (6,7% rispetto al totale dei gatti sani) e 16 tra i "non Birmani" (17.0% rispetto al totale dei gatti sani). In ogni caso, il titolo anticorpale o il numero di sieropositivi o di positivi alla PCR non è risultato associato alla frequenza di casi di FIP né nei Birmani né nelle altre razze.

In ultima analisi questi dati sembrano smentire sia la maggiore predisposizione alla FIP dei gatti Birmani, riportata da uno studio americano basato sull'analisi retrospettiva delle diagnosi di FIP post-mortem, sia i risultati di altri studi inglesi che rilevavano titoli anticorpali e sieropositività più frequenti nei Birmani che in altre razze. Va però sottolineato che gli studi appena citati da un lato erano basati su un numero minore di animali (ad esempio, lo studio retrospettivo sui risultati delle autopsie includeva solo 18 gatti Birmani), e dall'altro potrebbero essere influenzati dal fatto che nei lavori citati il gruppo "non Birmani" includeva razze diverse, forse più esposte a coronavirusi, di quelle esposte in questo studio. Un'ulteriore, e più probabile, spiegazione della minore frequenza di coronavirusi, sieropositività e FIP registrata in questo studio potrebbe infine risiedere nella diversa popolazione di Birmani in esame, sia in termini di tipologie di allevamento, visto che in Italia prevalgono gli allevamenti a gestione familiare, sia in termini di linee di sangue che potrebbero essere, nel nostro caso, più resistenti all'infezione di quelle degli studi precedenti.

La conferma che la popolazione in esame avesse una maggiore resistenza alla forma clinica della malattia viene anche dall'analisi dei parametri immunitari. In particolare, rispetto al gruppo dei "non Birmani" i gatti Birmani inclusi in questo studio hanno mostrato una più forte immunità cellulo-mediata, indicata da un più alto livello di tutti gli indicatori di questo tipo di immunità sia cellulari (maggior numero di linfociti CD4 e più alto rapporto CD4/CD8) o biochimici (maggior livello di interferone-gamma e più elevato rapporto tra citochine IL12 e IL4). Non si sono invece rilevate differenze tra gli indicatori dell'efficienza dell'immunità innata (aspecifica) quali le frazioni elettroforetiche o la concentrazione di alfa-1-glicoproteina acida (AGP).

Solo in alcuni individui quest'ultima risultava elevata in assenza di sintomi clinici, a indicare che forse alcuni gatti Birmani sono più "reattivi" verso stimoli non specifici.

In ultima analisi anche il quadro relativo all'immunità cellulo-mediata, che è la principale responsabile della difesa contro i FCoV, supporta la minor frequenza di FIP o coronaviriosi riscontrata in questo studio. Va però tenuto presente che se questo tipo di risposta è più forte, è più facile la persistenza dei coronavirus nell'organismo e quindi è noto che in caso di persistenza il coronavirus può più facilmente mutare favorendo così la comparsa di ceppi "FIP". La più forte immunità cellulare potrebbe quindi spiegare il fatto che, sebbene in questo studio non si sia rilevata una maggiore sensibilità alla FIP nei gatti Birmani, forse per le caratteristiche di gestione degli allevamenti o delle linee di sangue in esame, in altre condizioni ambientali una maggiore persistenza virale nei gatti infetti potrebbe indurre la comparsa di varianti in grado di indurre FIP.

La grande disponibilità di campioni acquisiti durante lo studio precedente, unita alla presenza, nel database del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, di altri dati riferiti ad esami di laboratori in gatti sani appartenenti ad altre razze, ha reso possibile anche la realizzazione di un terzo lavoro, pubblicato sul "Journal of Feline Medicine and Surgery" relativo ai valori di normalità di parametri di laboratorio in alcune razze feline. L'argomento della definizione della "normalità di laboratorio" è di grande attualità in medicina veterinaria e ha una notevole importanza pratica in quanto quando sottoponiamo ad esami un animale malato, confrontiamo i suoi risultati con quelli "normali" ma se questi in alcune razze sono diversi da quelli relativi alla popolazione felina "generica", per caratteristiche intrinseche della razza, è possibile che consideriamo erroneamente patologico un risultato che in quella razza è in realtà normale o, al contrario, che consideriamo normali risultati che in realtà sono patologici.

In questo studio è stato possibile analizzare un numero di dati sufficiente a stabilire intervalli di riferimento, secondo le linee guida internazionali, per quattro razze feline: Abissini, Sacri di Birmania, Norvegesi delle Foreste e Siberiani. Nella gran parte dei casi gli intervalli di riferimento "generici" che si trovano sui libri di testo o che sono riportati nei referti della maggior parte dei laboratori si adattano anche a queste razze e possono essere utilizzati nella pratica clinica. Le caratteristiche di razza che richiederebbero l'uso di intervalli di riferimento specifici per ogni razza sono i seguenti:

- Abissini: sono tendenzialmente microcitici (hanno globuli rossi più piccoli), come evidenziato dal volume corpuscolare medio (MCV) dei globuli rossi, il cui valore minimo è 34 fL invece che 39 fL, e hanno una più alta concentrazione di α 2-globuline nell'elettroforesi (fino a 27 g/L invece che fino a 9 g/L)
- Sacri di Birmania: hanno una concentrazione più alta di creatinina (fino a 2,5 mg/dL invece che 1,6 mg/dL), α 2-globuline (fino a 16 g/L invece che fino a 9 g/L) e glucosio (fino a circa 170 mg/dL invece che 110 mg/dL)
- Norvegesi delle Foreste: hanno una più alta attività di fosfatasi alcalina (ALP) (fino a 505 U/L invece che fino a 93 U/L) e di fosforo (fino a circa 11 mg/dL invece che 8 mg/dL) e una più bassa concentrazione di β 2-globuline il valore minimo è 1 g/L invece che 6 g/L) e γ -globuline (il valore minimo è 3 g/L invece che 17 g/L)
- Siberiani: hanno una più bassa concentrazione di β 2-globuline e γ -globuline, con valori uguali a quelli sopra riportati per i Norvegesi.

La conoscenza di queste peculiarità di razza è importante perché, per prendere ad esempio solo un paio dei valori sopra riportati, se ci troviamo di fronte a un gatto Birmano con valori di creatinina ad esempio di 2.4 mg/dL o valori di glicemia di 160 mg/dL) potremmo pensare che soffra di insufficienza renale o diabete, rispettivamente, se confrontassimo i suoi risultati con quelli riportati sui testi (1,6 mg/dL e 160 mg/dL), mentre lo dobbiamo considerare privo di alterazioni di laboratorio in quanto in questa razza questi valori sono inferiori al limite massimo dell'intervallo di riferimento (2.5 e 170 mg/dL, rispettivamente).

Elenco lavori pubblicati:

¹Rossi G., Pertica G., Giordano A., Paltrinieri S. (2014) Comparison of different procedures to isolate feline peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from small volumes of blood Atti LXVIII CONVEGNO SISVET, XI CONVEGNO AIPVET E XII CONVEGNO SIRA, Pisa, 16-18 giugno 2014, pag. 243.

Disponibile su: http://www.sisvet.it/00_atti/atti_sisvet_2014.pdf

²Paltrinieri S., Rossi G., Giordano A. (2014) Relationship between rate of infection and markers of inflammation/immunity in Holy Birman cats with feline coronavirus. *Research in Veterinary Sciences* 97:263-270. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.08.009.

Abstract disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25241387>

Full article scaricabile dal sito della rivista online (<http://www.journals.elsevier.com/research-in-veterinary-science>) secondo le regole dell'editore (solitamente free download per abbonati o download a pagamento per non abbonati)

³Paltrinieri S., Ibba F., Rossi G. (2014) Hematological and biochemical reference intervals of four feline breeds. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:125-136, DOI: 10.1177/1098612X13499337.

Abstract disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906706>

Full article scaricabile dal sito della rivista online (<http://jfm.sagepub.com>) secondo le regole dell'editore (solitamente free download per abbonati o download a pagamento per non abbonati)