

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo 35

**Settore Concorsuale:** 07/H3 - MALATTIE INFETTIVE E PARASSITARIE DEGLI ANIMALI

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/05 - MALATTIE INFETTIVE DEGLI ANIMALI DOMESTICI

UTILIZZO INTEGRATO DI METODICHE MOLECOLARI PER LA RICERCA E LA  
CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEGLI AGENTI INFETTIVI IN CARNIVORI  
DOMESTICI E SELVATICI

**Presentata da:** Lorenza Urbani

**Coordinatore Dottorato**

Carolina Castagnetti

**Supervisore**

Mara Battilani

**Co-supervisore**

Andrea Balboni

**Esame finale anno 2023**



*Non fermatevi là dove siete arrivati  
(Pitagora)*



# Indice

<b>Riassunto</b> .....	<b>5</b>
<b>I. Introduzione</b> .....	<b>7</b>
<b>I.I Le tecniche molecolari</b> .....	7
<b>I.II Il sequenziamento del DNA</b> .....	10
<b>I.III Principali agenti infettivi di interesse veterinario</b> .....	11
<b>I.IV Obiettivi della tesi</b> .....	16
<b>I.V Bibliografia</b> .....	17
<b>STUDIO 1: USO INTEGRATO DI METODICHE MOLECOLARI PER LA RICERCA E LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI VIRUS A DNA IN UNA POPOLAZIONE DI LUPI ITALIANI</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1 Obiettivi dello studio</b> .....	25
<b>1.2 Materiali e metodi</b> .....	25
<i>1.2.1 Disegno dello studio e campionamento</i> .....	25
<i>1.2.2 Estrazione del DNA</i> .....	26
<i>1.2.3 Screening di Carnivore protoparvovirus 1, adenovirus canino di tipo 1 e 2, e circovirus canino</i> .....	26
<i>1.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati</i> .....	29
<b>1.3 Risultati</b> .....	33
<i>1.3.1 Popolazione di studio</i> .....	33
<i>1.3.2 Ricerca del DNA di Carnivore protoparvovirus 1, adenovirus canino e circovirus canino</i> .....	33
<i>1.3.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati</i> .....	34
<b>1.4 Discussione</b> .....	40
<b>1.5 Conclusione</b> .....	43
<b>1.6 Bibliografia</b> .....	44
<b>STUDIO 2: CIRCOVIRUS CANINO E ADENOVIRUS CANINO DI TIPO 1 E 2 IN CANI CON PARVOVIROSI</b> .....	<b>49</b>
<b>2.1 Obiettivi dello studio</b> .....	49
<b>2.2 Materiali e metodi</b> .....	49
<i>2.2.1 Disegno dello studio, criteri di inclusione e campionamento</i> .....	49
<i>2.2.2 Ricerca del DNA di circovirus canino e adenovirus canino di tipo 1 e 2</i> .....	50
<i>2.2.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati</i> .....	50
<i>2.2.4 Analisi statistica</i> .....	52
<b>2.3 Risultati</b> .....	52
<i>2.3.1 Popolazione di studio</i> .....	52
<i>2.3.2 Ricerca del DNA di circovirus canino e adenovirus canino di tipo 1 e 2</i> .....	53
<i>2.3.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati</i> .....	54
<b>2.4 Discussione</b> .....	60
<b>2.5 Conclusione</b> .....	64

2.6 Bibliografia.....	65
<b>STUDIO 3: INDAGINE MOLECOLARE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CIRCOVIRUS CANINO IN VOLPI ARTICHE (<i>VULPES LAGOPUS</i>) NELLE ISOLE SVALBARD E IN VOLPI ROSSE (<i>VULPES VULPES</i>) IN NORVEGIA SETTENTRIONALE</b> .....	<b>69</b>
3.1 Obiettivi dello studio .....	69
3.2 Materiali e metodi.....	69
3.2.1 Area di studio e campionamento .....	69
3.2.2 Estrazione del DNA .....	70
3.2.3 Ricerca del DNA di circovirus canino.....	71
3.2.4 Caratterizzazione genetica del genoma completo di circovirus canino .....	71
3.3 Risultati .....	72
3.3.1 Ricerca del DNA di circovirus canino.....	72
3.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	73
3.4 Discussione .....	77
3.5 Conclusione .....	79
3.6 Bibliografia.....	80
<b>STUDIO 4: CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PARVOVIRUS CANINO DI TIPO 2 IN CANI CON GASTROENTERITE ACUTA IN ROMANIA.....</b>	<b>83</b>
4.1 Obiettivo dello studio .....	83
4.2 Materiali e metodi.....	83
4.2.1 Disegno dello studio e campionamento .....	83
4.2.2 Ricerca del DNA di Carnivore protoparvovirus 1 .....	83
4.2.3 Analisi di sequenza .....	84
4.3 Risultati .....	85
4.3.1 Popolazione di studio e ricerca del DNA di Carnivore protoparvovirus 1 .....	85
4.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	85
4.4 Discussione .....	88
4.5 Conclusione .....	89
4.6 Bibliografia.....	90
<b>STUDIO 5: DIAGNOSI DI INFEZIONE, CARATTERIZZAZIONE GENETICA E NEUTRALIZZAZIONE ANTICORPALE DI CANINE DISTEMPER VIRUS IN FAINE (<i>MARTES FOINA</i>).....</b>	<b>93</b>
5.1 Obiettivi dello studio .....	93
5.2 Materiali e metodi.....	93
5.2.1 Popolazione di studio e campionamento .....	93
5.2.2 Estrazione dell'RNA .....	94
5.2.3 Ricerca dell'RNA di canine distemper virus tramite real-time RT-PCR e end-point RT-PCR .....	95
5.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	98

5.2.5 Test di sieroneutralizzazione virale .....	99
<b>5.3 Risultati</b> .....	100
5.3.1 Ricerca dell'RNA di canina distemper virus .....	100
5.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	101
5.3.3 Test di sieroneutralizzazione virale .....	102
<b>5.4 Discussione</b> .....	102
<b>5.5 Bibliografia</b> .....	104
<b>STUDIO 6: STUDIO DELLA CORRELAZIONE TRA POLIARTRITE E INFEZIONE DA CALICIVIRUS FELINO NEI GATTI</b> .....	<b>107</b>
<b>6.1 Obiettivi dello studio</b> .....	107
<b>6.2 Materiali e metodi</b> .....	107
6.2.1 Popolazione di studio e campionamento .....	107
6.2.2 Estrazione dell'RNA .....	108
6.2.3 Ricerca dell'RNA di felino calicivirus tramite un saggio di real-time RT-PCR.....	109
6.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	110
6.2.5 Immunoistochimica nelle membrane sinoviali .....	111
<b>6.3 Risultati</b> .....	112
6.3.1 Popolazione di studio e ricerca dell'RNA di calicivirus felino .....	112
6.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati .....	113
6.3.3 Esame post mortem, esame istopatologico ed immunoistochimica nelle membrane sinoviali del Gatto3 .....	113
<b>6.4 Discussione</b> .....	115
<b>6.5 Conclusione</b> .....	117
<b>6.6 Bibliografia</b> .....	118
<b>STUDIO 7: RICERCA DEL DNA DI ANAPLASMA SPP. ED EHRLICHIA SPP. IN DIVERSE MATRICI BIOLOGICHE DI GATTI</b> .....	<b>121</b>
<b>7.1 Obiettivi dello studio</b> .....	121
<b>7.2 Materiali e metodi</b> .....	121
7.2.1 Disegno dello studio e campionamento .....	121
7.2.2 Ricerca del DNA di Anaplasma spp. ed Ehrlichia spp. ....	121
7.2.3 Analisi di sequenza .....	123
7.2.4 Analisi statistica .....	123
<b>7.3 Risultati</b> .....	124
7.3.1 Popolazione di studio e campionamento .....	124
7.3.2 Ricerca del DNA di Anaplasma spp. ed Ehrlichia spp. e analisi di sequenza.....	124
<b>7.4 Discussione</b> .....	126
<b>7.5 Conclusione</b> .....	128
<b>7.6 Bibliografia</b> .....	129

**Considerazioni finali..... 131**  
**Allegati ..... 133**  
**Ringraziamenti ..... 155**



## Riassunto

In medicina veterinaria le metodiche molecolari sono ampiamente utilizzate con finalità di diagnostica e ricerca. In questa tesi di dottorato sono riportati i risultati di diversi studi in cui con metodiche molecolari è stata valutata la circolazione e sono state studiate le caratteristiche genetiche di alcuni dei principali agenti infettivi virali e batterici che infettano i carnivori domestici e selvatici. In particolare, tra il 2019 e il 2022 sono state testate differenti matrici biologiche di carnivori domestici e selvatici provenienti dall'Italia e da altri Paesi europei (Norvegia e Romania). Diversi saggi molecolari, tra cui real-time PCR, end-point PCR, semi-nested PCR, retrotrascrizione e rolling circle amplification, sono stati utilizzati per ricercare il DNA o l'RNA genomico di virus e batteri. Il sequenziamento dell'intero genoma o di geni informativi dei patogeni identificati ne ha inoltre consentito la caratterizzazione genetica e l'analisi filogenetica.

Gli studi, svolti presso l'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'*Alma Mater Studiorum*-Università di Bologna, erano focalizzati nei confronti di alcuni virus a DNA, come *Carnivore protoparvovirus 1* in lupi dall'appennino italiano e cani dalla Romania, adenovirus canino di tipo 1 e 2 in cani e lupi provenienti dal territorio nazionale, circovirus canino in cani e lupi italiani e volpi rosse e artiche della Norvegia; virus a RNA, come il canino distemper virus in faine recuperate nel territorio italiano e il calicivirus felino in gatti con diagnosi di poliartrite; e batteri appartenenti alla specie *Anaplasma phagocytophilum* in gatti deceduti e sottoposti a necropsia in Italia.

Dai risultati ottenuti è emerso che gli agenti infettivi indagati circolano nelle popolazioni di carnivori domestici e selvatici in forma asintomatica o determinando talvolta sintomatologia clinica. In alcuni animali testati è stata rilevata la coinfezione con diversi agenti patogeni, condizione che può predisporre ad un aggravamento della sintomatologia clinica. Dall'analisi filogenetica sono emerse relazioni tra gli agenti infettivi rilevati nelle differenti specie animali suggerendone la trasmissione tra ospiti domestici e selvatici e confermando il ruolo epidemiologico svolto dei carnivori selvatici nel mantenimento dei patogeni nel territorio. Alla luce dei dati ottenuti, è importante sottolineare l'importanza delle misure di profilassi, in particolare la vaccinazione degli animali da compagnia, per ridurre la trasmissione e la diffusione degli agenti infettivi.



## **I. Introduzione**

### **I.1 Le tecniche molecolari**

Negli ultimi 50 anni la biologia molecolare ha trovato molteplici applicazioni nella diagnosi delle malattie infettive in medicina umana e veterinaria.

Le tecnologie molecolari disponibili agli inizi degli anni '80 per la ricerca degli acidi nucleici non prevedevano la loro amplificazione ed erano rappresentate soprattutto da tecniche che si basavano sulla digestione dell'acido nucleico attraverso enzimi di restrizione, separazione mediante elettroforesi, fissazione su una membrana di nylon o di nitrocellulosa, ibridazione con sonda marcata con isotopo radioattivo o con reagenti fluorescenti o chemiluminescenti o con antigeni e rilevazione della reazione di ibridazione mediante autoradiografia, microscopio a fluorescenza, istochimica o immunoistochimica a seconda della sonda utilizzata (Jensen, 2014; Kroczeck, 1993; Southern et al., 1975). Tra queste tecniche molecolari citiamo il "Southern blot" che ha come molecola target il DNA, il "Northern blot" che ha come molecola target l'RNA, l'ibridazione in situ e i saggi di "microarray". Tutte queste metodiche trovano applicazione in studi di espressione e mappatura genica, di malattie infettive (virali e batteriche) ed ereditarie e di mutazioni geniche (Jensen, 2014; He e Green, 2013; Kroczeck, 1993; Southern et al., 1975). Tuttavia queste tecniche presentano alcuni svantaggi, quali la necessità di ricorrere ad una digestione con enzimi di restrizione specifici per il target molecolare che si vuole individuare, all'utilizzo di sonde radioattive, alla scarsa sensibilità e riproducibilità, ai costi elevati ed ai tempi di esecuzione molto lunghi e non compatibili con attività di diagnostica routinaria (Bolón-Canedo et al., 2019; Jensen, 2014; He e Green, 2013), pertanto attualmente vengono per lo più utilizzate in associazione ad altre tecniche molecolari che prevedono l'amplificazione dell'acido nucleico.

Verso la metà degli anni '80 sono stati pubblicati i primi lavori sulla reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction - PCR) che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole di DNA identiche a quelle del DNA di partenza a partire da quantitativi ridottissimi di questo acido nucleico (Mullis e Faloona, 1987; Mullis et al., 1986). La PCR è una metodica molecolare che consiste in una reazione di amplificazione in vitro di una sequenza di DNA o RNA (DNA complementare a singolo filamento - cDNA) target, per mezzo di una DNA polimerasi termoresistente. Ciascun ciclo di amplificazione è composto da tre fasi: denaturazione del DNA stampo ad elevata temperatura (90-98 °C); annealing dei primer (forward e reverse) alla sequenza target (circa 50-60 °C) ed estensione del filamento di DNA mediante aggiunta di nucleotidi (circa 68-72 °C a seconda dell'enzima utilizzato) (Green e Sambrook, 2019a). La PCR ha rivoluzionato l'attività dei laboratori di ricerca e dei laboratori di diagnostica trovando applicazione in differenti campi della medicina e biologia quali la genetica, la microbiologia, la virologia, la medicina forense, l'oncologia nonché in discipline di vario

interesse tra le quali la botanica, la zootecnia e numerose altre. La PCR presenta numerosi vantaggi rispetto alle metodiche molecolari utilizzate prima della sua scoperta tra cui la possibilità di amplificare il DNA target a partire da quantitativi di acido nucleico ridottissimi e di amplificare frammenti molto piccoli di DNA, anche se parzialmente degradati. Inoltre, è possibile eseguire questa indagine sia partendo da campioni biologici freschi, quali sangue, siero, fluidi e tessuti biologici vari, sia da campioni biologici conservati a -20 o -80 °C oppure da tessuto incluso in paraffina, rendendo possibile l'esecuzione di studi a carattere retrospettivo. Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse metodiche di end-point PCR, tra cui ricordiamo la RT-PCR, ossia una amplificazione a partire da un segmento di RNA che sfrutta la capacità della DNA polimerasi RNA dipendente, o enzima retrotrascrittasi, di retrotrascrivere l'RNA in cDNA in una reazione che avviene con un singolo ciclo termico caratterizzato da una temperatura di azione dell'enzima generalmente compresa tra 50 e 70 °C, cui fa seguito la reazione di amplificazione (Bachman, 2013); la nested PCR, ossia una metodica che coinvolge due distinte e successive reazioni di amplificazione: nella prima si utilizza una coppia di primer più esterna al frammento di DNA da amplificare e nella seconda si utilizza il prodotto della prima reazione come templatato che viene amplificato con una coppia di primer più interna al DNA target rispetto a quella della prima amplificazione (Green e Sambrook, 2019b); la multiplex PCR, ossia una metodica utilizzata per la ricerca simultanea di più target di DNA in una singola reazione, utilizzando una coppia di primer per ciascun target (Markoulatos et al., 2002). Per la rilevazione del prodotto di PCR si ricorre solitamente ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio in cui il DNA, colorato con un fluorocromo e sottoposto ad una differenza di potenziale elettrico, migra con velocità inversamente proporzionale alla dimensione dell'amplicone. La lettura del risultato avviene sotto luce UV. Al fine di quantificare gli acidi nucleici amplificati, aumentare la sensibilità e ridurre i tempi di esecuzione delle metodiche di PCR, sono state sviluppate altre metodiche tra cui la real-time PCR (qPCR) e la digital PCR (dPCR). La real-time PCR è una metodica di amplificazione qualitativa e quantitativa che in breve tempo di esecuzione permette di rilevare in tempo reale il DNA amplificato marcato con molecole fluorescenti. La rilevazione del DNA prodotto può avvenire con molecole fluorescenti intercalanti del DNA in modo aspecifico come il SYBR Green oppure con sonde specifiche marcate con fluorocromi come la TaqMan (Navarro et al., 2015; Arya et al., 2005). Il SYBR Green è una molecola fluorescente che durante la fase di elongazione della reazione si intercala in modo aspecifico nel doppio filamento del DNA emettendo fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte. Dal momento che il SYBR Green si lega in maniera aspecifica, al termine della reazione occorre realizzare un'analisi della curva di melting che consiste nel rilevare il decremento nella fluorescenza emessa dal campione tramite incremento di temperatura. Durante questa fase il DNA a doppio filamento presente si dissocerà ad una temperatura specifica correlata

sia alla lunghezza del filamento sia alla composizione in basi azotate. In questo modo è possibile identificare la temperatura di melting ( $T_m$ ) specifica del target di amplificazione e discriminarlo da eventuali prodotti aspecifici o dimeri di primer. Le sonde TaqMan sono sequenze oligonucleotidiche disegnate per ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR e presentano all'estremità 5' un fluoroforo (Reporter) ed all'estremità 3' una molecola (Quencher). Durante la fase di estensione la sonda viene degradata e la liberazione del Reporter con allontanamento dal Quencher determina un'emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di DNA prodotto. Rispetto al SYBR Green le sonde TaqMan emettono fluorescenza specifica per il target di amplificazione, senza necessità di eseguire la curva di Melting al termine della reazione, ma sono più complesse da mettere a punto e più costose (Navarro et al., 2015; Arya et al., 2005). La dPCR è una metodica molecolare che permette di quantificare in maniera assoluta gli acidi nucleici, senza la necessità di un DNA standard o di un gene di riferimento, rendendone l'esecuzione più rapida, precisa e riproducibile (Manoj, 2016). La dPCR utilizza lo stesso metodo di rivelazione della qPCR, ovvero la fluorescenza. Il campione analizzato in dPCR viene diluito e ripartito in milioni di camere di reazione, in maniera tale che in ogni partizione si troverà una sola molecola di acido nucleico o nessuna (Kanagal-Shamanna, 2016). La partizione del campione diminuisce la quantità di DNA che funge da background e di conseguenza aumenta la sensibilità nei confronti del DNA target. Se la camera di partizione contiene il template di interesse, viene prodotta una reazione positiva. Se, al contrario, la camera di partizione non contiene il template, la reazione sarà negativa. Il numero di molecole di template nel campione analizzato è quindi calcolato in base alla percentuale di reazioni positive mediante la distribuzione di Poisson (Kanagal-Shamanna, 2016). La dPCR trova applicazione in diversi ambiti della medicina umana tra cui la diagnosi di tumori, di malattie infettive ed ereditarie (Kanagal-Shamanna, 2016). Tra le metodiche di recente sviluppo, troviamo anche la loop mediated isothermal amplification (LAMP) che è una tecnica isotermica di amplificazione genetica che non necessita di un classico termociclatore, ideale per condizioni di campo, che permette la rilevazione del DNA e combina semplicità di esecuzione ed interpretazione del dato, rapidità di esecuzione del test, alta specificità e sensibilità (Notomi et al., 2000). La LAMP si basa su un'amplificazione isotermica di acidi nucleici, sull'attività di una polimerasi termostabile e su un set di almeno sei primer specifici che riconoscono differenti sequenze del DNA target (Notomi et al., 2000). Il prodotto finale della LAMP è una miscela di strutture di DNA a cavolfiore composte da varie anse la cui rilevazione può essere effettuata mediante fluorescenza (Sun et al., 2006), o mediante metodi torbidimetrici (Mori et al., 2001). La LAMP trova molteplici applicazioni nella diagnosi rapida di malattie infettive, infatti essa è ampiamente utilizzata per la rilevazione di virus a DNA e RNA, in alcuni casi superando la sensibilità della PCR tradizionale (Curtis et al., 2014; Liu et al., 2014; Zeng

et al., 2014; Parida et al., 2004). Un'altra metodica di amplificazione isoterma è rappresentata dalla Rolling Circle Amplification (RCA) che sfrutta una reazione enzimatica per amplificare molecole di DNA circolari. Tale metodica utilizza una DNA polimerasi che agisce a temperatura costante e che, oltre alle attività di DNA polimerasi e di esonucleasi 3'-5', ha attività di "strand displacement" che consente di replicare il filamento di DNA target e contemporaneamente di scalzare il filamento precedentemente prodotto in seguito al legame del primer, rilasciando DNA a singolo filamento (ssDNA). Il prodotto finale dell'RCA è rappresentato da una lunga molecola di ssDNA contenente sequenze ripetute complementari al DNA circolare target (Goo e Kim, 2016). L'RCA viene utilizzata con successo per il rilevamento di molti virus a singolo o doppio filamento di DNA circolare. In generale, le metodiche molecolari sono applicabili in caso di agenti biologici di difficile isolamento e identificazione, permettono la diagnosi e il controllo di infezioni latenti o persistenti, consentono di differenziare ceppi vaccinali da ceppi di campo, evitano la manipolazione di agenti patogeni vivi potenzialmente pericolosi ed hanno tempi di esecuzione relativamente brevi.

## **I.II Il sequenziamento del DNA**

Il sequenziamento del DNA è un ambito della biologia molecolare in piena evoluzione. La sua storia risale alla seconda metà degli anni '70 quando fu pubblicato il primo studio sul metodo a terminazione di catena, o metodo di Sanger, dal nome dello scienziato che lo mise a punto (Sanger et al., 1977). Il sequenziamento di Sanger, noto anche come sequenziamento di prima generazione, sfrutta nucleotidi modificati (dideossinucleotidi, ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi di DNA in posizioni specifiche e marcati con un fluoroforo in modo da poter visualizzare le emissioni fluorescenti dei frammenti di DNA neosintetizzato dopo aver effettuato l'elettroforesi capillare e il passaggio sotto sorgente laser. I segnali di fluorescenza vengono elaborati da una camera CCD (Charge-Coupled Device) e restituiti sotto forma di grafico che prende il nome di elettroferogramma. I dati grezzi vengono poi assemblati ed analizzati mediante software specifici. Dalla sua proposta, il metodo ha subito diverse evoluzioni che ad oggi rendono la tecnica più accurata, di più facile esecuzione e più rapida, senza l'utilizzo di sostanze radioattive (Ansorge et al., 1987; Smith et al., 1986).

Agli inizi degli anni 2000, tuttavia, sono state introdotte le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione note come Next Generation Sequencing (NGS) che hanno rapidamente preso piede e in parte sostituito il sequenziamento Sanger. Esse permettono, con prezzi contenuti, di analizzare numerose sequenze di DNA in tempi di lavoro e step di processazione ridotti così da minimizzare la possibilità di introdurre errori. La possibilità di sequenziare un gran numero di frammenti di DNA in parallelo permette di ottenere una grossa mole di dati, interpretabile però solo mediante avanzati software bioinformatici (Voelkerding et al., 2009). Tra le piattaforme di sequenziamento di nuova

generazione ricordiamo Genome Analyzer Illumina/Solexa, Applied BioSystem/SOLiD, Ion Torrent, Pacific BioSciences, Heliscope Sequencer e Oxford Nanopore (Hu et al., 2021; Levy et al., 2019; Slatko et al., 2018). Sebbene si differenzino per il tipo di biochimica su cui si basano e per i metodi di acquisizione e di elaborazione dei dati, le piattaforme NGS sono accomunate da un work-flow operativo simile che prevede quattro fasi principali: i) preparazione del campione tramite frammentazione chimica, meccanica o fisica del DNA genomico in porzioni di piccole dimensioni; ii) amplificazione clonale dei frammenti di DNA; iii) sequenziamento e imaging; iv) analisi bioinformatica dei dati, in cui vengono valutati alcuni parametri della sequenza (intensità, rumore di fondo e presenza di eventuali segnali aspecifici) e vengono assegnati a ciascuna sequenza dei punteggi definiti “quality scores” correlati alla probabilità di errore. Le tecniche NGS trovano applicazione nel campo della biologia e della medicina, in particolare nel sequenziamento de novo, sequenziamento del trascrittoma, resequencing, studi di metagenomica e di epigenomica. Nonostante le tecniche NGS presentino numerosi vantaggi rispetto alle tecniche di sequenziamento precedenti, il metodo Sanger, grazie alla sua elevata affidabilità, costituisce ancora oggi la tecnica d’elezione nella pratica clinico-diagnostica per il sequenziamento di singoli target nucleotidici, rappresentando il sistema più utile nella validazione dei risultati ottenuti mediante tecnologia NGS (Crossley et al., 2020).

In medicina veterinaria le metodiche molecolari e le tecniche di sequenziamento sono ampiamente utilizzate con finalità di diagnostica e ricerca. La PCR viene usata per rilevare la presenza di agenti infettivi (virus, batteri, protozoi) in campioni biologici di animali domestici e selvatici a scopo diagnostico oppure con finalità di screening di infezioni in studi epidemiologici. Il sequenziamento consente di ottenere l’esatta sequenza nucleotidica di un agente patogeno e trova le sue principali applicazioni nelle analisi filogenetiche, negli studi epidemiologici e nelle indagini di medicina forense.

### **I.III Principali agenti infettivi di interesse veterinario**

Tra gli agenti infettivi che colpiscono gli animali domestici e selvatici vi sono i virus a DNA (compresi *Carnivore protoparvovirus-1*, adenovirus canino di tipo 1 e 2, circovirus canino, herpesvirus felino), i virus a RNA (compresi virus del cimurro canino, calicivirus felino, coronavirus canino e felino, virus dell’immunodeficienza felina, virus della leucemia felina), i batteri (compresi quelli appartenenti al genere *Leptospira* e alla famiglia *Anaplasmataceae*), i protozoi (compresi quelli appartenenti ai generi *Leishmania* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Toxoplasma*, *Hepatozoon* spp.), e molti altri.

Alla specie *Carnivore protoparvovirus 1*, famiglia *Parvoviridae*, genere *Protoparvovirus*, appartengono virus che infettano i carnivori domestici e selvatici, tra cui il parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2) e il virus della panleucopenia felina (Greene e Decaro, 2012). Questi virus sono molto piccoli e sprovvisti di envelope ed hanno genoma a singolo filamento di DNA (ssDNA) lineare composto da due Open Reading Frames (ORFs): ORF1, all'estremità 3', codificante per proteine non strutturali (NS1 e NS2); e ORF2, all'estremità 5', codificante per proteine strutturali (VP1, VP2 e VP3) (Reed et al., 1988). Il CPV-2 è responsabile della parvovirosi canina, una malattia gastroenterica a diffusione mondiale altamente contagiosa, e le recenti varianti antigeniche del virus (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) possono infettare anche il gatto in cui sono responsabili di forme cliniche assimilabili alla panleucopenia infettiva felina (Truyen e Parrish, 2013; Truyen et al., 1996). Il CPV-2 colpisce anche i carnivori selvatici che si infettano attraverso il contatto con cani randagi o cani di proprietà non vaccinati vaganti in aree extra urbane (Miranda et al., 2017; Nelson et al., 2012; Bryan et al., 2011). Poiché il virus infetta principalmente cellule in intensa attività replicativa, i cuccioli di cane sono maggiormente a rischio di contrarre l'infezione con tassi di sopravvivenza molto bassi nei soggetti non trattati (Prittie, 2004). Tuttavia, anche i cani adulti possono essere colpiti, in particolare gli immunodepressi, i non vaccinati o i soggetti con infezioni ricorrenti che abbassano le difese immunitarie (Mylonakis et al., 2016). La parvovirosi canina è un'infezione con ciclo oro-fecale quindi la principale via di trasmissione è attraverso le feci, ma il virus può essere eliminato anche tramite saliva, urina e vomito (Greene e Decaro, 2012). Il CPV-2 inoltre è un virus molto resistente nell'ambiente grazie alla sua struttura, difficile da eliminare con disinfettanti e profilassi diretta. Pertanto, può essere trasmesso anche per contatto indiretto tramite fomites, operatori sanitari o animali come roditori o insetti. La diagnosi di laboratorio può essere effettuata con differenti metodiche sia dirette che indirette. Le metodiche dirette includono le tecniche molecolari che ricercano il DNA nei campioni fecali e rappresentano i test diagnostici più sensibili e specifici (Greene e Decaro, 2012); permettono inoltre la caratterizzazione genetica dei virus identificati, distinguendo le differenti varianti. La strategia di prevenzione più efficace nei confronti della parvovirosi canina è rappresentata dalla vaccinazione sia a protezione del singolo animale sia per ridurre la diffusione del virus nell'ambiente, limitando il rischio di esposizione all'infezione per gli altri animali domestici e selvatici.

Al genere *Mastadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*, appartengono l'adenovirus canino di tipo 1 (CAV-1) e l'adenovirus canino di tipo 2 (CAV-2) che colpiscono i carnivori domestici e selvatici (Dowgier et al., 2018; Balboni et al., 2013; Decaro et al., 2007) e causano rispettivamente l'epatite infettiva canina (ICH) o epatite di Rubarth (Greene, 2012; Decaro et al., 2007) e la tracheobronchite infettiva, nota anche come tosse dei canili (Buonavoglia e Martella, 2007). Questi virus possiedono



genoma a doppio filamento di DNA (dsDNA) lineare e sono caratterizzati da capsidi icosaedrici e assenza di envelope. La porzione centrale del genoma codifica per proteine strutturali, mentre le porzioni più esterne, più variabili, codificano per proteine non strutturali (Balboni, 2013). Il CAAdV-1 è trasmesso attraverso la saliva, le feci e le urine (Decaro et al., 2008), mentre il CAAdV-2 ha tropismo per l'apparato respiratorio e viene trasmesso primariamente per via aerea (Millán et al., 2016), tuttavia è stato riscontrato anche in campioni di feci (Balboni et al., 2013; Balboni et al., 2014). Per la diagnosi d'infezione si possono utilizzare metodi di laboratorio diretti e indiretti. Tra le metodiche dirette vi sono quelle molecolari tramite PCR o real-time PCR, che permettono di distinguere i due virus a partire da campioni di tessuto o di feci per ricercare il DNA virale (Dowgier et al., 2016; Balboni et al., 2015; Hu et al., 2001). Per limitare la trasmissione dell'infezione da CAAdV-1 e CAAdV-2 tra carnivori domestici e selvatici, la vaccinazione rimane, ad oggi, la misura di profilassi più efficace e i vaccini utilizzati per prevenire l'ICH sono allestiti con il CAAdV-2 contenenti il ceppo attenuato Toronto A26/61 (Decaro et al., 2008).

Il circovirus canino (CanineCV), famiglia *Circoviridae*, genere *Circovirus*, è un virus di piccole dimensioni che infetta carnivori domestici e selvatici (De Arcangeli et al., 2020; Anderson et al., 2017; Zaccaria et al., 2016; Bexton et al., 2015; Li et al., 2013). Il virione è caratterizzato da capsidi a simmetria icosaedrica ed è privo di envelope. Il genoma è a singolo filamento di DNA (ssDNA) circolare comprendente due principali ORFs: ORF1 codificante per una o più proteine associate alla replicazione virale (Rep) e ORF2 codificante per la proteina del capsido (Cap) (Kapoor et al., 2012). Tra i due ORFs è presente una regione intergenica (IR) non codificante, caratterizzata da una struttura a forcina, definita stemloop, che costituisce l'origine della replicazione (ORI) (Rosario et al., 2017). Il CanineCV è un virus scoperto di recente e pertanto il ruolo patogeno nei carnivori domestici e selvatici non è ancora chiaro. Alcuni studi effettuati in cani infetti hanno evidenziato potenziali correlazioni con lo sviluppo di gastroenterite, con sintomi quali diarrea anche emorragica, vasculite e linfadenite granulomatosa (Anderson et al., 2017, Li et al., 2013), e nelle volpi il virus è stato riscontrato in associazione con meningoencefalite e disturbi neurologici (Bexton et al., 2015). Per la diagnosi di infezione da CanineCV nei canidi, ad oggi, vengono utilizzate principalmente metodiche molecolari per la ricerca del DNA virale, a partire da diverse matrici, quali feci, fluidi biologici o organi prelevati in seguito ad esami necroscopici (Anderson et al., 2017; Zaccaria et al., 2016; Li et al., 2013). Il CanineCV non è ancora stato isolato in coltura cellulare.

Il Calicivirus felino (FCV), famiglia *Caliciviridae*, genere *Vesivirus*, è un virus piccolo, con capsidi icosaedrici, privo di envelope, a singolo filamento di RNA a polarità positiva (ssRNA+), il cui genoma contiene 3 ORFs (Radford et al., 2007). L'FCV è un agente patogeno altamente infettante con ampia diffusione nella popolazione felina mondiale che infetta gatti domestici e altri felidi

(Gaskell et al., 2012; Harrison et al., 2007). La principale fonte di trasmissione del virus è il contatto con gatti in fase acuta di infezione, che eliminano il virus tramite secrezioni oculari, nasali e orali (Gaskell et al., 2012). Dal punto di vista clinico, l'FCV viene considerato la causa più frequente, insieme all'Herpesvirus felino di tipo 1 (FHV-1), di infezioni respiratorie nel gatto (Gaskell et al., 2012). A seguito dell'infezione da FCV la maggior parte dei gatti sviluppa febbre, ulcerazioni orali e segni clinici del tratto respiratorio superiore come secrezione nasale e starnuti (Radford et al., 2009). Esistono però numerosi ceppi di FCV, che possono differire ampiamente in termini di tropismo e virulenza e di conseguenza causare un ampio ventaglio di sintomatologie; da infezioni asintomatiche a gravi forme cliniche sistemiche con elevata mortalità (Gaskell et al., 2012). Una particolare forma clinica, transitoria ed autolimitante, caratterizzata da febbre e zoppia, viene riportata sia in corso di infezioni acute, sia come complicanza vaccinale (Sykes, 2001). La diagnosi di infezione da FCV può essere effettuata mediante saggi di PCR qualitativa e quantitativa su campioni biologici (tamponi orofaringei, congiuntivali, nasali, e liquido sinoviale) previa retrotrascrizione dell'RNA virale in cDNA. Trattandosi di un virus con genoma a RNA, è normale aspettarsi che l'FCV mostri una notevole variabilità, sia come conseguenza della bassa affidabilità dell'RNA polimerasi-RNA dipendente, data dalla mancanza di un'attività di correzione degli errori in fase di replicazione (Domingo et al., 1997), sia come conseguenza delle ricombinazioni tra i genomi dei diversi ceppi di FCV durante la replicazione virale. I ceppi più immunogeni e cross-reattivi vengono utilizzati nell'allestimento dei vaccini che in molti casi si dimostrano efficaci nei confronti della forma clinica orale o delle alte vie aeree. Tuttavia la vaccinazione non è in grado di prevenire l'infezione né l'eliminazione del virus (Radford et al., 2009).

Il Canine Distemper Virus (CDV), famiglia *Paramixoviridae*, genere *Morbillivirus*, è l'agente eziologico responsabile del cimurro canino, una malattia infettiva del cane domestico a diffusione mondiale che può infettare anche i carnivori selvatici, rilevandosi letale nella maggior parte dei casi ed in particolar modo nei soggetti giovani (Greene e Vandeveld, 2012). I mustelidi sono molto suscettibili all'infezione da CDV e insieme ai canidi possono rappresentare i reservoir di infezione nella fauna selvatica (Philippa et al., 2008). Il CDV è un virus a RNA a singolo filamento a polarità negativa (ssRNA-) provvisto di capsidi elicoidale ed envelope (Greene e Vandeveld, 2012). La trasmissione del virus avviene principalmente per via diretta, attraverso l'inalazione o l'ingestione di secrezioni, escrezioni o aerosol (Wyllie et al., 2016). I sintomi clinici del cimurro variano in base alla virulenza del ceppo, alle condizioni ambientali, all'età e allo stato immunitario dell'ospite (Greene e Vandeveld, 2012). Nel cane, essi comprendono febbre, forme respiratorie, oculari, enteriche e cutanee, e disordini neurologici (Greene e Vandeveld, 2012). I mustelidi sviluppano segni clinici simili a quelli del cane che includono anoressia, secrezione oculo-nasale mucopurulenta, ipercheratosi

dermica multifocale, perdita di peso, diarrea intermittente, polmonite e morte improvvisa (Mos et al., 2003; Williams et al., 1988). La diagnosi di cimurro si basa sulla comparazione tra sintomatologia clinica e risultati dei test di laboratorio diretti e indiretti. Tra le metodiche diagnostiche dirette, la RT-PCR viene usata per individuare l'RNA virale in diversi campioni di tessuti e fluidi (siero, sangue intero, liquido cefalorachidiano, tamponi congiuntivali e nasali, cuscinetti plantari) (Kim et al., 2006; Frisk et al., 1999). La profilassi vaccinale rappresenta il sistema più efficace sia per prevenire l'insorgenza del cimurro nel cane, in quanto l'immunità che si instaura in seguito alla vaccinazione può persistere per anni (Greene e Vandeveld, 2012), sia per limitare la possibile trasmissione del virus ai carnivori selvatici.

Le specie batteriche appartenenti ai generi *Anaplasma* ed *Ehrlichia* (ordine *Rickettsiales*, famiglia *Anaplasmataceae*) rappresentano alcuni dei patogeni trasmessi da vettori biologici di interesse in medicina umana e in medicina veterinaria (Woldehiwet et al., 2010). Questi batteri sono gram-negativi, intracellulari obbligati che replicano nel citoplasma delle cellule eucariote (Dumler et al., 2001). In particolare, le specie *A. phagocytophilum*, *A. platys* ed *E. canis* assumono grande importanza in ambito veterinario in Europa. Durante l'infezione, esse formano colonie che prendono il nome di morule all'interno di monociti, granulociti e piastrine (Allison e Little, 2013). Il principale vettore biologico di *A. phagocytophilum* è rappresentato dalle zecche appartenenti al genere *Ixodes*, per cui la distribuzione mondiale del patogeno segue quella del vettore (Nicholson et al., 2010). Sono state descritte infezioni da *A. phagocytophilum* nell'uomo (Ruscio et al., 2003) e in animali domestici (Schäfer et al., 2022; De Arcangeli et al., 2018; Savidge et al., 2016; Heikkilä et al., 2010; Schaarschmidt-Kiener et al., 2009; Alberti et al., 2005; Bjöersdorff et al., 1999) e selvatici (Szewczyk et al., 2019; Carpi et al., 2009). I cani infetti da *A. phagocytophilum* possono sviluppare un ampio spettro di patologie, dalle forme subcliniche a forme cliniche caratterizzate da febbre, letargia, anoressia e trombocitopenia (Clark et al., 1996). Per arrivare ad una corretta diagnosi di infezione da *A. phagocytophilum* occorre integrare più metodiche diagnostiche dirette e indirette. Tra le metodiche diagnostiche dirette, la PCR rileva il DNA del patogeno in campioni di sangue periferico, midollo osseo o tessuto splenico e risulta essere una metodica ad elevata sensibilità e specificità (Allison e Little, 2013). Dal momento che non esiste un vaccino nei confronti dell'anaplasmosi e i vettori biologici rappresentano la principale via di trasmissione dell'infezione, è necessario attuare delle misure di prevenzione come l'applicazione di trattamenti antiparassitari negli animali domestici per limitare il rischio di trasmissione del patogeno ad altri animali e all'uomo. Nelle aree endemiche inoltre gli animali domestici donatori di sangue dovrebbero essere testati nei confronti dell'ehrlichiosi e dell'anaplasmosi per confermare la loro negatività in quanto un'altra via di trasmissione di queste infezioni è rappresentata dalle trasfusioni di sangue (Pennisi et al., 2017).

#### **I.IV Obiettivi della tesi**

Negli studi sperimentali che compongono questa tesi di dottorato sono state utilizzate differenti metodiche molecolari per la ricerca del DNA o RNA di agenti infettivi virali e batterici, allo scopo di valutarne la presenza e diffusione negli animali da compagnia e selvatici. I patogeni identificati sono stati inoltre caratterizzati geneticamente mediante sequenziamento ed analisi dell'intero genoma o di geni informativi, allo scopo di ottenere dati epidemiologici aggiornati sugli agenti infettivi che circolano in Italia e in altri Paesi europei. Gli studi sono stati svolti presso l'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Alma Mater Studiorum-Università di Bologna.

## I.V Bibliografia

- Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Pargaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(10):6418-22. doi: 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005.
- Allison RW, Little SE. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 2013; 42(2):127-44. doi: 10.1111/vcp.12040.
- Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec.* 2017; 180(22):542. doi: 10.1136/vr.103926.
- Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15(11):4593-602. doi: 10.1093/nar/15.11.4593.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5(2):209-19. doi: 10.1586/14737159.5.2.209.
- Balboni A. Adenoviridae. In: Scagliarini A, Battilani M, Ciulli S, Balboni A, Gallina L. *Manuale di Virologia Veterinaria.* 2013. Bononia University Press, Bologna, pp. 233-242.
- Balboni A, Dondi F, Prospero S, Battilani M. Development of a SYBR Green real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus type 1 and type 2. *J Virol Methods.* 2015; 222:34-40. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.05.009.
- Balboni A, Mollace C, Giunti M, Dondi F, Prospero S, Battilani M. Investigation of the presence of canine adenovirus (CADV) in owned dogs in Northern Italy. *Res Vet Sci.* 2014; 97(3):631-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.010.
- Balboni A, Verin R, Morandi F, Poli A, Prospero S, Battilani M. Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Vet Microbiol.* 2013; 162(2-4):551-557. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.015.
- Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol.* 2013; 530:67-74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.
- Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GM, Schipper D, Schapendonk CM, Bodewes R, Oldroyd L, Haagmans BL, Koopmans MM, Smits SL. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(7):1205-8. doi: 10.3201/eid2107.150228.
- Bjöersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis--a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J Small Anim Pract.* 1999; 40(1):20-4. doi: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03249.x.
- Bolón-Canedo V, Alonso-Betanzos A, López-de-Ullibarri I, Cao R. Challenges and future trends for microarray analysis. *Methods Mol Biol.* 2019; 1986:283-293. doi: 10.1007/978-1-4939-9442-7\_14.

- Bryan HM, Darimont CT, Paquet PC, Ellis JA, Goji N, Gouix M, Smits JE. Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. *Can J Vet Res.* 2011; 75(1):11-7.
- Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res.* 2007; 38(2):355-73. doi: 10.1051/vetres:2006058.
- Carpì G, Bertolotti L, Pecchioli E, Cagnacci F, Rizzoli A. *Anaplasma phagocytophilum* groEL gene heterogeneity in *Ixodes ricinus* larvae feeding on roe deer in Northeastern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(2):179-84. doi: 10.1089/vbz.2008.0068.
- Clark AM, Hopkins GF, MacLean IA. Tick-borne fever in dogs. *Vet Rec.* 1996; 139(11):268.
- Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, Clement T, Toohey-Kurth K. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest.* 2020; 32(6):767-775. doi: 10.1177/1040638720905833.
- Curtis KA, Niedzwiedz PL, Youngpairoj AS, Rudolph DL, Owen SM. Real-Time detection of HIV-2 by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(7):2674-6. doi: 10.1128/JCM.00935-14.
- De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis.* 2020; 56(1):239-242.
- De Arcangeli S, Balboni A, Serafini F, Battilani M, Dondi F. *Anaplasma phagocytophilum* infection in thrombocytopenic dogs. *Vet Ital.* 2018; 54(1):73-78. doi: 10.12834/VetIt.1070.5796.2.
- Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008; 38(4):799-814, viii. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.006.
- Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, Mari V, Buonavoglia C. Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci.* 2007; 83(2):269-73. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.11.009.
- Domingo E, Menéndez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. *Rev Med Virol.* 1997; 7(2):87-96. doi: 10.1002/(sici)1099-1654(199707)7:2<87::aid-rmv188>3.0.co;2-0.
- Dowgier G, Lahoreau J, Lanave G, Losurdo M, Varello K, Lucente MS, Ventriglia G, Bozzetta E, Martella V, Buonavoglia C, Decaro N. Sequential circulation of canine adenoviruses 1 and 2 in captive wild carnivores, France. *Vet Microbiol.* 2018; 221:67-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.05.025.
- Dowgier G, Mari V, Losurdo M, Larocca V, Colaianni ML, Cirone F, Lucente MS, Martella V, Buonavoglia C, Decaro N. A duplex real-time PCR assay based on TaqMan technology for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus types 1 and 2. *J Virol Methods.* 2016; 234:1-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.011.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and

- Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51(Pt 6):2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145.
- Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(11):3634-43. doi: 10.1128/JCM.37.11.3634-3643.1999.
- Gaskell RM, Dawson S, Radford AD. Feline respiratory disease. In: Greene CE. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, fourth ed. 2012. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 151-162.
- Goo NI, Kim DE. Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics. *Biochip J*. 2016; 10(4):262-271. doi: 10.1007/s13206-016-0402-6.
- Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019a; 2019(6). doi: 10.1101/pdb.top095109.
- Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019b; 2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182.
- Greene CE. Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. In Greene CE. (Ed.). *Infectious Disease of the Dog and Cat*, fourth ed. 2012. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 42-48.
- Greene CE, Decaro N. Canine viral enteritis. In: Greene CE. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, fourth ed. 2012. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 67-80.
- Greene CE, Vandeveld M. Canine distemper. In: Greene CE. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, fourth ed. 2012. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 25-42.
- Harrison TM, Sikarskie J, Kruger J, Wise A, Mullaney TP, Kiupel M, Maes RK. Systemic calicivirus epidemic in captive exotic felids. *J Zoo Wildl Med*. 2007; 38(2):292-9. doi: 10.1638/1042-7260(2007)038[0292:SCEICE]2.0.CO;2.
- He SL, Green R. Northern blotting. *Methods Enzymol*. 2013; 530:75-87. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00003-8.
- Heikkilä HM, Bondarenko A, Mihalkov A, Pfister K, Spillmann T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Vet Scand*. 2010; 52(1):62. doi: 10.1186/1751-0147-52-62.
- Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021; 82(11):801-811. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.
- Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet Res Commun*. 2001; 25(1):77-84. doi: 10.1023/a:1006417203856.
- Jensen E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014; 297(8):1349-53. doi: 10.1002/ar.22944.
- Kanagal-Shamanna R. Digital PCR: Principles and applications. *Methods Mol Biol*. 2016; 1392:43-50. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0\_5.

- Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol*. 2012; 86(12):7018. doi: 10.1128/JVI.00791-12.
- Kim D, Jeoung SY, Ahn SJ, Lee JH, Pak SI, Kwon HM. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J Vet Med Sci*. 2006; 68(8):877-9. doi: 10.1292/jvms.68.877.
- Kroczek RA. Southern and northern analysis. *J Chromatogr*. 1993; 618(1-2):133-45. doi: 10.1016/0378-4347(93)80031-x.
- Levy SE, Boone BE. Next-Generation Sequencing strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019; 9(7):a025791. doi: 10.1101/cshperspect.a025791.
- Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, Gaffney P, Dela Cruz FN Jr, Wang C, Delwart E, Pesavento PA. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(4):534-41. doi: 10.3201/eid1904.121390.
- Liu J, Nian QG, Li J, Hu Y, Li XF, Zhang Y, Deng YQ, Zhu SY, Zhu QY, Qin ED, Jiang T, Qin CF. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of novel avian influenza A (H7N9) virus. *BMC Microbiol*. 2014; 14:271. doi: 10.1186/s12866-014-0271-x.
- Manoj P. Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016; 27(1):742-6. doi: 10.3109/19401736.2014.913168.
- Markoulatos P, Sifakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002; 16(1):47-51. doi: 10.1002/jcla.2058.
- Millán J, López-Bao JV, García EJ, Oleaga Á, Llaneza L, Palacios V, de la Torre A, Rodríguez A, Dubovi EJ, Esperón F. Patterns of exposure of Iberian wolves (*Canis lupus*) to canine viruses in human-dominated landscapes. *Ecohealth*. 2016; 13(1):123-34. doi: 10.1007/s10393-015-1074-8.
- Miranda C, Santos N, Parrish C, Thompson G. Genetic characterization of canine parvovirus in sympatric free-ranging wild carnivores in Portugal. *J Wildl Dis*. 2017; 53(4):824-831. doi: 10.7589/2016-08-194.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289(1):150-4. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921.
- Mos L, Ross PS, McIntosh D, Raverty S. Canine distemper virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds. *Vet Rec*. 2003; 152(8):237-9. doi: 10.1136/vr.152.8.237.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987; 155:335-50. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51 Pt 1:263-73. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med (Auckl)*. 2016; 7:91-100. doi: 10.2147/VMRR.S80971.



- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015; 439:231-50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- Nelson B, Hebblewhite M, Ezenwa V, Shury T, Merrill EH, Paquet PC, Schmiegelow F, Seip D, Skinner G, Webb N. Prevalence of antibodies to canine parvovirus and distemper virus in wolves in the Canadian Rocky Mountains. *J Wildl Dis*. 2012; 48(1):68-76. doi: 10.7589/0090-3558-48.1.68.
- Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol*. 2010; 26(4):205-12. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.007.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
- Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(1):257-63. doi: 10.1128/JCM.42.1.257-263.2004.
- Pennisi MG, Hofmann-Lehmann R, Radford AD, Tasker S, Belák S, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Horzinek MC, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Thiry E, Truyen U, Möstl K. *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2017; 19(5):542-548. doi: 10.1177/1098612X17706462.
- Philippa J, Fournier-Chambrillon C, Fournier P, Schaftenaar W, van de Bildt M, van Herweijnen R, Kuiken T, Liabeuf M, Ditcharry S, Joubert L, Bégnier M, Osterhaus A. Serologic survey for selected viral pathogens in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other mustelids from south-western France. *J Wildl Dis*. 2008; 44(4):791-801. doi: 10.7589/0090-3558-44.4.791.
- Prittie J. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2004; 14(3):167-76. doi: 10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x.
- Radford AD, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2009; 11(7):556-64. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.004.
- Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline calicivirus. *Vet Res*. 2007; 38(2):319-35. doi: 10.1051/vetres:2006056.
- Reed AP, Jones EV, Miller TJ. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol*. 1988; 62(1):266-76. doi: 10.1128/JVI.62.1.266-276.1988.
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol*. 2017; 162(5):1447-1463. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.
- Ruscio M, Cinco M. Human granulocytic ehrlichiosis in Italy: first report on two confirmed cases. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 990:350-2. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07387.x.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Savidge C, Ewing P, Andrews J, Aucoin D, Lappin MR, Moroff S. *Anaplasma phagocytophilum* infection of domestic cats: 16 cases from the northeastern USA. J Feline Med Surg. 2016; 18(2):85-91. doi: 10.1177/1098612X15571148.
- Schaarschmidt-Kiener D, Graf F, von Loewenich FD, Müller W. *Anaplasma phagocytophilum* infektion bei einer katze in der Schweiz [*Anaplasma phagocytophilum* infection in a cat in Switzerland]. Schweiz Arch Tierheilkd. 2009; 151(7):336-41. German. doi: 10.1024/0036-7281.151.7.336.
- Schäfer I, Kohn B, Müller E. *Anaplasma phagocytophilum* in domestic cats from Germany, Austria and Switzerland and clinical/laboratory findings in 18 PCR-positive cats (2008-2020). J Feline Med Surg. 2022; 24(4):290-297. doi: 10.1177/1098612X211017459.
- Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing technologies. Curr Protoc Mol Biol. 2018; 122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59. PMID: 29851291; PMCID: PMC6020069.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature. 1986; 321(6071):674-9. doi: 10.1038/321674a0.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975; 98(3):503-17. doi: 10.1016/s0022-2836(75)80083-0.
- Sun ZF, Hu CQ, Ren CH, Shen Q. Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 2006; 131(1):41-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.07.011.
- Sykes JE. Feline upper respiratory tract pathogens: herpesvirus-1 and calicivirus. Compend Contin Educ Vet. 2001; 23(2), 166-175.
- Szewczyk T, Werszko J, Myczka AW, Laskowski Z, Karbowski G. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. Parasit Vectors. 2019; 12(1):465. doi: 10.1186/s13071-019-3734-y.
- Truyen U, Parrish CR. Feline panleukopenia virus: its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. Vet Microbiol. 2013; 165(1-2):29-32. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.005.
- Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. Virology. 1996; 215(2):186-9. doi: 10.1006/viro.1996.0021.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem. 2009; 55(4):641-58. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789.
- Williams ES, Thorne ET, Appel MJ, Belitsky DW. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. J Wildl Dis. 1988; 24(3):385-98. doi: 10.7589/0090-3558-24.3.385.
- Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol. 2010; 167(2-4):108-22. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.013.

- Wyllie SE, Kelman M, Ward MP. Epidemiology and clinical presentation of canine distemper disease in dogs and ferrets in Australia, 2006-2014. *Aust Vet J.* 2016; 94(7):215-22. doi: 10.1111/avj.12457.
- Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, Savini G, Di Sabatino D, Lorusso A. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology.* 2016; 490:69-74. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.007.
- Zeng Y, Zhang X, Nie K, Ding X, Ring BZ, Xu L, Dai L, Li X, Ren W, Shi L, Ma X. Rapid quantitative detection of Human immunodeficiency virus type 1 by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Gene.* 2014; 541(2):123-8. doi: 10.1016/j.gene.2014.03.015.



# STUDIO 1: USO INTEGRATO DI METODICHE MOLECOLARI PER LA RICERCA E LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI VIRUS A DNA IN UNA POPOLAZIONE DI LUPI ITALIANI

[Pubblicato su *Animals (Basel)* il 2021, doi: 10.3390/ani11082198]

## 1.1 Obiettivi dello studio

In questo studio sono state utilizzate differenti tecniche molecolari qualitative (end-point PCR e rolling circle amplification - RCA) e quantitative (real-time PCR) per la rilevazione e caratterizzazione genetica di virus a DNA (*Carnivore protoparvovirus 1*; adenovirus canino di tipo 1, CAdV-1; adenovirus canino di tipo 2, CAdV-2; e circovirus canino, CanineCV), nella popolazione di lupo appenninico (*Canis lupus italicus*) con lo scopo di indagare la presenza e la diffusione di questi virus nel lupo in Italia e di valutare le relazioni genetiche con i virus circolanti nei cani domestici.












## 1.2 Materiali e metodi

### 1.2.1 Disegno dello studio e campionamento

In questo studio sono stati inclusi lupi rinvenuti morti nell'appennino italiano nelle regioni Emilia-Romagna, Toscana e Calabria tra il 2017 e il 2019 e riferiti presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna o l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). Le carcasse degli animali rinvenuti sono state sottoposte a necropsia e sono stati prelevati campioni tissutali (lingua, intestino e milza) da ciascun soggetto. Le matrici biologiche sono state conservate a -80 °C presso i laboratori dell'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del DIMEVET, fino all'esecuzione delle prove di laboratorio. Sono stati raccolti i dati relativi al segnalamento (sesso, origine geografica e anno di campionamento) e l'età dei soggetti è stata determinata mediante la valutazione della dimensione corporea, del peso e dello sviluppo dei denti (Mörner et al., 2005). I lupi sono stati classificati come cuccioli (età  $\leq$  12 mesi), sub-adulti (età compresa tra 13 e 24 mesi), e adulti (età  $>$  24 mesi). La presenza di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAdV-1, CAdV-2 e CanineCV è stata rilevata usando specifici saggi molecolari quantitativi e il genoma completo o geni informativi dei virus identificati sono stati amplificati, sequenziati ed analizzati.

### 1.2.2 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA dai tessuti è stato utilizzato il kit Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania) (**Figura 1.1**). Gli estratti ottenuti sono stati conservati a -20 °C fino al momento di eseguire le metodiche di amplificazione del DNA target.

<b>1 Prepare sample</b>			Cut 25 mg into small pieces	
			180 µL T1	
<b>2 Pre-lyse sample</b>			25 µL Proteinase K	
			56 °C, 1–3 h	
<b>3 Lyse sample</b>			200 µL B3	
			70 °C, 10 min	
<b>4 Adjust DNA binding conditions</b>			210 µL 96–100% ethanol	
			Load all	
<b>5 Bind DNA</b>				
			11,000 x g, 1 min	
<b>6 Wash silica membrane</b>			1 <sup>st</sup> wash	500 µL BW
			2 <sup>nd</sup> wash	600 µL B5
	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup>			
			11,000 x g, 1 min	
<b>7 Dry silica membrane</b>				
			11,000 x g, 1 min	
<b>8 Elute highly pure DNA</b>			100 µL BE	
			RT, 1 min	
			11,000 x g, 1 min	

**Figura 1.1.** Schema di estrazione del DNA da tessuti (NucleoSpin Tissue Kit, Macherey-Nagel, Düren, Germania).

### 1.2.3 Screening di *Carnivore protoparvovirus 1*, *adenovirus canino di tipo 1 e 2*, e *circovirus canino*

Il rilevamento del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, *CAdV-1 e 2*, e *CanineCV* è stato eseguito con tre specifiche metodiche di SYBR Green real-time PCR in grado di rilevare e quantificare gli acidi nucleici dei differenti virus.

Le metodiche adottate sono state validate presso i laboratori INFLAB (De Arcangeli et al., 2020; Balboni et al., 2018; Balboni et al., 2015). Le reazioni sono state eseguite utilizzando il kit commerciale PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e la piattaforma StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La mix di reazione per le tre reazioni è riportata in **Tabella 1.1**.

**Tabella 1.1.** Mix di reazione adottate per l'amplificazione con real-time PCR del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-1, CAAdV-2 e CanineCV (PowerUp SYBR Green Master Mix Kit, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Componenti kit	Concentrazione iniziale	Volume di reazione <i>Carnivore protoparvovirus 1</i> , CAAdV-1 e CAAdV-2	Volume di reazione CanineCV	Concentrazione finale
Master mix	2X	10 µl	10 µl	1X
Primer forward	10 picomoli/µl	1.2 µl	0.6 µl	0.6 e 0.3 picomoli/µl
Primer reverse	10 picomoli/µl	1.2 µl	0.6 µl	0.6 e 0.3 picomoli/µl
DNA templatato	-	2 µl	2 µl	-
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	5.6 µl	6.8 µl	-
Volume finale	-	20 µl	20 µl	-

CAAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino.

Per la ricerca del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* sono stati testati gli estratti di DNA ottenuti da campioni di lingua e intestino usando un saggio di real-time PCR che amplifica un frammento di 99 nucleotidi del gene codificante per la principale proteina del capsido virale VP2 mediante la coppia di primer A-For e B-Rev (**Tabella 1.2**, Balboni et al., 2018).

Per la ricerca del DNA di CAAdV-1 e CAAdV-2 sono stati testati gli estratti di DNA ottenuti da campioni di lingua e milza usando un saggio di real-time PCR che amplifica un frammento di 166 nucleotidi del gene E3 mediante la coppia di primer CAAdV-qPCR-For3 e CAAdV-qPCR-Rev2 (**Tabella 1.2**), in grado di distinguere il tipo 1 dal tipo 2 sulla base dell'analisi della curva di melting (Balboni et al., 2015).

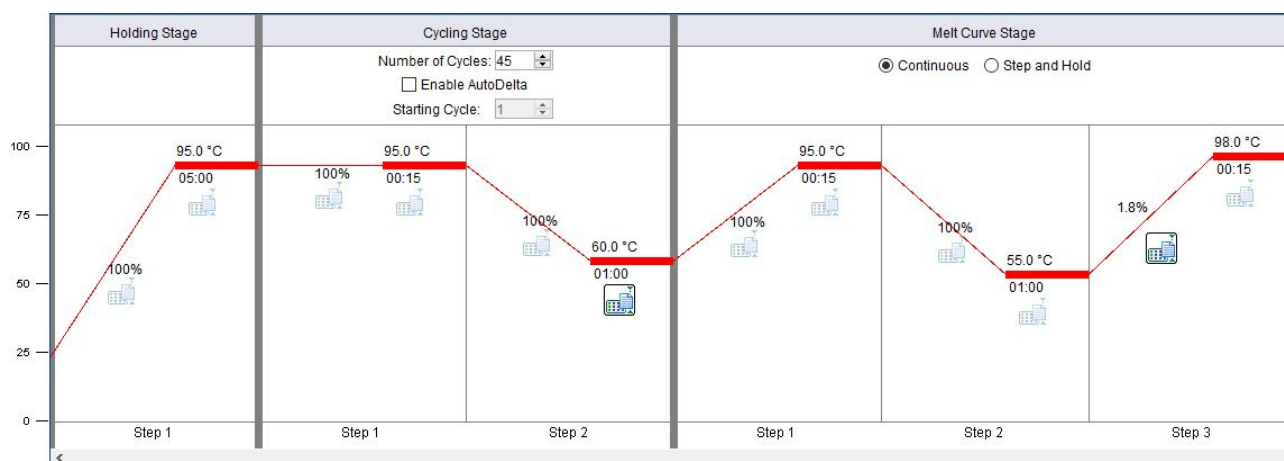
Per la ricerca del DNA di CanineCV sono stati testati gli estratti di DNA ottenuti da campioni di intestino e milza usando un saggio di real-time PCR che amplifica un frammento di 132 nucleotidi della regione intergenica (IR) mediante la coppia di primer CaCV-qPCR-For e CaCV-qPCR-Rev (**Tabella 1.2**, De Arcangeli et al., 2020).

**Tabella 1.2.** Primer utilizzati per l'amplificazione in real-time PCR del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-1, CAAdV-2, e CanineCV.

Patogeno	Primer	Sequenza del primer 5'-3'	Posizione	Amplificone (nts)
<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>	A-For	AGCTACTATTATGAGACCAGCTGAG	3767-3791	99
	B-Rev	CCTGCTGCAATAGGTGTTTTAA	3844-3865	
CAAdV-1 e CAAdV-2	CAAdV-qPCR-For3	CTGASACTGCWATRMCTATATAYATTTCCA	25600-25629 <sup>a</sup> 26305-26334 <sup>b</sup>	166
	CAAdV-qPCR-Rev2	GACATAGARACRCAGGACCCAGA	25743-25765 <sup>a</sup> 26448-26470 <sup>b</sup>	
CanineCV	CaCV-qPCR-For	CTGAAAGATAAAGGCCTCTCGCT	909-931	132
	CaCV-qPCR-Rev	AGGGGGGTGAACAGGTTAAACG	1020-1040	

La posizione dei primer utilizzati per amplificare il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* si riferisce alla sequenza nucleotidica del ceppo di referenza di FPV CU-4 (numero di accesso GenBank M38246, Parrish et al., 1991a). La posizione dei primer utilizzati per amplificare il CAAdV si riferisce alle sequenze nucleotidiche AC\_000003 per CAAdV-1 (Davison et al., 2003<sup>[a]</sup>) e AC\_000020 per CAAdV-2 (Davison et al., 2003<sup>[b]</sup>). La posizione dei primer utilizzati per amplificare il CanineCV si riferisce alla sequenza nucleotidica JQ821392 (Kapoor et al., 2012). CAAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino, nts: nucleotidi.

Il profilo termico, uguale per le tre metodiche, consisteva in una fase di denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti, a cui facevano seguito 45 cicli di reazione composti da una fase di denaturazione a 95 °C per 15 secondi ed una fase di annealing/estensione a 60 °C per 1 minuto. Al termine della fase di amplificazione è stata eseguita l'analisi della curva di melting mediante un progressivo incremento della temperatura da 55 a 98 °C per valutare la specificità della reazione (**Figura 1.2**). Il picco di melting specifico era di circa 81-82 °C per *Carnivore protoparvovirus 1*, di circa 73 °C e circa 80 °C rispettivamente per CA<sub>d</sub>V-1 e CA<sub>d</sub>V-2, e di circa 93 °C per CanineCV.



**Figura 1.2.** Ciclo di amplificazione utilizzato per le metodiche di real-time PCR.

Per ogni metodica di real-time PCR, la determinazione del numero di copie di DNA e l'efficienza della reazione sono state valutate sulla base di una curva di calibrazione ottenuta testando diluizioni seriali in base 10 di un plasmide ricombinante (plasmide pCR4, TOPO TA Cloning Kit, Life Technologies, USA) contenente una copia del target di amplificazione, partendo dalla concentrazione di  $10^7$  copie di DNA target/ $\mu$ l (copie/ $\mu$ l) di template ed arrivando a 0 copie/ $\mu$ l di template. La curva di taratura ottenuta rapportando il numero di copie plasmidiche ed il valore del ciclo soglia corrispondente (Ct), ha permesso di definire un limite di detection (LOD) delle reazioni sulla base della più alta diluizione del plasmide ricombinante che era possibile amplificare con una buona riproducibilità. Il LOD era pari a 1 copia/ $\mu$ l di template per *Carnivore protoparvovirus 1*, 10 copie/ $\mu$ l di template per CA<sub>d</sub>V-1 e CA<sub>d</sub>V-2 e di 5 copie/ $\mu$ l di template per CanineCV.

Le reazioni sono state eseguite testando in doppio almeno sei diluizioni scalari in base 10 dello standard plasmidico ed i campioni incogniti. Durante l'esecuzione delle reazioni, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nelle reazioni per escludere eventuali falsi positivi. I campioni sono stati considerati positivi quando entrambe le ripetizioni per ogni virus



mostravano un incremento esponenziale nella curva di fluorescenza, una quantità superiore al LOD ed una curva di melting specifica.

#### 1.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

I virus identificati sono stati caratterizzati geneticamente mediante amplificazione, sequenziamento ed analisi bioinformatica del genoma completo o di geni informativi.

Per il *Carnivore protoparvovirus 1* è stato amplificato un frammento del gene VP2 contenente i codoni codificanti per i residui aminoacidici 297, 300, 305, 323 e 426. L'amplificazione di questa porzione genica è stata effettuata mediante una metodica di semi-nested PCR usando i primer C-For, D-Rev ed E-Rev riportati in **Tabella 1.3** che generavano un primo prodotto di 881 nucleotidi (primer C-For e D-Rev) ed un secondo prodotto di 569 nucleotidi (primer C-For ed E-Rev), come riportato da Balboni e colleghi (2018).

**Tabella 1.3.** Primer utilizzati per l'amplificazione in end-point PCR del DNA virale di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-1, CAAdV-2, e CanineCV.

Patogeno	Primer	Sequenza del primer 5'-3'	Posizione	Amplificone (nts)
<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>	C-For (P3 <sup>a</sup> )	CCATTTCTAAATTCCTTG	3651-3668	C-D 881
	D-Rev (VPR <sup>evb</sup> )	TTTCTAGGTGCTAGTTGAG	4513-4531	
	E-Rev (P4 <sup>a</sup> )	AAGTCAGTATCAAATCTT	4201-4219	C-E 569
CAAdV-1 e CAAdV-2	CAAdV-Hexon-For1	GAAGTTTGCCGACCTGTC	16712-16730 <sup>c</sup> 16891-16909 <sup>d</sup>	CAAdV-1 2813
	CAAdV-Hexon-Rev1	ACTATGGCTCGCAGCTCTTC	19505-19524 <sup>c</sup> 19684-19703 <sup>d</sup>	CAAdV-2 2813
	CAAdV-Fiber-For1	ATGTGGTCTCTCCCRACAGC	25843-25862 <sup>c</sup> 26548-26567 <sup>d</sup>	CAAdV-1 1787
	CAAdV-Fiber-Rev1	ACTTTTCCTGAAGCGGYAG	27610-27629 <sup>c</sup> 28276-28295 <sup>d</sup>	CAAdV-2 1748
CanineCV	CaCV-For	CGTTTACCTGTTACCCCCCT	1020-1040	932
	CaCV-Rev	AGCGAGAGGCCTTATCTTTCAG	909-931	
	CaCV-3'-3'-For	ATGGTGGGATGGCTACGATG	606-625	936
	CaCV-3'-3'-Rev	CAAGGAAGAGGGAATGCTACAAG	1519-1541	

La posizione dei primer utilizzati per amplificare il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* si riferisce alla sequenza nucleotidica del ceppo di referenza di FPV CU-4 (numero di accesso GenBank M38246, Parrish et al., 1991a, Mochizuki et al., 1993<sup>[a]</sup>, Battilani et al., 2001<sup>[b]</sup>). La posizione dei primer utilizzati per amplificare il DNA di CAAdV si riferisce alle sequenze nucleotidiche aventi come codici di accesso GenBank AC\_000003 (Davison et al., 2003<sup>[c]</sup>) per CAAdV-1 e AC\_000020 (Davison et al., 2003<sup>[d]</sup>) per CAAdV-2. La posizione dei primer utilizzati per amplificare il DNA di CanineCV si riferisce alla sequenza nucleotidica avente come codice di accesso GenBank JQ821392 (Kapoor et al., 2012). CAAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino, nts: nucleotidi.

Per il CAAdV-1 e CAAdV-2 sono stati amplificati, con due differenti metodiche di end-point PCR, i geni Hexon e Fiber. Per l'amplificazione del gene Hexon è stata utilizzata la coppia di primer CAAdV-Hexon-For1 e CAAdV-Hexon-Rev1 (**Tabella 1.3**), mentre per l'amplificazione del gene Fiber è stata utilizzata la coppia di primer CAAdV-Fiber-For1 e CAAdV-Fiber-Rev1 (**Tabella 1.3**). Le due metodiche originavano ampliconi di 2813 nucleotidi per il gene Hexon di entrambi i virus e di 1787 e 1748 nucleotidi per il gene Fiber di CAAdV-1 e CAAdV-2, rispettivamente (Balboni et al., 2017).

Per CanineCV è stato amplificato il genoma completo mediante utilizzo integrato di RCA e end-point PCR (De Arcangeli et al., 2020). La RCA sfrutta una reazione enzimatica isoterma per amplificare molecole di DNA circolari ed è stata eseguita sui campioni risultati positivi in real-time PCR per incrementare la quantità di DNA virale utilizzando il kit Illustra TempliPhi 100 Amplification (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) secondo le istruzioni fornite dal produttore (**Tabella 1.4**). Il genoma completo è stato successivamente amplificato mediante due differenti metodiche di end-point PCR allestite rispettivamente con le coppie di primer CaCV-For - CaCV-Rev e CaCV-3'-3'-For - CaCV-3'-3'-Rev (**Tabella 1.3**, De Arcangeli et al., 2020). Le due reazioni producevano rispettivamente frammenti di 1932 e 936 nucleotidi.

**Tabella 1.4.** Mix e ciclo di reazione adottati per l'amplificazione tramite Rolling Circle Amplification (RCA) del DNA di CanineCV (Illustra TempliPhi 100 Amplification kit, GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

<b>Premix di reazione 1</b>			
<b>Componenti kit</b>	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Volume di reazione</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Sample BFR	-	10 µl	-
DNA template	-	5 µl	-
Volume finale	-	15 µl	-
<b>Ciclo di reazione</b>			
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo	
Incubazione	95 °C	3 min	
<b>Mix di reazione 2</b>			
TempliPhi Reaction BFR	-	10 µl	-
TempliPhi Enzyme Mix	-	0.4 µl	-
dNTP	2.5 mM	0.4 µl	0.09 mM
Volume finale	-	10.8 µl	-
<b>Ciclo di reazione</b>			
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo	
Incubazione	30 °C	16 h (o più)	
Inattivazione	65 °C	10 min	

Il protocollo di amplificazione prevedeva la preparazione di una prima mix contenente il DNA template, seguita da una breve fase di incubazione, ed una seconda mix, da unire alla prima mix, seguita da una incubazione overnight.

Ogni metodica di end-point PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente una DNA polimerasi proofreading ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mix di reazione, uguale per *Carnivore protoparvovirus 1*, CAdV-1 e CAdV-2, e CanineCV, è riportata in **Tabella 1.5** ed i cicli di amplificazione sono riportati nella **Figura 1.3 (A-E)**. Come controlli positivi nelle reazioni di amplificazione sono stati utilizzati: il ceppo CPV-2a/791/2014 (numero di accesso di Genbank: MK348096, Battilani et al., 2019) per *Carnivore protoparvovirus 1*, il ceppo 417-2013-L (numeri di accesso di Genbank: KP840546 e KP840547, Balboni et al., 2017) per CAdV-1 e CAdV-2 e il ceppo 73/2017 (numero di accesso di Genbank: MT180081, Urbani et al., 2021) per CanineCV. Durante l'esecuzione delle reazioni di amplificazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni

ed un bianco di reazione, costituito da acqua ultrapura per biologia molecolare, è stato aggiunto per escludere eventuali falsi positivi.

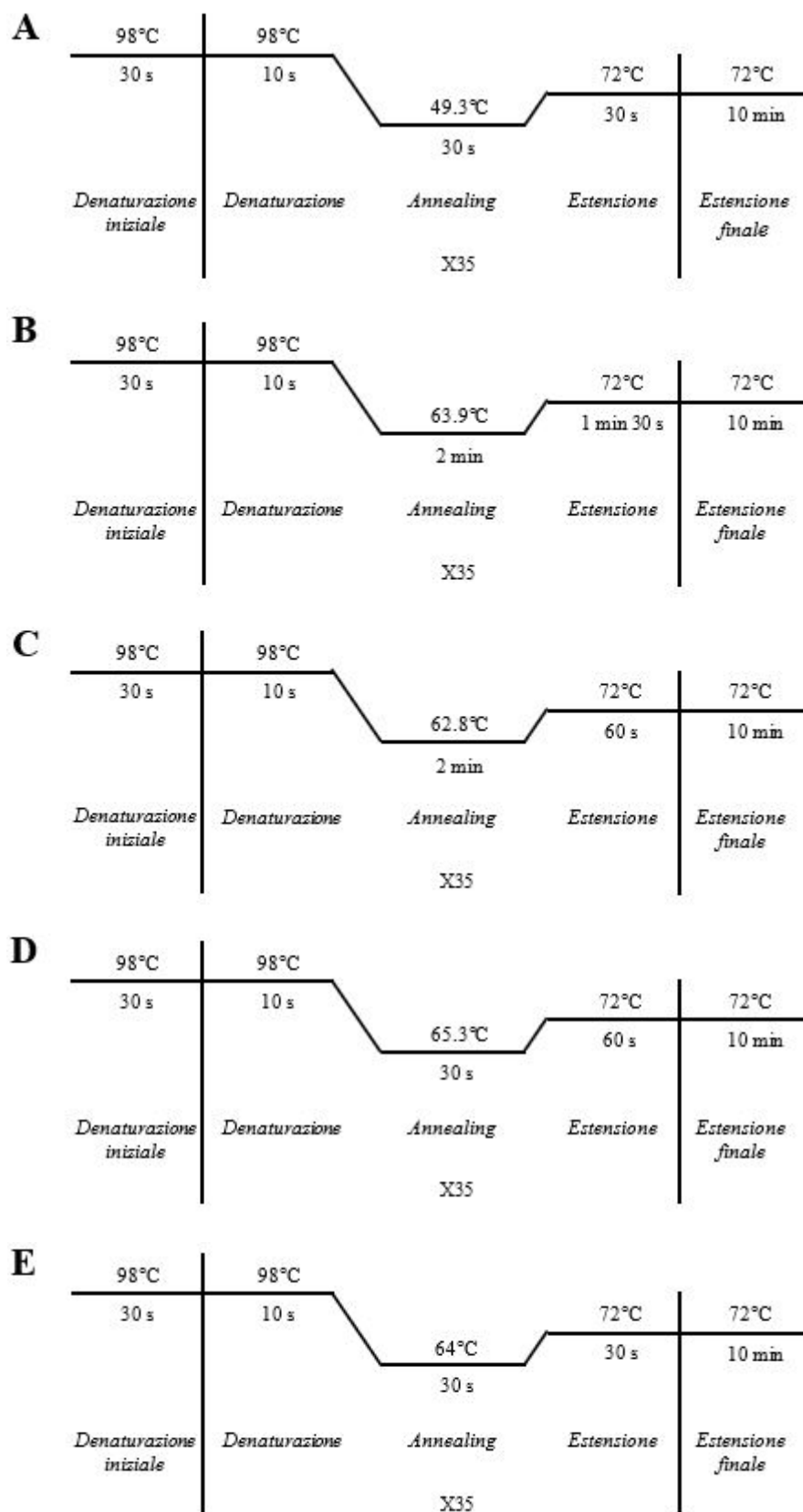
**Tabella 1.5.** Mix di reazione adottate per l'amplificazione in end-point PCR del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-1, CAAdV-2 e CanineCV (Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase kit, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Componenti kit	Concentrazione iniziale	Volume di reazione	Concentrazione finale
HF BFR	5X	10 µl	1X
dNTP	2.5 mM	4 µl	0.2 mM
Primer forward	20 picomoli/µl	1.25 µl	0.5 picomoli/µl
Primer reverse	20 picomoli/µl	1.25 µl	0.5 picomoli/µl
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	2 U/µl	0.5 µl	0.02 U/µl
DNA templat	-	5 µl	-
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	28 µl	-
Volume finale	-	50 µl	-

Al termine delle reazioni di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1-2% (p/v) addizionato con Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Chiyoda-ku, Tokyo, Giappone) in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp o 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione. Per il gene Hexon del CAAdV sono stati utilizzati anche due primer interni come riportato da Balboni e collaboratori (2017).

Le sequenze ottenute sono state assemblate, analizzate con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, data di accesso: 09/04/2021), allineate con sequenze di referenza presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, data di accesso: 12/04/2021, **Allegati 1.1, 1.2 e 1.3**) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche.



**Figura 1.3.** Cicli di amplificazione adottati per una porzione del gene VP2 di *Carnivore protoparvovirus 1* (A), per il gene Hexon del CA $\Delta$ V (B), per il gene Fiber del CA $\Delta$ V (C), per il tratto grande del genoma di CanineCV (D), e per il tratto piccolo del genoma di CanineCV (E).

L'analisi filogenetica è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). Per le sequenze di *Carnivore protoparvovirus 1* è stato costruito un albero filogenetico del gene parziale VP2 utilizzando il metodo Neighbor-Joining e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. Per le sequenze di CAAdV è stato costruito un albero filogenetico dei geni concatenati Hexon e Fiber utilizzando il metodo Maximum Likelihood e il modello Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con siti invariabili. Per le sequenze di CanineCV è stato costruito un albero filogenetico del genoma completo utilizzando il metodo Maximum Likelihood e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata utilizzando il test di bootstrap con 1000 ripetizioni dell'analisi.

### 1.3 Risultati

#### 1.3.1 Popolazione di studio

Durante il periodo di studio sono stati inclusi 23 lupi appenninici. I dati relativi al segnalamento e l'anno di campionamento degli animali sono riportati nella **Tabella 1.6**.

**Tabella 1.6.** Lupi inclusi nello studio e testati per *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV e CanineCV.

Variabili	Totale	<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>	CAAdV	CanineCV	Coinfezioni
Numero di lupi	23	21 (91.3)	4 (17.4)	11 (47.8)	11 (47.8)
Sesso					
Maschi	14 (60.9)	13	4	7	8
Femmine	9 (39.1)	8	0	4	3
Età (mesi)	24 [3-48]	24 [5-48]	30 [12-36]	24 [3-48]	24 [5-48]
Cuccioli ( $\leq 12$ )	10 (43.5)	8	1	5	4
Sub-adulti (13-24)	7 (30.4)	7	1	3	3
Adulti ( $>24$ )	6 (26.1)	6	2	3	4
Origine geografica					
Emilia Romagna	13 (56.5)	12	1	8	7
Toscana	8 (34.8)	7	1	2	2
Calabria	2 (8.7)	2	2	1	2
Anno di campionamento					
2017	6 (26.1)	4	1	5	4
2018	13 (56.5)	13	2	6	6
2019	4 (17.4)	4	1	0	1

I dati sono espressi come numero di lupi con i valori in percentuale tra parentesi tonde oppure come mediana (età) e range tra parentesi quadre. CAAdV: adenovirus canino, CanineCV: circovirus canino.

#### 1.3.2 Ricerca del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, adenovirus canino e circovirus canino

Ventuno su 23 (91.3%) lupi sono risultati positivi in real-time PCR per *Carnivore protoparvovirus 1* (**Tabella 1.6**), di cui 11 in entrambi gli organi testati (lingua e intestino), 5 solamente nella lingua e 5 solamente nell'intestino (**Tabella 1.7**). La quantità mediana di DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* rilevata era di  $7.3 \times 10^1$  copie/ $\mu$ l di estratto (range:  $1.4 \times 10^0$  -  $2.6 \times 10^4$ ).

Quattro su 23 (17.4%) lupi sono risultati positivi in real-time PCR per CAAdV (**Tabella 1.6**): due erano positivi per CAAdV-1 nei campioni di milza e due per CAAdV-2 nei campioni di lingua (**Tabella 1.7**). La quantità media di DNA di CAAdV-1 rilevata nei campioni di milza era di  $3.3 \times 10^4$  copie/ $\mu$ l di estratto (range:  $5 \times 10^1$  -  $6.6 \times 10^4$ ), mentre la quantità media di DNA di CAAdV-2 rilevata nei campioni di lingua era di  $1.1 \times 10^1$  copie/ $\mu$ l di estratto (range:  $1 \times 10^1$  -  $1.2 \times 10^1$ ).

Undici su 23 (47.8%) lupi sono risultati positivi in real-time PCR per CanineCV (**Tabella 1.6**), di cui 7 in entrambi gli organi analizzati (intestino e milza), mentre 1 era positivo solo nell'intestino e 3 solo nella milza (**Tabella 1.7**). La quantità mediana di DNA di CanineCV rilevata era di  $6.8 \times 10^2$  copie/ $\mu$ l di estratto (range:  $8.2 \times 10^0$  -  $3.7 \times 10^7$ ).

Ciascuno dei 23 lupi è risultato positivo ad almeno uno dei virus a DNA ricercati e 11 su 23 (47.8%) animali erano coinfecti (**Tabelle 1.6 e 1.7**): 9 erano positivi per due virus (otto per *Carnivore protoparvovirus 1* e CanineCV, e uno per *Carnivore protoparvovirus 1* e CAAdV-2), e 2 erano positivi per tre virus (uno per *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-2 e CanineCV; e uno per *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV-1 e CanineCV).

**Tabella 1.7.** Risultati dello screening per il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, CAAdV e CanineCV.

Lupo	<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>		CAAdV-1		CAAdV-2		CanineCV	
	Lingua	Intestino	Lingua	Milza	Lingua	Milza	Intestino	Milza
447/2017	-	-	-	-	-	-	P	P S
448/2017	P	-	-	-	-	-	-	P S
449/2017	-	P	-	-	-	-	P	P S
450/2017	P	P	-	-	-	-	P S	P
451/2017	P S	P	-	-	-	-	P	P
452/2017	-	-	-	P S	-	-	-	-
453/2018	P S	-	-	-	-	-	-	-
454/2018	P	P S	-	-	P	-	P S	P
455/2018	P	P	-	-	-	-	-	P
456/2018	-	P S	-	-	-	-	P	-
457/2018	P	P S	-	-	-	-	P S	P
458/2018	P	P S	-	-	-	-	P S	P
188/2018	P S	P	-	-	-	-	-	-
189/2018	P S	P	-	-	-	-	-	-
190/2018	-	P S	-	P	-	-	-	P
191/2018	P	-	-	-	-	-	-	-
193/2018	-	P S	-	-	-	-	-	-
194/2019	P	-	-	-	-	-	-	-
195/2018	P	P S	-	-	-	-	-	-
196/2018	-	P	-	-	-	-	-	-
197/2019	P	P S	-	-	-	-	-	-
198/2019	P S	-	-	-	P	-	-	-
199/2019	P	P	-	-	-	-	-	-

CAAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino, P: positivo, -: negativo, S: virus sequenziato.

### 1.3.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

Per 13 volpi risultate positive al *Carnivore protoparvovirus 1* è stata ottenuta la sequenza nucleotidica parziale del gene VP2 della lunghezza di 532 nucleotidi (GenBank ID: MW829208-MW829220,

**Tabella 1.7** e **Allegato 1.1**, da nucleotide 3669 a 4200 del ceppo di riferimento FPV CU-4, GenBank ID: M38246). L'analisi dei residui aminoacidici 297, 300, 305, 323 e 426 ha permesso di identificare 12 CPV-2b e un FPV (ID 198/2019) (Balboni et al., 2018, Buonavoglia et al., 2001, Truyen et al., 1996, Parrish et al., 1991b). Dall'allineamento nucleotidico è emerso che tutti i CPV-2b identificati in questo studio erano identici, ad eccezione del virus identificato nella volpe 457/2018 che mostrava una mutazione nucleotidica non sinonima, e tutti mostravano i due residui aminoacidici distintivi 371-glicina (Gly) e 418-treonina (Thr) rispetto ai ceppi di riferimento. L'analisi filogenetica ha mostrato che i CPV-2b identificati in questo studio erano correlati ai CPV-2b identificati nei cani e nei carnivori selvatici in Italia dal 2009 ad oggi, mentre l'unico FPV rilevato in questo studio era correlato con gli FPV identificati in gatti e felidi selvatici in Europa (**Figura 1.4**).

Una sequenza nucleotidica completa di 2718 nucleotidi di lunghezza del gene Hexon e una sequenza nucleotidica completa di 1632 nucleotidi di lunghezza del gene Fiber sono state ottenute per un CAdV-1 identificato nel presente studio nel campione di milza della volpe 452/2017 (GenBank ID: MW829199 e MW829200, **Tabella 1.7** e **Allegato 1.2**). Dall'allineamento dei geni Hexon e Fiber concatenati, il CAdV-1 identificato mostrava una identità nucleotidica del 99.6-99.9% con le sequenze di riferimento ed una identità aminoacidica del 100% con le sequenze di riferimento di CAdV-1 identificati in cani, volpi rosse e lupi da Italia e Francia (113-5L-L: KP840545 e KP840544, Balboni et al., 2013; 417-L: KP840547 e KP840546, Balboni et al., 2017; e Wolf/835/2015/FRA: MH048659, Dowgier et al., 2018). Nell'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche dei geni Hexon e Fiber concatenati, il CAdV-1 identificato in questo studio raggruppava con altri CAdV-1 identificati in canidi domestici e selvatici da Italia e Francia, caratterizzati dal residuo aminoacidico distintivo 388-serina (Ser) nella proteina Hexon (**Figura 1.5**). Questo cluster era suddiviso in due gruppi caratterizzati da differenti profili aminoacidici della proteina Fiber: uno formato dai virus con residui aminoacidici 23-prolina (Pro) e 110-aspartato (Asp), e l'altro dai residui 23-treonina (Thr) e 110-glutamato (Glu). Il CAdV-1 identificato in questo studio raggruppava con le sequenze del secondo cluster.

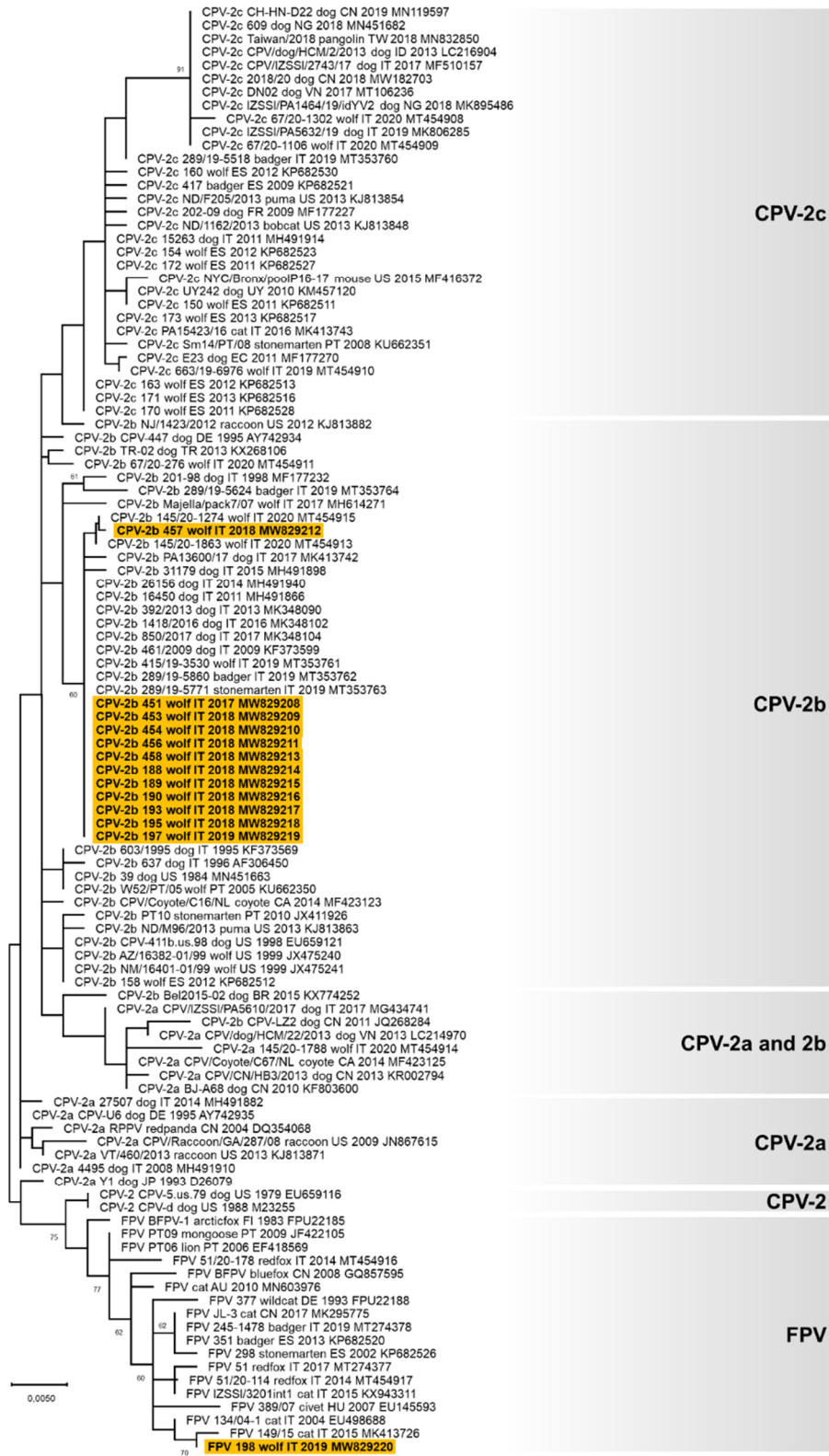
Per sette CanineCV identificati in questo studio è stato possibile ottenere sequenze del genoma completo di 2063 nucleotidi di lunghezza (GenBank ID: MW829201-MW829207, **Tabella 1.7** e **Allegato 1.3**). Il genoma di questi virus era strutturalmente sovrapponibile a quanto conosciuto per i CanineCV, che comprende due ORFs principali disposti, in direzione opposta, sui due filamenti complementari di un intermedio replicativo di DNA a doppio filamento (dsDNA): ORF1 (912 nucleotidi) localizzato sul filamento di DNA presente nel virione e codificante per una o più proteine associate alla replicazione (Rep, 303 aminoacidi) tradotte mediante splicing alternativo, e ORF2 (813 nucleotidi) disposto sul filamento di DNA complementare dell'intermedio replicativo e codificante

per la proteina del capsid (Cap, 270 aminoacidi). Tra le estremità 5' e 3' dei due principali ORFs sono presenti due regioni intergeniche non codificanti di 135 e 203 nucleotidi di lunghezza (Kapoor et al., 2012). La prima di queste due regioni non codificanti presenta una caratteristica sequenza di 9 nucleotidi (TAGTATTAC), che funge da origine (ori) del meccanismo replicativo a cerchio rotante (rolling circle replication); questa sequenza è localizzata all'apice di un segmento "ad ansa" (stem-loop) termodinamicamente stabile (Cheung, 2012).

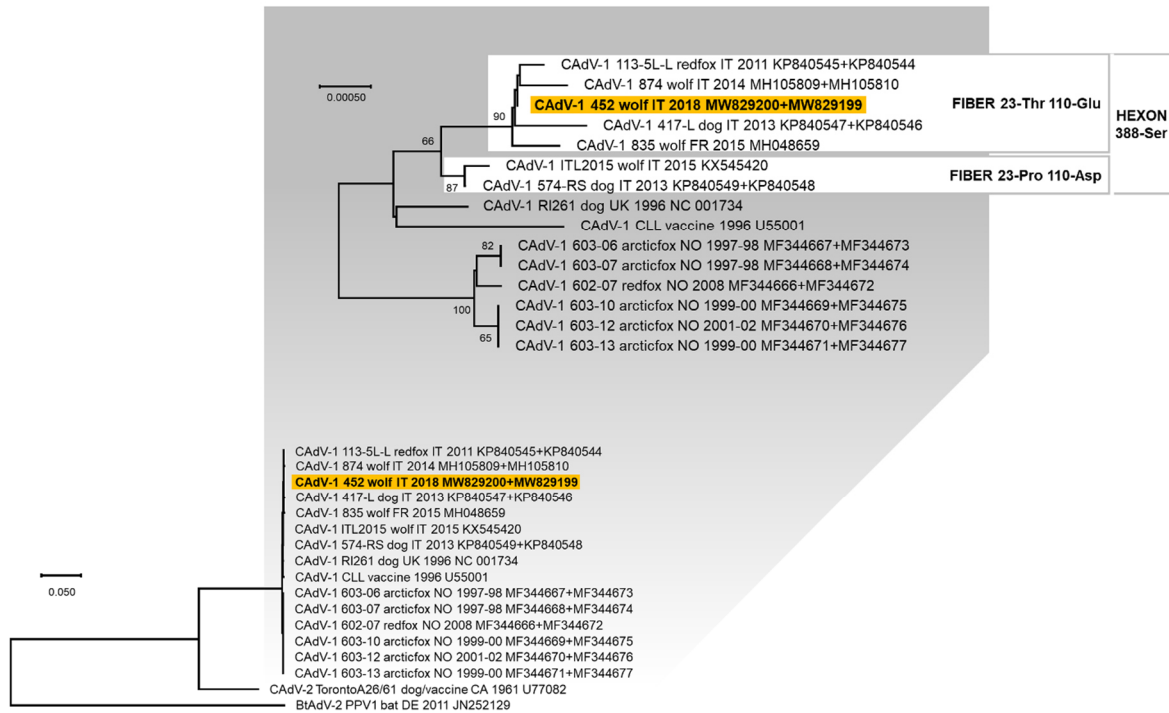
Sei dei CanineCV sequenziati avevano genoma identico e mostravano una identità nucleotidica dell'82.7% con il settimo CanineCV sequenziato (ID 449/2017). L'allineamento nucleotidico tra le sequenze di CanineCV ottenute in questo studio e i ceppi di referenza mostrava un'identità nucleotidica complessiva tra l'80.5% e il 100%. L'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del genoma completo mostrava un raggruppamento ben distinguibile dei CanineCV in 5 gruppi (**Figura 1.6**), come proposto in altri studi (Urbani et al., 2021; Niu et al., 2020). Brevemente, il gruppo 1 includeva i CanineCV identificati in cani, lupi e in un tasso in Europa, USA e Cina. I gruppi 2, 3 e 4 includevano i CanineCV identificati in cani in Asia, con l'eccezione del ceppo 09-10F/2011, che è stato identificato in una volpe rossa in Italia nel 2011 (GenBank ID: MH454599, De Arcangeli et al., 2020) e collocato nel gruppo 4. Il gruppo 5 era composto dai CanineCV identificati in volpi artiche norvegesi e volpi rosse in Norvegia e Gran Bretagna (Urbani et al., 2021; Bexton et al., 2015). Il ceppo 55590, identificato in una volpe rossa in Croazia nel 2014 (GenBank ID: KP941114, Lojkić et al., 2016), formava un lineage distinto all'interno del gruppo 5. La sequenza di CanineCV ottenuta da un cane in USA nel 2011 (GenBank ID: KC241983, Li et al., 2013) non raggruppava in nessuno dei 5 gruppi.

I sei CanineCV con genoma identico identificati in questo studio appartenevano al gruppo 1 con altri virus identificati in cani e lupi provenienti da tutto il mondo, mentre il CanineCV 449/2017 era incluso nel gruppo 5 con i virus identificati nelle volpi in Europa (**Figura 1.6**).

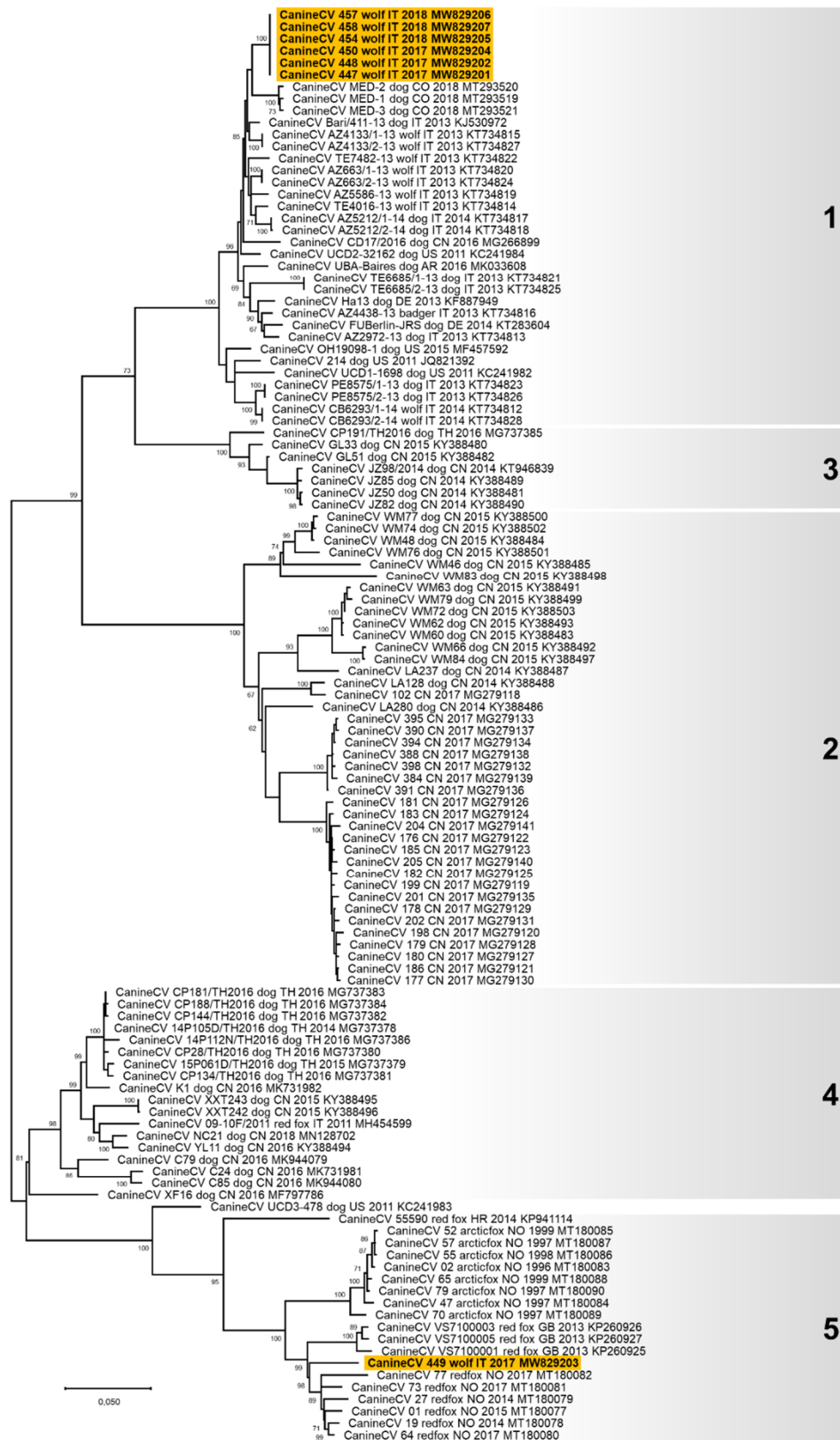




**Figura 1.4.** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche parziali del gene VP2 di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute in questo studio e di 96 ceppi di riferimento reperiti sul database GenBank (Allegato 1.1). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018), il metodo Neighbor-Joining e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. I valori di bootstrap, determinati su 1000 repliche, superiori al 60% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in giallo: sequenze di parvovirus canino di tipo 2, variante 2b (CPV-2b) e del virus della panleucopenia felina (FPV) generate in questo studio. In nero sulla destra della figura sono indicati i sei gruppi genetici evidenziati in questo studio.



**Figura 1.5.** Albero filogenetico radicato costruito con multiplo approccio genico (sequenze nucleotidiche dei geni Hexon e Fiber del CAAdV concatenati) con le sequenze di CAAdV ottenute in questo studio e di 16 ceppi di referenza reperiti sul database GenBank (**Allegato 1.2**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) e il metodo Maximum Likelihood. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con siti invariabili è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 60% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. In alto nella figura, una porzione ingrandita dell'albero ottenuto per visualizzare meglio le relazioni filogenetiche esistenti tra le sequenze nucleotidiche di CAAdV-1 e i valori di bootstrap. Per alcuni virus sono riportati due codici di accesso GenBank (rispettivamente le sequenze dei geni Hexon e Fiber). Evidenziate in giallo: sequenze nucleotidiche di CAAdV-1 generate in questo studio. Sono riportati i residui aminoacidici in posizione 388 per il gene Hexon e in posizione 23 e 110 per il gene Fiber.



**Figura 1.6.** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV ottenute in questo studio e di 113 ceppi di riferimento reperiti sul database GenBank (**Allegato 1.3**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018), il metodo Maximum Likelihood e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili. I valori di bootstrap, determinati su 1000 replicati, superiori al 60% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in giallo: sequenze nucleotidiche di CanineCV generate in questo studio. I numeri in nero a destra indicano i gruppi genetici.

## 1.4 Discussione

Le malattie infettive sono considerate una minaccia per i carnivori selvatici e la crescita della popolazione umana e il conseguente incremento degli animali domestici nei pressi delle aree protette aumenta le possibilità di trasmissione delle malattie tra specie animali (Daszak et al., 2000). Il contatto tra cani e lupi è testimoniato da eventi di predazione dei lupi sui cani, ma soprattutto di ibridazione, ovvero di riproduzione con nascita di una prole fertile e portatrice dei geni di entrambe le sottospecie (Hindrikson et al., 2012). L'obiettivo dello studio è stato di valutare la presenza e la diffusione nella popolazione di lupo appenninico di virus a DNA tra cui *Carnivore protoparvovirus 1*, CAdV e CanineCV. Obiettivo secondario è stato quello di caratterizzare geneticamente i virus identificati. Tali virus sono di notevole importanza in quanto in grado di infettare e causare malattia sia nei canidi domestici che nei selvatici. Per raggiungere gli obiettivi sono stati campionati gli organi di lupi deceduti in Emilia-Romagna, Toscana e Calabria tra il 2017 e il 2019, la presenza del DNA virale è stata indagata tramite metodiche molecolari e la caratterizzazione genetica dei virus identificati è stata effettuata mediante sequenziamento ed analisi di sequenza. Tutti i 23 lupi italiani testati erano positivi per almeno uno dei virus a DNA ricercati, e 11/23 (47.8%) erano coinfecti con due o tre virus, uno dei quali era sempre *Carnivore protoparvovirus 1*. Dieci dei 23 (43.5%) lupi testati sono risultati positivi per CPV-2 e CanineCV. In letteratura è stata riportata una frequenza più bassa (18.7%) di coinfezione tra CPV-2 e CanineCV nei cani (Dowgier et al., 2017). Altri autori hanno ipotizzato che l'infezione da CPV-2, che causa necrosi delle cripte delle cellule epiteliali e dei linfociti con successiva proliferazione di cellule epiteliali rigenerative e linfoblasti, fornisca le cellule target necessarie per la replicazione del CanineCV portando ad un peggioramento del quadro clinico (Thaiwong et al., 2016). Un'ipotesi alternativa sarebbe quella secondo cui l'infezione primaria da CanineCV nel cane può causare immunosoppressione favorendo l'infezione secondaria da CPV-2 (Thaiwong et al., 2016). Queste ipotesi potrebbero essere vere anche per i lupi. Inoltre, il CanineCV potrebbe incidere sul tasso di mortalità in cani con distruzione della mucosa intestinale in corso di infezione da CPV-2 (Anderson et al., 2017).

In questo studio, 21 su 23 (91.3%) lupi sono risultati positivi per il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*. In letteratura è stata riportata una frequenza di infezione paragonabile (97.6%) nei lupi in Portogallo (Rosa et al., 2020), mentre una frequenza più bassa è stata rilevata in campioni di tessuto di lupi provenienti dalla Spagna (67.6%, Calatayud et al., 2020) e dall'Italia (54.3%, Ndiana et al., 2021). Altri studi condotti in Europa hanno descritto una frequenza di infezione ancor più bassa utilizzando metodiche molecolari per rilevare il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*, dal 5% al 15.2% in lupi provenienti rispettivamente da Portogallo e Italia (Miranda et al., 2017; Molnar et al., 2014). L'elevata frequenza di infezione da *Carnivore protoparvovirus 1* rilevata nel nostro studio

potrebbe essere spiegata da numerose ragioni: (i) l'elevata sensibilità della real-time PCR in confronto alla PCR convenzionale ed ai test sierologici utilizzati in altri studi (Duarte et al., 2013); (ii) l'utilizzo di appropriate matrici biologiche, come la lingua, per l'esecuzione dei test molecolari in animali deceduti che vanno incontro ad alterazioni post-mortem (McKnight et al., 2007); e (iii) l'ampia popolazione di cani randagi non vaccinati presente nell'appennino italiano che aumenta il rischio di esposizione dei canidi selvatici ad agenti patogeni condivisi tra animali domestici e selvatici (Molnar et al., 2014). L'identificazione di *Carnivore protoparvovirus 1* in tutte le regioni italiane investigate nel nostro studio e in tutti gli anni di campionamento dimostra che questi virus circolano nella popolazione di lupi dell'appennino italiano, come precedentemente riportato in altri studi (Rosa et al., 2020; Molnar et al., 2014).

Dodici dei 13 parvovirus sequenziati erano CPV-2b e mostravano due residui aminoacidici distintivi nel gene VP2: 371-Gly e 418-Thr. CPV-2b con analoghi residui nella proteina VP2 sono stati riportati in cani in Italia dal 2008 (Battilani et al., 2019; Tucciarone et al., 2018; Dei Giudici et al., 2017) e più recentemente nei selvatici (Ndiana et al., 2021). La circolazione negli ospiti sensibili e la trasmissione dal domestico al selvatico supportano l'ipotesi che questo profilo aminoacidico distintivo possa aver determinato un vantaggio evolutivo a questi CPV-2b. Nel nostro studio è stato inoltre rilevato un virus FPV-like in un lupo. Una ricerca condotta in Italia tra il 2014 e il 2020 non ha rilevato virus FPV-like nei lupi (Ndiana et al., 2021), mentre sono stati riportati in volpi rosse e tassi (Ndiana et al., 2021; Duarte et al., 2013). Per conoscenza degli autori, questo è il primo studio che riporta il rilevamento di virus FPV-like nel lupo, anche se virus FPV-like sono già stati rilevati nei carnivori selvatici e si suppone che possano rappresentare intermedi evolutivi dei protoparvovirus in natura (Allison et al., 2013).

Quattro dei 23 (17.4%) lupi sono risultati positivi al DNA di CAdV. Due lupi erano positivi al CAdV-1 ed ulteriori studi sono necessari per valutare il ruolo che questi ospiti possono svolgere per la circolazione di CAdV-1 in natura, costituendo un rischio per gli animali non vaccinati, come eventuale fonte di infezione per il cane domestico o come ospiti accidentali (Oleaga et al., 2022). Una frequenza di infezione da CAdV-1 più elevata nei lupi è stata riportata in Spagna da Oleaga e colleghi (2022) (14.1%) e da Millán e colleghi (2016) (70.3%). La grande variabilità di frequenza di infezione riportata in letteratura potrebbe essere spiegata da una circolazione non omogenea del virus in differenti aree geografiche investigate, come riportato nelle volpi rosse (Verin et al., 2019). L'analisi filogenetica ha mostrato che l'unico CAdV-1 sequenziato in questo studio (452/2017) raggruppava con tutti i CAdV-1 identificati in Italia e Francia che mostravano il residuo 388-Ser nella proteina Hexon, a conferma del fatto che questa posizione aminoacidica della proteina Hexon permette di differenziare virus appartenenti a differenti aree geografiche (Balboni et al., 2019a; Balboni et al.,

2019b; Balboni et al., 2017). Inoltre, è stato possibile distinguere i CAAdV-1 identificati in Italia in due gruppi sulla base dei codoni 23 e 110 della proteina Fiber (Balboni et al., 2019a; Dowgier et al., 2018). Due lupi sono risultati positivi al DNA di CAAdV-2 in campioni di lingua, a dimostrazione del fatto che questa matrice biologica risulta essere adatta per il rilevamento del CAAdV-2 che ha tropismo per le vie aeree superiori. Entrambi i lupi risultati positivi al CAAdV-2 nel nostro studio provenivano dalla regione Calabria, a conferma della circolazione del virus nei lupi in Italia meridionale (Di Francesco et al., 2019), ma la scarsa quantità di DNA virale rilevata non ne ha consentito il sequenziamento. L'infezione da CAAdV-2 è stata anche riportata in lupi provenienti dall'Italia settentrionale e dalla Spagna (Melegari et al., 2018; Millán et al., 2016), ma la sua reale diffusione geografica ed il suo ruolo patogenetico sono ad oggi poco noti.

Undici dei 23 (47.8%) lupi sono risultati positivi per il DNA di CanineCV. In letteratura è presente un solo studio finalizzato alla ricerca di questo patogeno nei lupi in Italia in cui è stata rilevata una frequenza di infezione più bassa (26.4%) (Zaccaria et al., 2016). Questi risultati confermano che l'infezione da CanineCV non è ristretta solamente al cane (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Hsu et al., 2016), ma ha uno spettro d'ospite più ampio che coinvolge anche gli animali selvatici (Urbani et al., 2021; De Arcangeli et al., 2020; Zaccaria et al., 2019; Bexton et al., 2015). Dall'analisi di sequenza effettuata sul genoma virale completo, i CanineCV identificati in questo studio appartenevano ad un'unica specie virale che infetta i cani, le volpi, i lupi, e i tassi, mostrando una identità nucleotidica >80%, che rappresenta la soglia che delimita l'appartenenza ad una medesima specie all'interno della famiglia *Circoviridae* (Breitbart et al., 2017; Rosario et al., 2017). Tutti i CanineCV identificati e sequenziati in questo studio, eccetto il CanineCV 449/2017, erano strettamente correlati ai virus identificati in cani e lupi in tutto il mondo, a supporto dell'ipotesi di una probabile trasmissione dell'infezione da circovirus tra carnivori domestici e selvatici, ma il ruolo patogenetico di questo virus negli animali selvatici non è ancora chiaro e sono necessari maggiori approfondimenti in merito. Al contrario, il CanineCV 449/2017 raggruppava con i virus identificati solamente nelle volpi, a dimostrazione del fatto che non tutti i CanineCV che infettano le volpi raggruppano in un cluster distinto come precedentemente riportato da Zaccaria e colleghi (2016) e che non sembra esistere una specie-specificità per i CanineCV che infettano le volpi, come precedentemente dimostrato da De Arcangeli e colleghi (2020).

Il nostro studio presenta alcuni limiti. Prima di tutto, il numero ridotto dei soggetti inclusi nello studio rende i dati ottenuti poco rappresentativi dell'intera popolazione appenninica. Ciò è stato dovuto a difficoltà nel campionamento di specie animali protette, principalmente all'impossibilità di recuperare tutte le carcasse dei soggetti deceduti. In aggiunta, sono stati ricercati solamente i virus a DNA e pertanto non è stato possibile riscontrare eventuali coinfezioni con virus a RNA, come il

coronavirus canino o il virus del cimurro. La scelta di focalizzare lo screening nei confronti di virus a DNA è dovuta alle condizioni di conservazione degli organi testati, dal momento che lo stato di decomposizione di alcuni soggetti avrebbe potuto determinare la degradazione dell'RNA virale alterando di conseguenza l'attendibilità dei risultati.

## **1.5 Conclusione**

In questo studio sono riportati nuovi dati sulla presenza di virus a DNA e sulle coinfezioni virali nella popolazione di lupi in Italia, a dimostrazione del fatto che c'è un'attiva circolazione virale. La caratterizzazione genetica dei virus identificati dimostra che gli stessi virus infettano sia il lupo che il cane domestico. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per capire se questi patogeni possono essere trasmessi tra le due specie. L'elevata frequenza di rilevamento e la diversità dei patogeni virali identificati conferma il ruolo epidemiologico dei lupi come ospiti di agenti infettivi virali, e allo stesso tempo la pressione che i patogeni esercitano sullo stato di salute degli animali selvatici. I dati ottenuti sottolineano che i carnivori selvatici possono fungere da serbatoi di agenti infettivi e pertanto risulta di fondamentale importanza la corretta gestione dei cani, più semplici da controllare e gestire rispetto alle popolazioni selvatiche, allo scopo di ridurre la potenziale trasmissione dei patogeni agli animali selvatici e viceversa. In particolare, è necessaria una maggiore responsabilità e consapevolezza sia da parte dei proprietari, per il controllo degli spostamenti dei propri animali, la raccolta delle deiezioni e la corretta esecuzione dei protocolli vaccinali, sia da parte dei Comuni, per evitare che vi siano cani randagi e/o inselvaticiti.

## 1.6 Bibliografia

- Allison AB, Kohler DJ, Fox KA, Brown JD, Gerhold RW, Shearn-Bochsler VI, Dubovi EJ, Parrish CR, Holmes EC. Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. *J Virol*. 2013; 87(4):2342-7. doi: 10.1128/JVI.02428-12.
- Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec*. 2017; 180(22):542. doi: 10.1136/vr.103926.
- Balboni A, Musto C, Kaehler E, Verin R, Caniglia R, Fabbri E, Carra E, Cotti C, Battilani M, Delogu M. Genetic characterization of canine adenovirus type 1 detected by real-time polymerase chain reaction in an oral sample of an Italian wolf (*Canis Lupus*). *J Wildl Dis*. 2019a; 55(3):737-741.
- Balboni A, Tryland M, Mørk T, Killengreen ST, Fuglei E, Battilani M. Unique genetic features of canine adenovirus type 1 (CAV-1) infecting red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway and arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard. *Vet Res Commun*. 2019b; 43(2):67-76. doi: 10.1007/s11259-019-09746-y.
- Balboni A, Bassi F, De Arcangeli S, Zobba R, Dedola C, Alberti A, Battilani M. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. *BMC Vet Res*. 2018; 14(1):41. doi: 10.1186/s12917-018-1356-9.
- Balboni A, Dondi F, Agnoli C, Verin R, Gruarin M, Morini M, Battilani M. Novel sequence variants of viral hexon and fibre genes in two dogs with canine adenovirus type 1-associated disease. *Vet J*. 2017; 223:73-75. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.05.011.
- Balboni A, Dondi F, Prosperi S, Battilani M. Development of a SYBR Green real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus type 1 and type 2. *J Virol Methods*. 2015; 222:34-40. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.05.009.
- Balboni A, Verin R, Morandi F, Poli A, Prosperi S, Battilani M. Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Vet Microbiol*. 2013; 162(2-4):551-557. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.015.
- Battilani M, Modugno F, Mira F, Purpari G, Di Bella S, Guercio A, Balboni A. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Italy from 1994 to 2017: recurrence of the CPV-2b variant. *BMC Vet Res*. 2019; 15(1):393. doi: 10.1186/s12917-019-2096-1.
- Battilani M, Scagliarini A, Tisato E, Turilli C, Jacoboni I, Casadio R, Prosperi S. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J Gen Virol*. 2001; 82(Pt 7):1555-1560. doi: 10.1099/0022-1317-82-7-1555.
- Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GM, Schipper D, Schapendonk CM, Bodewes R, Oldroyd L, Haagmans BL, Koopmans MM, Smits SL. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(7):1205-8. doi: 10.3201/eid2107.150228.
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, Ictv Report Consortium. ICTV Virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol*. 2017; 98(8):1997-1998. doi: 10.1099/jgv.0.000871.



- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol*. 2001; 82(Pt 12):3021-3025. doi: 10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Calatayud O, Esperón F, Velarde R, Oleaga Á, Llana L, Ribas A, Negre N, de la Torre A, Rodríguez A, Millán J. Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. *Transbound Emerg Dis*. 2020; 67(2):626-634. doi: 10.1111/tbed.13378.
- Cheung AK. Porcine circovirus: transcription and DNA replication. *Virus Res*. 2012; 164(1-2):46-53. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.012.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000; 287(5452):443-9. doi: 10.1126/science.287.5452.443.
- Davison AJ, Benkő M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2003; 84(Pt 11):2895-2908. doi: 10.1099/vir.0.19497-0.
- De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis*. 2020; 56(1):239-242.
- Dei Giudici S, Cubeddu T, Giagu A, Sanna G, Rocca S, Oggiano A. First molecular characterization of canine parvovirus strains in Sardinia, Italy. *Arch Virol*. 2017; 162(11):3481-3486. doi: 10.1007/s00705-017-3457-3.
- Di Francesco CE, Smoglica C, Paoletti B, Angelucci S, Innocenti M, Antonucci A, Di Domenico G, Marsilio F. Detection of selected pathogens in Apennine wolf (*Canis lupus italicus*) by a non-invasive GPS-based telemetry sampling of two packs from Majella National Park, Italy. *Eur J Wildl Res*. 2019; 65(6):84. doi: 10.1007/s10344-019-1326-y.
- Dowgier G, Lahoreau J, Lanave G, Losurdo M, Varello K, Lucente MS, Ventriglia G, Bozzetta E, Martella V, Buonavoglia C, Decaro N. Sequential circulation of canine adenoviruses 1 and 2 in captive wild carnivores, France. *Vet Microbiol*. 2018; 221:67-73. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.05.025.
- Dowgier G, Lorusso E, Decaro N, Desario C, Mari V, Lucente MS, Lanave G, Buonavoglia C, Elia G. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol*. 2017; 204:54-58. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.007.
- Duarte MD, Henriques AM, Barros SC, Fagulha T, Mendonça P, Carvalho P, Monteiro M, Fevereiro M, Basto MP, Rosalino LM, Barros T, Bandeira V, Fonseca C, Cunha MV. Snapshot of viral infections in wild carnivores reveals ubiquity of parvovirus and susceptibility of Egyptian mongoose to feline panleukopenia virus. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59399. doi: 10.1371/journal.pone.0059399.
- Hindrikson M, Männil P, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U. Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46465. doi: 10.1371/journal.pone.0046465.

- Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, Lin CN. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res.* 2016; 12(1):116. doi: 10.1186/s12917-016-0722-8.
- Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol.* 2012; 86(12):7018. doi: 10.1128/JVI.00791-12.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, Gaffney P, Dela Cruz FN Jr, Wang C, Delwart E, Pesavento PA. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(4):534-41. doi: 10.3201/eid1904.121390.
- Lojkić I, Biđin M, Prpić J, Šimić I, Krešić N, Bedeković T. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 45:10-5. doi: 10.1016/j.cimid.2016.01.005.
- McKnight CA, Maes RK, Wise AG, Kiupel M. Evaluation of tongue as a complementary sample for the diagnosis of parvoviral infection in dogs and cats. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19(4):409-13. doi: 10.1177/104063870701900413.
- Melegari I, Sarchese V, Di Profio F, Robetto S, Carella E, Bermudez Sanchez S, Orusa R, Martella V, Marsilio F, Di Martino B. First molecular identification of kobuviruses in wolves (*Canis lupus*) in Italy. *Arch Virol.* 2018; 163(2):509-513. doi: 10.1007/s00705-017-3637-1.
- Millán J, López-Bao JV, García EJ, Oleaga Á, Llaneza L, Palacios V, de la Torre A, Rodríguez A, Dubovi EJ, Esperón F. Patterns of exposure of Iberian Wolves (*Canis lupus*) to canine viruses in human-dominated landscapes. *Ecohealth.* 2016; 13(1):123-34. doi: 10.1007/s10393-015-1074-8.
- Miranda C, Santos N, Parrish C, Thompson G. Genetic characterization of canine parvovirus in sympatric free-ranging wild carnivores in Portugal. *J Wildl Dis.* 2017; 53(4):824-831. doi: 10.7589/2016-08-194.
- Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.* 1993; 55(1):60-3. doi: 10.1016/0034-5288(93)90035-e.
- Molnar B, Duchamp C, Möstl K, Diehl PA, Betschart B. Comparative survey of canine parvovirus, canine distemper virus and canine enteric coronavirus infection in free-ranging wolves of central Italy and south-eastern France. *Eur J Wildl Res.* 2014; 60(4):613-624. doi: 10.1007/s10344-014-0825-0.
- Mörner T, Eriksson H, Bröjer C, Nilsson K, Uhlhorn H, Agren E, af Segerstad CH, Jansson DS, Gavner-Widén D. Diseases and mortality in free-ranging brown bear (*Ursus arctos*), gray wolf (*Canis lupus*), and wolverine (*Gulo gulo*) in Sweden. *J Wildl Dis.* 2005; 41(2):298-303. doi: 10.7589/0090-3558-41.2.298.
- Ndiana LA, Lanave G, Desario C, Berjaoui S, Alfano F, Puglia I, Fusco G, Colaianni ML, Vincifori G, Camarda A, Parisi A, Sgroi G, Elia G, Veneziano V, Buonavoglia C, Decaro N. Circulation of diverse protoparvoviruses in wild carnivores, Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(4):2489-2502. doi: 10.1111/tbed.13917.

- Niu L, Wang Z, Zhao L, Wang Y, Cui X, Shi Y, Chen H, Ge J. Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014-2016. *Arch Virol.* 2020; 165(1):137-143. doi: 10.1007/s00705-019-04433-4.
- Oleaga A, Balseiro A, Espí A, Royo LJ. Wolf (*Canis lupus*) as canine adenovirus type 1 (CAV-1) sentinel for the endangered cantabrian brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Transbound Emerg Dis.* 2022; 69(2):516-523. doi: 10.1111/tbed.14010.
- Parrish CR. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology.* 1991a; 183(1):195-205. doi: 10.1016/0042-6822(91)90132-u.
- Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991b; 65(12):6544-52. doi: 10.1128/JVI.65.12.6544-6552.1991.
- Rosa GM, Santos N, Grøndahl-Rosado R, Fonseca FP, Tavares L, Neto I, Cartaxeiro C, Duarte A. Unveiling patterns of viral pathogen infection in free-ranging carnivores of northern Portugal using a complementary methodological approach. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2020; 69:101432. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101432.
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol.* 2017; 162(5):1447-1463. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.
- Thaiwong T, Wise AG, Maes RK, Mullaney T, Kiupel M. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Vet Pathol.* 2016; 53(6):1204-1209. doi: 10.1177/0300985816646430.
- Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology.* 1996; 215(2):186-9. doi: 10.1006/viro.1996.0021.
- Tucciarone CM, Franzo G, Mazzetto E, Legnardi M, Cadin M, Furlanello T, Cecchinato M, Drigo M. Molecular insight into Italian canine parvovirus heterogeneity and comparison with the worldwide scenario. *Infect Genet Evol.* 2018; 66:171-179. doi: 10.1016/j.meegid.2018.09.021.
- Urbani L, Tryland M, Ehrich D, Fuglei E, Battilani M, Balboni A. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Norway. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(3):1283-1293. doi: 10.1111/tbed.13783.
- Verin R, Forzan M, Schulze C, Rocchigiani G, Balboni A, Poli A, Mazzei M. Multicentric molecular and pathologic study on canine adenovirus type 1 in red foxes (*Vulpes vulpes*) in three European countries. *J Wildl Dis.* 2019 Oct;55(4):935-939.
- Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, Savini G, Di Sabatino D, Lorusso A. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology.* 2016; 490:69-74. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.007.



## **STUDIO 2: CIRCOVIRUS CANINO E ADENOVIRUS CANINO DI TIPO 1 E 2 IN CANI CON PARVOVIROSI**

[Pubblicato su *Veterinary Research Communications* il 2022, doi: 10.1007/s11259-021-09850-y]

### **2.1 Obiettivi dello studio**

Gli obiettivi di questo studio erano i) investigare la frequenza di coinfezioni sostenute da circovirus canino (CanineCV) e adenovirus canino di tipo 1 (CAAdV-1) e 2 (CAAdV-2) in cani con sintomatologia gastroenterica e risultati positivi al DNA di parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2); ii) valutare se le coinfezioni erano correlate con la variante antigenica del CPV-2, con i dati di segnalamento e la prognosi; iii) caratterizzare geneticamente i virus identificati.

### **2.2 Materiali e metodi**

#### *2.2.1 Disegno dello studio, criteri di inclusione e campionamento*

Per raggiungere gli obiettivi dello studio, sono stati retrospettivamente selezionati i campioni biologici di cani con sintomatologia gastroenterica riferibile all'infezione da parvovirosi pervenuti a scopo diagnostico presso l'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna dal 1994 al 2017. La diagnosi definitiva di parvovirosi è stata effettuata sulla base del rilevamento di segni clinici riconducibili a enterite come anoressia o letargia, diarrea da mucoide a emorragica, vomito, disidratazione e ipertermia (Mylonakis et al., 2016), e mediante ricerca del DNA di CPV-2 tramite metodiche molecolari (Mochizuki et al., 1993) effettuate su campioni di feci o intestino. In alcuni casi, il CPV-2 era stato isolato in coltura cellulare mediante inoculazione di sospensione fecale. Per questi campioni, non essendo più disponibile la matrice biologica originale, si è proceduto testando il surnatante cellulare. I campioni sono stati testati e gli estratti di DNA sono stati stoccati dopo l'attività diagnostica di routine presso i laboratori del CLINLAB. Sono stati inclusi nello studio solamente i cani per i quali il gene VP2 del CPV-2 è stato sequenziato parzialmente (569 nucleotidi, Balboni et al., 2018) o per intero (1745 nucleotidi, Battilani et al., 2019) ed è stata dedotta la variante antigenica del CPV-2, attraverso l'analisi del residuo aminoacidico 426. I dati relativi al segnalamento (anno di campionamento, sesso, età, razza e origine geografica), lo stato di vaccinazione e la prognosi degli animali inclusi sono stati recuperati dalle cartelle cliniche dei soggetti o dalle schede anamnestiche raccolte al momento della registrazione dei campioni diagnostici.

### 2.2.2 Ricerca del DNA di circovirus canino e adenovirus canino di tipo 1 e 2

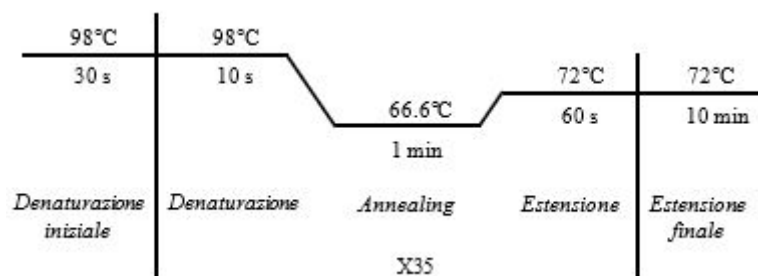
L'estrazione del DNA da campioni di feci e intestino è stata eseguita utilizzando il kit Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania) seguendo le istruzioni del produttore, come illustrato nel paragrafo 1.2.2 (**Studio 1**). Il DNA estratto è stato eluito in 100 µl di buffer di eluizione e stoccato a -20 °C fino alle successive analisi di laboratorio. La ricerca del DNA di CanineCV, CAAdV-1 e CAAdV-2 è stata eseguita con due specifiche metodiche molecolari di SYBR Green real-time PCR (una per CanineCV, e una per CAAdV-1 e CAAdV-2) in grado di rilevare e quantificare gli acidi nucleici dei differenti virus. Le specifiche delle due metodiche sono riportate nel paragrafo 1.2.3 (**Studio 1**) (Balboni et al., 2015; De Arcangeli et al., 2020). Le reazioni sono state eseguite testando in doppio almeno sei diluizioni scalari in base 10 dello standard plasmidico contenente il target di reazione ed i campioni incogniti. Durante l'esecuzione delle reazioni, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nelle reazioni per escludere eventuali falsi positivi. I campioni sono stati considerati positivi quando entrambe le ripetizioni mostravano un incremento esponenziale nella curva di fluorescenza, una quantità superiore al LOD ed una curva di melting specifica.

### 2.2.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

I virus identificati sono stati caratterizzati geneticamente mediante amplificazione, sequenziamento ed analisi bioinformatica del genoma o di geni informativi.

Per i campioni risultati positivi al CanineCV, è stato amplificato, mediante utilizzo integrato di metodiche di amplificazione di genomi circolari (RCA) e di end-point PCR (De Arcangeli et al., 2020), il genoma completo di CanineCV, utilizzando i protocolli di amplificazione descritti nel paragrafo 1.2.4 (**Studio 1**).

Per i campioni risultati positivi al CAAdV-1 o CAAdV-2, sono stati amplificati, con tre differenti end-point PCR, il gene parziale E3 e regioni geniche limitrofe, il gene Hexon, e il gene Fiber. Per l'amplificazione del gene parziale E3 e regioni limitrofe è stata utilizzata una metodica di end-point PCR validata da Hu e collaboratori (2001) con la coppia di primer HA1: 5'-CGC GCT GAA CAT TAC TAC CTT GTC-3' e HA2: 5'-CCT AGA GCA CTT CGT GTC CGC TT-3' che generava un amplicone di 508 nucleotidi per CAAdV-1 e di 1030 nucleotidi per CAAdV-2. Il profilo termico è riportato in **Figura 2.1**. Per l'amplificazione dei geni Hexon e Fiber sono stati utilizzati gli stessi protocolli diagnostici riportati nel paragrafo 1.2.4 (**Studio 1**) (Balboni et al., 2017).



**Figura 2.1.** Ciclo di amplificazione adottato per il gene E3 e regioni limitrofe di CAAdV-1 e CAAdV-2.

Ciascuna end-point PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente un enzima DNA polimerasi proofreading ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mix di reazione, uguale per ciascun patogeno, è riportata in **Tabella 1.5 (Studio 1)**. Durante l'esecuzione delle reazioni, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nelle reazioni per escludere eventuali falsi positivi. Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1-2% (p/v) addizionato con Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Chiyoda-ku, Tokyo, Giappone) in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp o 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione. Per il gene Hexon di CAAdV sono stati utilizzati anche due primer interni come riportato da Balboni e collaboratori (2017).

Le sequenze ottenute sono state assemblate, analizzate con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, data di accesso: 03/2020), allineate con sequenze di referenza presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> data di accesso: 03/2020, **Allegati 2.1 e 2.2**) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche. La variabilità dei differenti residui nucleotidici dei geni Rep e Cap di CanineCV e dei geni Hexon e Fiber di CAAdV-2 è stata valutata utilizzando la funzione entropy (H(x)) plot

implementata nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA); solamente le sequenze di referenza in cui erano disponibili entrambi i geni Rep e Cap, o Hexon e Fiber sono state usate per l'analisi. Il numero totale dei siti polimorfici, il numero totale di mutazioni, la diversità nucleotidica, il numero medio di differenze nucleotidiche e il numero di aplotipi sono stati calcolati sui geni virali usando il software DnaSP versione 5.10.01 (Librado e Rozas, 2009) e confrontati tra i due virus.

L'analisi filogenetica è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). Per le sequenze del genoma completo di CanineCV l'albero filogenetico è stato costruito usando il metodo Maximum Likelihood e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili. Per le sequenze di CAdV sono stati costruiti due alberi filogenetici: uno sulle sequenze nucleotidiche del gene E3 e regioni limitrofe utilizzando il metodo Neighbor-Joining e il modello Kimura 2-parametri (K2) con distribuzione gamma e siti invariabili, l'altro con i geni Hexon e Fiber concatenati utilizzando il metodo Maximum Likelihood e il modello Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribuzione gamma e siti invariabili. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata con il test di bootstrap mediante 1000 ripetizioni dell'analisi.

#### *2.2.4 Analisi statistica*

I dati sono stati analizzati mediante statistica descrittiva e riportati come mediana e range. I dati categorici sono stati analizzati usando il test del Chi-quadrato, mentre i dati continui (età) sono stati analizzati tramite il Mann-Whitney *U* test. I dati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di  $P < 0.05$ . L'analisi statistica è stata effettuata usando un software statistico disponibile in commercio (MedCalc Statistical Software versione 16.8.4).

### **2.3 Risultati**

#### *2.3.1 Popolazione di studio*

Sono stati inclusi nello studio 95 cani con segni clinici riconducibili ad enterite e risultati positivi al DNA di CPV-2 (90 da campioni di feci e 5 da campioni di intestino), campionati nel periodo compreso tra il 1995 e il 2017 (**Tabella 2.1**). In base alla disponibilità di estratti di DNA, 85/95 (89.5%) cani sono stati testati per la ricerca del DNA di CanineCV e CAdV, 4/95 (4.2%) solo per il DNA di CanineCV e 6/95 (6.3%) solo per il DNA di CAdV (**Tabella 2.1**).



### 2.3.2 Ricerca del DNA di circovirus canino e adenovirus canino di tipo 1 e 2

Il DNA di CanineCV è stato rilevato in 8/89 (8.9%) cani testati (**Tabella 2.1**). La mediana della quantità di DNA virale rilevata nei campioni testati era di  $1.8 \times 10^3$  copie/ $\mu$ l di estratto (range:  $5.1 \times 10^0$  -  $1.9 \times 10^5$ ). Non è stata rilevata un'associazione statisticamente significativa tra la positività al CanineCV e le variabili analizzate (**Tabella 2.1**). Il campione più datato in cui è stato identificato il DNA di CanineCV risale al 2009 (ID 800/2009).

**Tabella 2.1.** Statistica descrittiva e frequenza di infezione da CanineCV, CAAdV-1 e CAAdV-2.

Variabili	Totale	CanineCV	P value <sup>d</sup>	CAAdV-1 e CAAdV-2	P value <sup>d</sup>	Coinfezioni	P value <sup>d</sup>
Numero di cani	95	89 (93.7)		91 (95.8)		95	
Cani positivi		8 (8.9)		21 (23.1)		28 (29.5)	
Sesso			0.765		0.205		0.217
Maschi	48 (50.5)	4 (4.5)		9 (9.9)		13 (13.7)	
Femmine	30 (31.6)	4 (4.5)		10 (11)		13 (13.7)	
ND <sup>a</sup>	17 (17.9)	-		2 (2.2)		2 (2)	
Razza			0.749		<b>0.002</b>		<b>0.009</b>
Meticcio	24 (25.3)	2 (2.2)		-		2 (2)	
Razza	65 (68.4)	6 (6.7)		21 (23.1)		26 (27.4)	
ND <sup>a</sup>	6 (6.3)	-		-		-	
Origine geografica			0.999		0.663		0.576
Emilia Romagna	79 (83)	8 (8.9)		20 (22)		27 (28.4)	
Toscana	2 (2)	-		-		-	
Campania	1 (1.1)	-		1 (1.1)		1 (1.1)	
Veneto	4 (4.2)	-		-		-	
Marche	1 (1.1)	-		-		-	
Lazio	1 (1.1)	-		-		-	
Abruzzo	1 (1.1)	-		-		-	
Basilicata	1 (1.1)	-		-		-	
Friuli Venezia Giulia	1 (1.1)	-		-		-	
Piemonte	1 (1.1)	-		-		-	
Puglia	1 (1.1)	-		-		-	
ND <sup>a</sup>	2 (2)	-		-		-	
CPV-2 (variante)			0.247		0.164		0.147
2a	49 (51.6)	2 (2.2)		11 (12.1)		13 (13.7)	
2b	21 (22.1)	2 (2.2)		2 (2.2)		4 (4.2)	
2c	25 (26.3)	4 (4.5)		8 (8.8)		11 (11.6)	
Vaccinazione			0.475		0.089		0.063
Sì <sup>b</sup>	32 (33.7)	4 (4.5)		11 (12.1)		14 (14.7)	
No	54 (56.8)	3 (3.3)		9 (9.9)		12 (12.6)	
ND <sup>a</sup>	9 (9.5)	1 (1.1)		1 (1.1)		2 (2)	
Prognosi			0.836		0.729		0.498
Sopravvissuti	36 (37.9)	5 (5.6)		12 (13.2)		16 (16.8)	
Deceduti	22 (23.2)	2 (2.2)		5 (5.5)		7 (7.4)	
ND <sup>a</sup>	37 (38.9)	1 (1.1)		4 (4.4)		5 (5.3)	
Età (mesi) <sup>c</sup>	3 [1-120]	3.5 [2-11]	0.542	3.5 [1-11]	0.773	3 [1-11]	0.721

I dati categorici sono stati analizzati usando il test del Chi-quadrato, mentre i dati continui (età) sono stati analizzati tramite il Mann-Whitney U test. I dati sono riportati come numero di cani con i valori in percentuale tra parentesi tonde.

<sup>a</sup> I dati non disponibili sono stati esclusi dall'analisi statistica.

<sup>b</sup> Cani regolarmente vaccinati o sottoposti ad almeno una somministrazione con vaccino trivalente vivo attenuato nei confronti di parvovirus canino (CPV-2 o CPV-2b), infezione dell'epatite canina (CAAdV-2) e cimurro canino (canine distemper virus - CDV), in base all'età del soggetto.

<sup>c</sup> Dati riportati come mediana e [range].

<sup>d</sup> Valori di P (P value) < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

CAAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino, CPV-2: parvovirus canino di tipo 2, ND: dato non disponibile. I valori in grassetto indicano la significatività statistica.

Il DNA di CAdV è stato rilevato in 21/91 (23.1%) cani testati (**Tabella 2.1**): 1/21 era positivo al CAdV-1, 19/21 al CAdV-2 e 1/21 ad entrambi i tipi virali. La mediana della quantità di DNA virale rilevata nei campioni testati era di  $6.1 \times 10^0$  (range:  $4.5 \times 10^0 - 7.6 \times 10^0$ ) e  $1.1 \times 10^2$  (range:  $5.7 \times 10^0 - 8.5 \times 10^5$ ) copie/ $\mu$ l di estratto rispettivamente per il CAdV-1 e il CAdV-2. La frequenza di positività al CAdV era significativamente più alta nei cani di razza (tutti i cani risultati positivi erano di razza) comparati con i meticci ( $P = 0.002$ , **Tabella 2.1**). Non sono state identificate altre associazioni statisticamente significative tra la positività al CAdV e le variabili analizzate (**Tabella 2.1**).

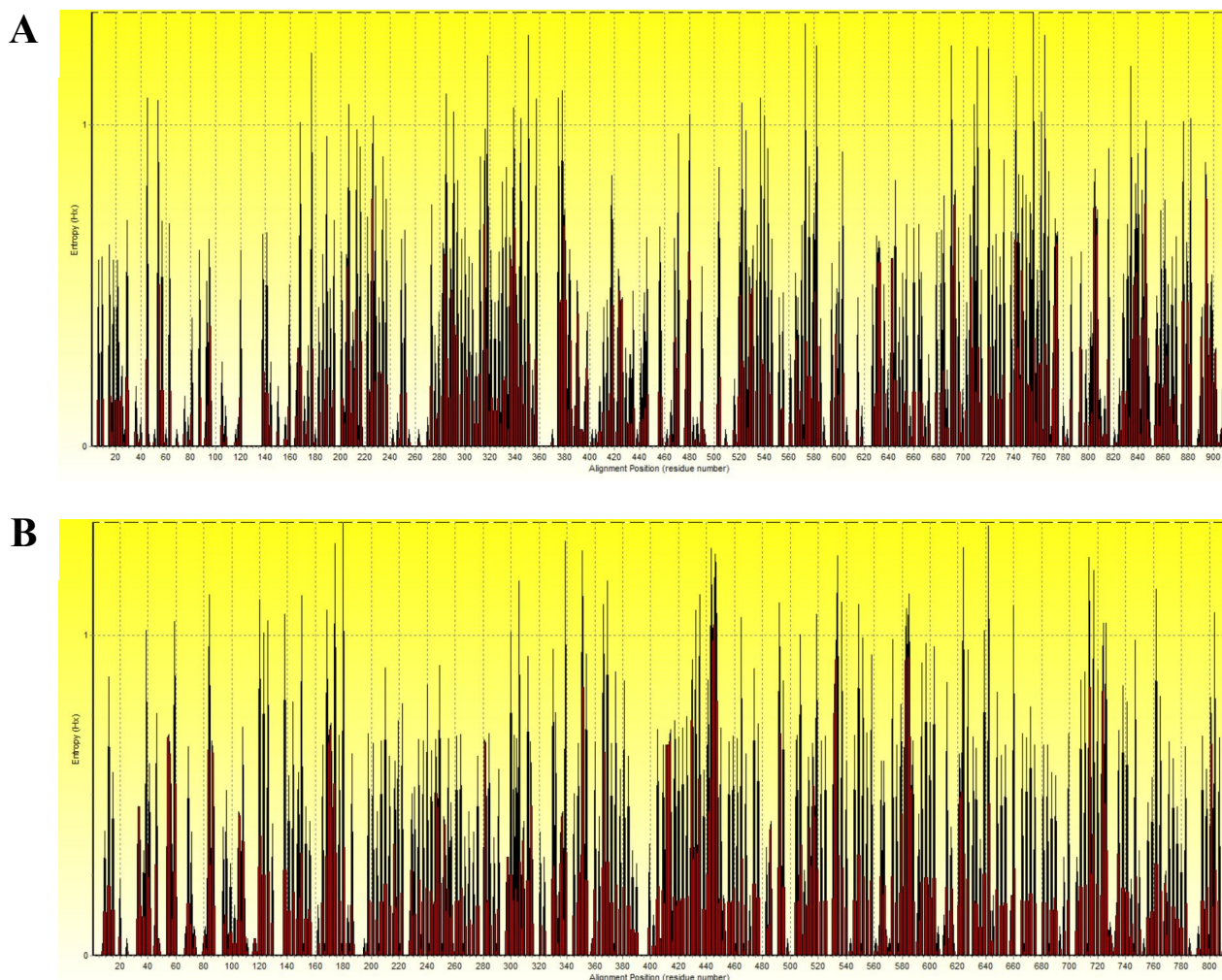
Dei 95 cani inclusi nello studio, 28 (29.5%) erano coinfecti. In 26/28 cani coinfecti, è stato rilevato un ulteriore DNA virale in aggiunta a quello di CPV-2: 7/28 erano positivi al CanineCV, 1/28 era positivo al CAdV-1 e 18/28 erano positivi al CAdV-2. I rimanenti 2/28 cani coinfecti mostravano una tripla infezione: uno era positivo a CPV-2, CanineCV e CAdV-2; l'altro era positivo a CPV-2, CAdV-1 e CAdV-2. Dal 1994 al 2008, precedentemente al primo rilevamento del DNA di CanineCV nel presente studio, 5/44 (11.4%) cani inclusi nello studio erano coinfecti con CPV-2 e CAdV. Dal 2009 (anno in cui è stato rilevato il primo DNA di CanineCV in questo studio) al 2017, 23/51 (45.1%) cani inclusi nello studio erano coinfecti. Tra i cani coinfecti, 13/28 (46.4%) erano infetti da CPV-2a, 4/28 (14.3%) da CPV-2b e 11/28 (39.3%) da CPV-2c. Non sono state rilevate associazioni statisticamente significative tra la variante di CPV-2 e la presenza di altri virus. Una associazione statisticamente significativa è stata rilevata tra la presenza di coinfezione virale e la razza ( $P = 0.009$ , **Tabella 2.1**). Non sono state rilevate altre associazioni statisticamente significative tra lo stato di coinfezione e le variabili analizzate (**Tabella 2.1**).

### 2.3.3 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

Per otto CanineCV identificati è stato possibile ottenere sequenze del genoma completo di 2063 nucleotidi di lunghezza (GenBank ID: MT193159- MT193166, **Allegato 2.1**). La struttura del genoma era la medesima descritta nel paragrafo 1.3.3 (**Studio 1**). L'allineamento nucleotidico tra le sequenze di CanineCV ottenute in questo studio e 110 sequenze di riferimento reperite sul database Genbank (**Allegato 2.1**) ha mostrato una identità nucleotidica complessiva da 80.8 a 100%. L'analisi entropy ( $H(x)$ ) plot ha mostrato che la variabilità nucleotidica era distribuita equamente nei geni Rep (**Figura 2.2A**) e Cap (**Figura 2.2B**). L'analisi DnaSP ha mostrato una variabilità nucleotidica molto elevata e paragonabile tra i geni Rep e Cap del CanineCV, che sono approssimativamente della stessa lunghezza (**Tabella 2.2**). Inoltre, i valori di diversità nucleotidica, numero medio di differenze nucleotidiche e gli aplotipi calcolati per i geni del CanineCV erano molto più elevati di quelli calcolati per i geni di CAdV-2, indipendentemente dal differente numero di sequenze analizzate. L'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV mostrava un

raggruppamento ben distinguibile delle sequenze nucleotidiche in cinque gruppi (**Figura 2.3**), come riportato nel paragrafo 1.3.3 (**Studio 1**). Le sequenze di CanineCV identificate in questo studio erano incluse nel gruppo 1 insieme con altri virus identificati in cani, lupi e un tasso in Europa, USA, Argentina e Cina.

Le sequenze nucleotidiche del gene E3 e regioni limitrofe sono state ottenute per un CAdV-1 e otto CAdV-2. L'unica sequenza nucleotidica del gene E3 di CAdV-1 era di 462 nucleotidi di lunghezza, mentre le otto sequenze nucleotidiche ottenute per CAdV-2 erano di 870 nucleotidi di lunghezza (GenBank ID: MT193150- MT193158, **Allegato 2.2**). L'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio e 71 sequenze di riferimento identificate in cani, volpi e lupi, ha mostrato una netta suddivisione tra CAdV-1 e CAdV-2 (**Figura 2.4**). All'interno del cluster CAdV-2, il virus identificato nel cane 618/1995 costituiva un ramo separato, mentre gli altri CAdV-2 sequenziati in questo studio raggruppavano insieme. Prodotti di PCR specifici per il gene Hexon (2718 nucleotidi in lunghezza, corrispondenti a 905 residui aminoacidici) e per il gene Fiber (1629 nucleotidi in lunghezza, corrispondenti a 542 residui aminoacidici) sono stati generati rispettivamente da otto e sette CAdV-2 (GenBank ID: MT193135- MT193149, **Allegato 2.2**). Per entrambi i geni Hexon e Fiber, tutte le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio mostravano una completa identità tra di loro, ad eccezione del già menzionato CAdV-2 618/1995 che mostrava per i due geni una identità del 99.7% e 99.4% con gli altri virus sequenziati nel presente studio. L'analisi entropy ( $H(x)$ ) plot ha mostrato che la variabilità nucleotidica era distribuita equamente nel gene Hexon (**Figura 2.5A**), mentre era presente una grande variabilità nucleotidica nella porzione 3' del gene Fiber (**Figura 2.5B**). L'analisi DnaSP ha mostrato una variabilità nucleotidica più elevata nel gene Hexon rispetto al gene Fiber (**Tabella 2.2**), con un numero più alto di siti polimorfici (rispettivamente 12 e 6) e di aplotipi (rispettivamente 3 e 2). Nell'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche dei geni Hexon e Fiber concatenati ottenute in questo studio e 15 ceppi di riferimento, le sequenze di CAdV-1 e CAdV-2 formavano due cluster distinti (**Figura 2.6**). Il CAdV-2 618/1995 formava un ramo separato, mentre le altre sequenze di CAdV-2 ottenute in questo studio raggruppavano insieme al ceppo vaccinale Toronto A26/61.

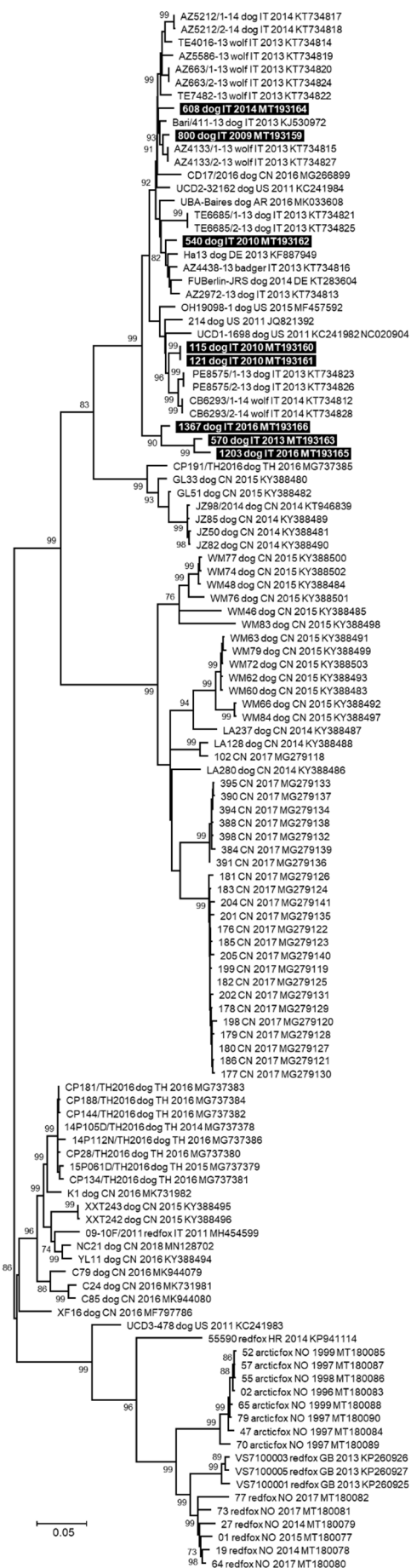


**Figura 2.2.** Rappresentazioni grafiche relative alla variabilità dei differenti residui nucleotidici degli allineamenti dei geni Rep, codificante per proteine associate alla replicazione del CanineCV (A); e Cap, codificante per la proteina del capsido del CanineCV (B), ottenute con la funzione entropy ( $H(x)$ ) plot implementata nel software BioEdit. Sull'asse delle ascisse è riportato il numero del residuo nucleotidico e sull'asse delle ordinate è riportata l'entropia. Le analisi sono state eseguite sulle sequenze nucleotidiche di CanineCV generate in questo studio ed i ceppi di referenza di CanineCV per cui erano disponibili entrambe le sequenze dei geni Rep e Cap.

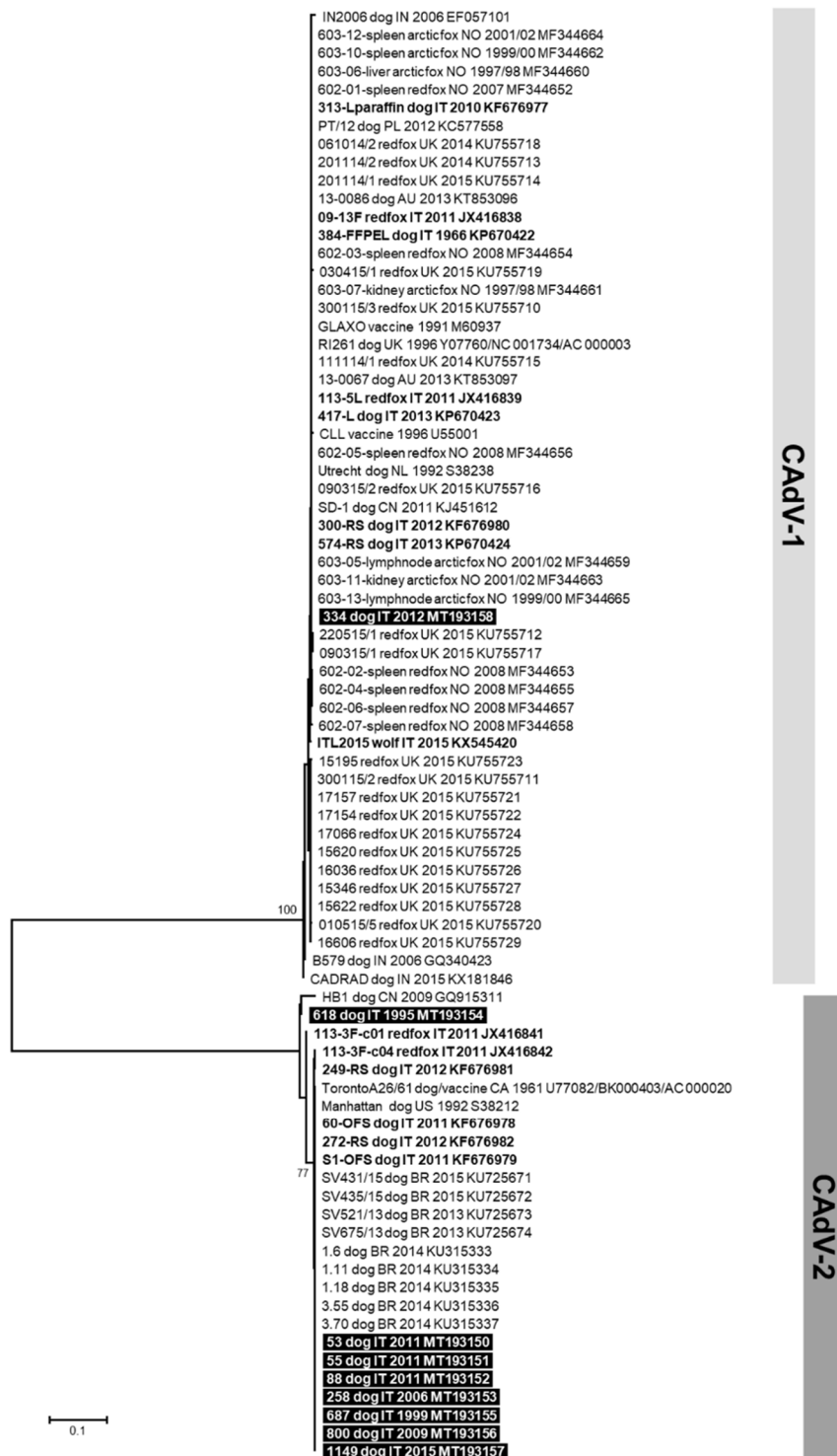
**Tabella 2.2.** Analisi della variabilità di sequenza relativa ai geni Rep e Cap di CanineCV ed ai geni Hexon e Fiber di CAdV-2 effettuata con software DnaSP.

Sequenze	Numero di sequenze	Numero totale di siti	$S$	$\eta$	$\pi$	$k$	$h$
CanineCV - gene Rep	109	909	386	580	0.11975 SD 0.00430	109.04961	97
CanineCV - gene Cap	109	810	374	567	0.14514 SD 0.00256	117.99762	93
CAdV-2 - gene Hexon	8	2715	12	12	0.00110 SD 0.00060	3.0	3
CAdV-2 - gene Fiber	8	1626	6	6	0.00092 SD 0.00066	1.5	2

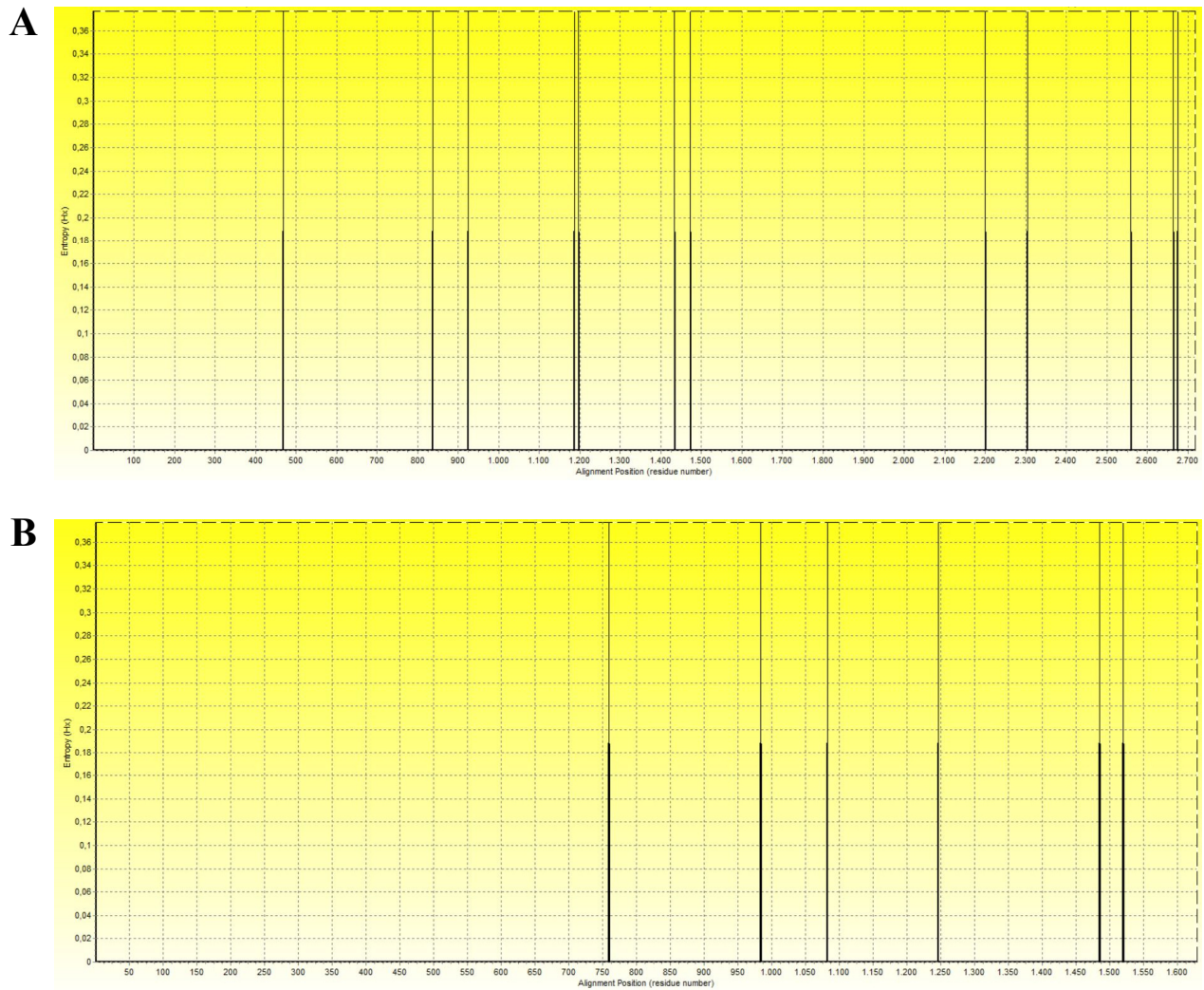
$S$ : numero totale di siti polimorfici,  $\eta$ : numero totale di mutazioni,  $\pi$ : diversità nucleotidica (numero medio di differenze nucleotidiche per sito) e deviazione standard,  $k$ : numero medio di differenze nucleotidiche,  $h$ : numero di aplotipi. CAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, CanineCV: circovirus canino.



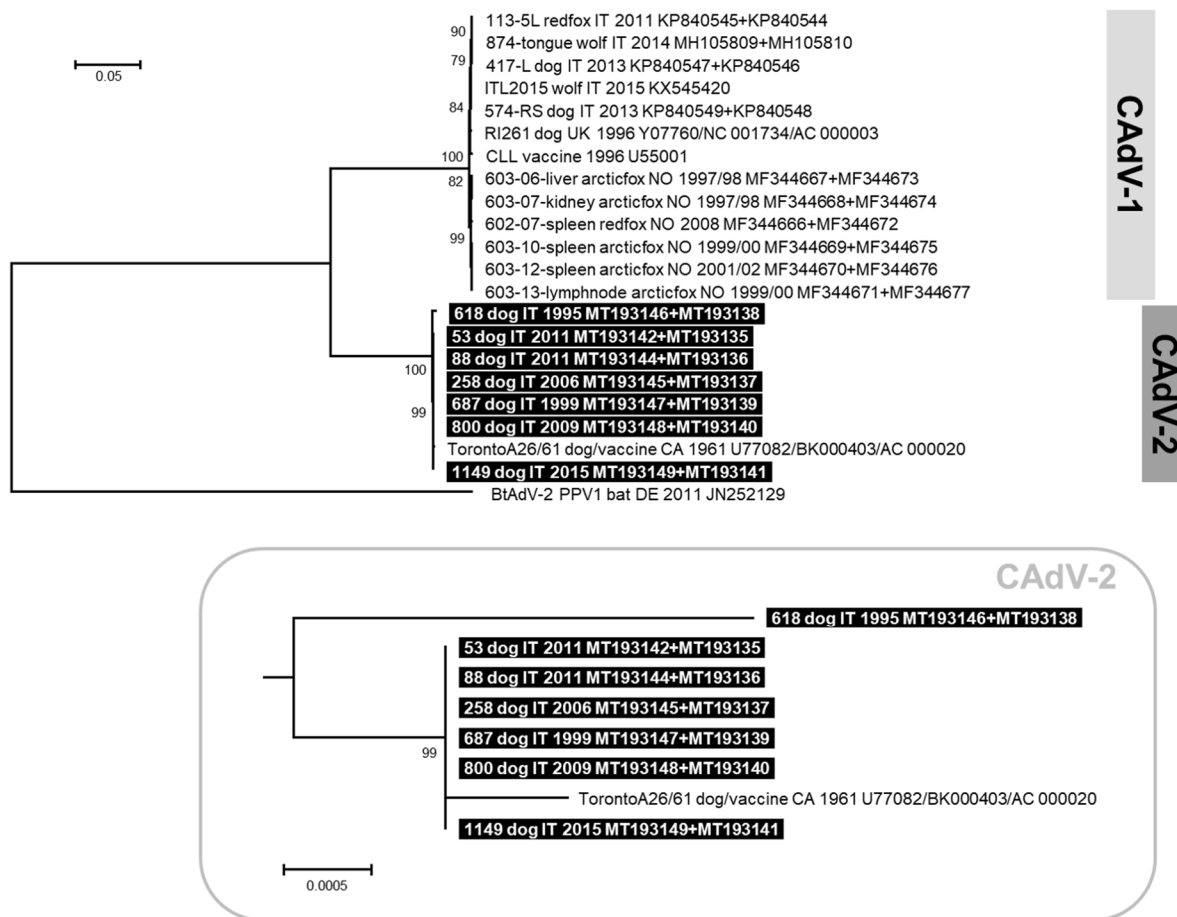
**Figura 2.3.** Albero filogenetico non radicato costruito con le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV ottenute in questo studio e di 110 ceppi di riferimento ottenuti dal database GenBank (Allegato 2.1). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) e il metodo Maximum Likelihood. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in nero: sequenze nucleotidiche di CanineCV generate in questo studio. I numeri in grigio sulla destra della figura sono i gruppi evidenziati in questo studio e corrispondono ai cluster proposti da Niu et al. (2020) e da Urbani et al. (2021).



**Figura 2.4.** Albero filogenetico non radicato costruito con le sequenze nucleotidiche del gene E3 e regioni limitrofe di CadV-1 e CadV-2 ottenute in questo studio e di 71 ceppi di referenza ottenuti dal database GenBank (**Allegato 2.2**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) e il metodo Neighbor-Joining. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello Kimura 2-parametri (K2) con distribuzione gamma e siti invariabili è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in nero: sequenze nucleotidiche di CADV-1 e CADV-2 generate in questo studio. In grassetto: sequenze italiane di CADV-1 e CADV-2 identificate in cani, volpi e lupi.



**Figura 2.5.** Rappresentazioni grafiche relative alla variabilità dei differenti residui nucleotidici dell'allineamento dei geni Hexon, codificante per la principale proteina strutturale del capsido di CAAdV con funzioni antigeniche importanti (**A**); e Fiber, codificante per una importante proteina strutturale costituente le fibre del capsido di CAAdV ad azione recettoriale ed antigenica (**B**), ottenute con la funzione entropy ( $H(x)$ ) plot implementata nel software BioEdit. Sull'asse delle ascisse è riportato il numero del residuo nucleotidico e sull'asse delle ordinate è riportata l'entropia. Le analisi sono state eseguite sulle sequenze nucleotidiche di CAAdV-2 generate in questo studio ed i ceppi di referenza di CAAdV-2 per cui erano disponibili entrambe le sequenze dei geni Hexon e Fiber (**Allegato 2.2**).



**Figura 2.6.** Albero filogenetico radicato costruito con le sequenze nucleotidiche dei geni Hexon e Fiber del CAAdV concatenate ottenute in questo studio e 15 ceppi di riferimento ottenuti dal database GenBank (Allegato 2.2). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) e il metodo Maximum Likelihood. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) con distribuzione gamma e siti invariabili è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in nero: sequenze nucleotidiche di CAAdV-2 generate in questo studio. In basso nella figura, una porzione ingrandita dell'albero ottenuto per visualizzare meglio le relazioni filogenetiche esistenti tra le sequenze nucleotidiche di CAAdV-2 e i valori di bootstrap. Per alcuni virus sono riportati due codici di accesso GenBank (rispettivamente le sequenze dei geni Hexon e Fiber).

## 2.4 Discussione

Le coinfezioni virali rappresentano un grave problema in medicina veterinaria sia perché l'infezione contemporanea di più virus nello stesso ospite può determinare un aggravamento nella sintomatologia clinica, sia perché dal punto di vista diagnostico e terapeutico risulta più complicato effettuare una diagnosi certa e adottare misure terapeutiche efficaci.

Il CanineCV è stato descritto per la prima volta nel 2012 da Kapoor e colleghi (2012) in cani la cui storia clinica non era nota. Successivamente, Li e colleghi (2013) hanno rilevato il DNA di CanineCV nel fegato di un cane con gastroenterite emorragica, vasculite e linfadenite granulomatosa. In letteratura sono presenti numerosi studi che hanno indagato il ruolo patogeno del virus nel cane, in



particolare come possibile causa di patologia gastroenterica. Tuttavia, ad oggi, non è ancora stata rilevata in modo univoco un'associazione statisticamente significativa tra il virus e la presenza di sintomi gastrointestinali (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Hsu et al., 2016; Li et al., 2013). In due studi è stata inoltre descritta la presenza di CanineCV in associazione con il CPV-2, suggerendo un possibile sinergismo tra i due virus (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017).

Il CAAdV, sia di tipo 1 che di tipo 2, svolge un ruolo importante nell'ambito delle malattie infettive del cane ed è stato rilevato frequentemente in associazione con altri agenti infettivi (Alves et al., 2018; Pintore et al., 2016; Lavan e Knesl, 2015; Headley et al., 2013; Decaro et al., 2008; Decaro et al., 2007; Buonavoglia e Martella, 2007). Il CAAdV-1 ed il CAAdV-2 sono virus ampiamente diffusi a livello globale in carnivori domestici e selvatici. Nel cane, sono rispettivamente responsabili dell'epatite infettiva canina, una grave patologia sistemica caratterizzata da danni vascolari, epatici, renali ed oculari (Decaro et al., 2008), e della tracheobronchite infettiva, una forma respiratoria normalmente lieve ed autolimitante (Buonavoglia e Martella 2007). Da anni, l'utilizzo di un vaccino vivo attenuato allestito con il CAAdV-2 (ceppo Toronto A26/61) ha permesso di controllare efficacemente l'insorgenza e la diffusione della malattia, tuttavia esso non impedisce l'instaurarsi dell'infezione (Decaro et al., 2008; Balboni et al., 2014).

In questo studio, 28 dei 95 (29.5%) cani infetti da CPV-2 (1995-2017) sono risultati positivi per almeno un altro virus tra quelli ricercati. In particolare, 7/28 erano anche positivi per CanineCV, 1/28 per CAAdV-1, 18/28 per CAAdV-2, 1/28 per CanineCV e CAAdV-2, e 1/28 per CAAdV-1 e CAAdV-2. Dal 2009 in poi si è verificato un aumento nella frequenza delle coinfezioni virali rilevate: passando da 5/44 (11.4%) nel periodo compreso tra il 1994 e il 2008 a 23/51 (45.1%) nel periodo compreso tra il 2009 e il 2017. Dal momento che in questo studio prima del 2009 non è stato rilevato il DNA di CanineCV, la bassa frequenza di coinfezione riscontrata potrebbe essere spiegata da una vera e propria limitata diffusione del CanineCV nei cani campionati prima del 2009 oppure da una degradazione del DNA virale dovuta ad una prolungata conservazione nel tempo dei campioni con conseguente riduzione della sensibilità diagnostica. Nel presente studio non è stata rilevata alcuna associazione statisticamente significativa tra la variante di CPV-2 e la presenza degli altri agenti virali ricercati. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che la variante antigenica di CPV-2 non rappresenti un fattore predisponente per l'insorgenza di coinfezioni. Inoltre, non è stata trovata nessuna associazione statisticamente significativa tra lo stato di coinfezione e tutte le variabili analizzate, ad eccezione della razza ( $P = 0.009$ ). Infatti, 26/28 cani coinfezati erano di razza, con tutti i cani risultati positivi al DNA di CAAdV che erano di razza ( $P = 0.002$ ). Questo risultato suggerisce una possibile predisposizione dei cani di razza con infezione da CPV-2 ad essere coinfezati con il CAAdV. Un precedente studio che investigava la presenza del DNA di CAAdV in cani riferiti ad un ospedale veterinario in Italia non ha

rivelato questa associazione (Balboni et al., 2014), ma lo studio non aveva ricercato la presenza di altri agenti infettivi e i cani non erano stati inclusi sulla base dei segni clinici correlati a gastroenteriti. In assenza di dati epidemiologici a supporto di questo dato, la potenziale associazione tra la razza dei cani infetti da CPV-2 e le coinfezioni con il CAdV dovrebbe essere considerata con cautela. In effetti, questo risultato potrebbe essere una mera conseguenza dei cani inclusi nello studio, dal momento che la maggior parte di essi proveniva da un'unica area geografica. Alla luce di ciò, sono necessarie più indagini per confermare questa predisposizione e chiarire quali fattori possano determinarla. La mortalità dei cani affetti da CPV-2 non sembra aumentare in caso di coinfezione con CanineCV o CAdV. I nostri risultati concordano con da Rocha Gizzi e colleghi (2014) che non hanno rilevato un incremento nella mortalità in cani coinfeziti con CPV-2 ed altri patogeni. Al contrario, in un altro studio è stato riportato un aumento statisticamente significativo del tasso di mortalità in cani coinfeziti con CPV-2 e CanineCV (Anderson et al., 2017). La diversità nella composizione della popolazione oggetto di studio e le diverse caratteristiche epidemiologiche dei virus considerati potrebbero spiegare le differenze tra i risultati riportati in letteratura.

Il DNA di CanineCV è stato rilevato in 8/89 (8.9%) campioni di feci di cani con enterite riconducibile all'infezione da CPV-2. In letteratura sono presenti molti studi che riportano una elevata frequenza di infezione da CanineCV in cani con diarrea (Niu et al., 2020; Dowgier et al., 2017; Hsu et al., 2016). Come già discusso per le coinfezioni virali, la bassa frequenza di infezione da CanineCV riscontrata nel nostro studio rispetto a studi di altri autori potrebbe essere spiegata da una diffusione limitata del CanineCV nei cani campionati prima del 2009 oppure da una degradazione del DNA dovuta ad una prolungata conservazione dei campioni nel tempo. Il DNA di CanineCV è stato rilevato in un cane campionato nel 2009 (ID 800/2009), due anni prima che l'infezione da CanineCV nel cane venisse riportata in letteratura per la prima volta (Kapoor et al., 2012). Questo dato, insieme all'identificazione del DNA di CanineCV nelle volpi artiche (*Vulpes lagopus*) nel periodo compreso tra il 1996 e il 2001 nell'arcipelago Svalbard (Urbani et al., 2021), supporta l'ipotesi che il CanineCV circolava nei canidi da più tempo rispetto a quanto riportato in letteratura. Tutte le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV analizzate mostravano una identità  $\geq 80.8\%$ , pertanto questo risultato conferma l'esistenza di un'unica specie di circovirus canino (Breitbart et al., 2017; Rosario et al., 2017), che include i virus rilevati in questo studio. L'analisi filogenetica ha evidenziato che i CanineCV sequenziati in questo studio erano inclusi nel gruppo 1 dei cinque cluster proposti da Urbani e colleghi (2021) e da Niu e colleghi (2020), insieme ad altri virus identificati in cani, lupi e un tasso da Europa, USA, Argentina e Cina, a dimostrazione del fatto che potrebbe esserci una trasmissione del CanineCV dai cani domestici ai carnivori selvatici e viceversa (Balboni et al., 2021; De Arcangeli et al., 2020).

Il DNA di CAdV è stato rilevato in 21/91 (23.1%) campioni di feci di cani con enterite riconducibile all'infezione da CPV-2, la maggior parte dei quali appartenente al tipo 2 (20/21, di cui uno risultato positivo sia al CAdV-1 che al CAdV-2). Ji e collaboratori (2020) hanno riportato una frequenza di infezione da CAdV-2 in cani con diarrea dell'8.5% (19/224). Nello stesso studio 5 dei 19 soggetti positivi al CAdV-2 presentavano un'infezione concomitante con CPV-2, ma non è stata dimostrata nessuna associazione tra l'infezione da CAdV-2 e i segni clinici. Un rilevamento molto frequente del DNA di CAdV-2 in campioni fecali (58.8%) è stato riportato in uno studio effettuato su cani che non sono stati inclusi in relazione alla sintomatologia gastroenterica e che mostravano differenti condizioni patologiche o nessun sintomo clinico (Balboni et al., 2014). Sono necessari più studi per investigare se il CAdV-2 possa avere un ruolo patogenico in corso di gastroenterite. L'analisi delle sequenze di CAdV-2 ha evidenziato una netta distinzione del virus più datato rilevato nel nostro studio, identificato in un cane campionato nel 1995 (ID 618/1995), a testimonianza del fatto che il CAdV-2 ha accumulato mutazioni negli anni seguenti. Le altre sequenze di CAdV-2 identificate nel presente studio raggruppavano filogeneticamente con il ceppo vaccinale Toronto A26/61, suggerendo che il vaccino attualmente in uso non dovrebbe presentare una riduzione di efficacia.

Dal confronto tra CanineCV e CAdV, è emersa una maggiore variabilità nucleotidica per CanineCV rispetto al CAdV-2. Dal momento che i virus con genoma piccolo e circolare tendono a mutare più velocemente rispetto ai virus con genoma grande e lineare (Sanjuán e Domingo-Calap, 2016; Shackelton et al., 2005), questo risultato era prevedibile per le caratteristiche dei due virus analizzati: piccolo, a singolo filamento di DNA circolare per CanineCV e medio-grande, a doppio filamento di DNA lineare per CAdV-2. In particolare, CanineCV mostrava una variabilità nucleotidica più elevata di quella riportata per il CPV-2, che ha dimensioni simili ma genoma lineare e per il quale il tasso di sostituzione nucleotidica è paragonabile a quello dei virus a RNA (Battilani et al., 2019; Shackelton et al., 2005). Questo risultato sottolinea l'elevata predisposizione dei virus con genoma circolare ad accumulare mutazioni. Dall'analisi delle sequenze dei geni Hexon e Fiber del CAdV-2, è stata osservata la presenza di alcune mutazioni nucleotidiche equamente distribuite nel gene Hexon, e localizzate nella porzione 3' del gene Fiber. La porzione 3' del gene Fiber codifica per una importante porzione strutturale (conosciuta come "knob") costituente le fibre del capside virale, responsabile del legame recettoriale e di proprietà antigeniche del virus (King et al., 2011). Un gran numero di mutazioni in questa regione del gene Fiber è già stato descritto per il CAdV-2 in Cina da Ji e colleghi (2020) e per il CAdV-1 in Italia da Balboni e colleghi (2019), a dimostrazione del fatto che questa regione genetica è sottoposta a rapida evoluzione, anche in conseguenza di una maggiore esposizione al sistema immunitario. Contrariamente a quanto riportato in letteratura per CAdV-1 (Balboni et al., 2019), l'analisi eseguita con il programma DnaSP ha mostrato una maggiore variabilità nucleotidica

per il gene Hexon del CAdV-2 in confronto al gene Fiber, con un numero più alto di siti polimorfici (rispettivamente 12 e 6) e di aplotipi (rispettivamente 3 e 2). Tuttavia, nell'interpretazione di questo dato, occorre tenere in considerazione che il gene Hexon ha una lunghezza quasi doppia rispetto al gene Fiber.

Il nostro studio presenta alcuni limiti. Prima di tutto, è stato incluso un numero ridotto di animali in un periodo di tempo molto ampio, rendendo i risultati ottenuti difficilmente rappresentativi. In secondo luogo, nella nostra popolazione di studio sono stati testati solamente virus a DNA a causa della sola disponibilità di estratti di DNA conservati presso i laboratori del CLINLAB. Pertanto, non è stato possibile rilevare eventuali coinfezioni con virus a RNA (come il coronavirus canino, il virus del cimurro del cane, il calicivirus canino, l'astrovirus canino, etc.). Inoltre, per gli scopi dello studio, la frequenza di coinfezioni virali è stata valutata in cani con enterite riconducibile all'infezione da CPV-2; l'inclusione di cani con gastroenterite di diversa origine così come di controlli sani avrebbe potuto chiarire meglio il ruolo patogenetico di tali coinfezioni. Infine, a causa della natura retrospettiva dello studio, i dati clinici relativi alla gravità della malattia ed ai giorni di ospedalizzazione non erano disponibili, e, per alcuni pazienti, mancavano i dati relativi alla prognosi. Pertanto, studi prospettici focalizzati sul decorso clinico dei cani con enteriti riconducibili all'infezione da CPV-2 ed eventualmente coinfezzati con altri virus sono necessari per comprendere meglio l'impatto di tali coinfezioni nella pratica clinica veterinaria.

## **2.5 Conclusione**

In questo studio, sono stati riportati nuovi dati sulla concomitante presenza di CanineCV e CAdV in cani con enterite riconducibile all'infezione da CPV-2. Dai risultati ottenuti, la presenza di coinfezioni da CanineCV e CAdV non era associata con la variante antigenica del parvovirus canino responsabile dell'enterite e le coinfezioni non sembravano peggiorare la prognosi dei cani inclusi nello studio. La caratterizzazione genetica dei virus identificati ha permesso di fare chiarezza su nuovi aspetti riguardanti la diffusione e l'evoluzione del CanineCV e del CAdV nella popolazione canina. Il rilevamento di CanineCV in un cane campionato nel 2009 permette di retrodatare la sua circolazione nella popolazione di cane domestico e supporta l'ipotesi che i CanineCV circolavano nei canidi da più tempo di quanto riportato in letteratura.

## 2.6 Bibliografia

- Alves CDBT, Granados OFO, Budaszewski RDF, Streck AF, Weber MN, Cibulski SP, Pinto LD, Ikuta N, Canal CW. Identification of enteric viruses circulating in a dog population with low vaccine coverage. *Braz J Microbiol.* 2018; 49(4):790-794. doi: 10.1016/j.bjm.2018.02.006.
- Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec.* 2017; 180(22):542. doi: 10.1136/vr.103926.
- Balboni A, Urbani L, Delogu M, Musto C, Fontana MC, Merialdi G, Lucifora G, Terrusi A, Dondi F, Battilani M. Integrated use of molecular techniques to detect and genetically characterise DNA viruses in Italian wolves (*Canis lupus italicus*). *Animals (Basel).* 2021; 11(8):2198. doi: 10.3390/ani11082198.
- Balboni A, Tryland M, Mørk T, Killengreen ST, Fuglei E, Battilani M. Unique genetic features of canine adenovirus type 1 (CAV-1) infecting red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway and arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard. *Vet Res Commun.* 2019; 43(2):67-76. doi: 10.1007/s11259-019-09746-y.
- Balboni A, Bassi F, De Arcangeli S, Zobba R, Dedola C, Alberti A, Battilani M. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. *BMC Vet Res.* 2018; 14(1):41. doi: 10.1186/s12917-018-1356-9.
- Balboni A, Dondi F, Agnoli C, Verin R, Guarini M, Morini M, Battilani M. Novel sequence variants of viral hexon and fibre genes in two dogs with canine adenovirus type 1-associated disease. *Vet J.* 2017; 223:73-75. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.05.011.
- Balboni A, Dondi F, Prosperi S, Battilani M. Development of a SYBR Green real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus type 1 and type 2. *J Virol Methods.* 2015; 222:34-40. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.05.009.
- Balboni A, Mollace C, Giunti M, Dondi F, Prosperi S, Battilani M. Investigation of the presence of canine adenovirus (CAV) in owned dogs in Northern Italy. *Res Vet Sci.* 2014; 97(3):631-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.010.
- Battilani M, Modugno F, Mira F, Purpari G, Di Bella S, Guercio A, Balboni A. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Italy from 1994 to 2017: recurrence of the CPV-2b variant. *BMC Vet Res.* 2019; 15(1):393. doi: 10.1186/s12917-019-2096-1.
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, Ictv Report Consortium. ICTV Virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol.* 2017; 98(8):1997-1998. doi: 10.1099/jgv.0.000871.
- Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res.* 2007; 38(2):355-73. doi: 10.1051/vetres:2006058.
- da Rocha Gizzi AB, Oliveira ST, Leutenegger CM, Estrada M, Kozemjak DA, Stedile R, Marcondes M, Biondo AW. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet Res.* 2014; 10:23. doi: 10.1186/1746-6148-10-23.

- De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis.* 2020; 56(1):239-242.
- Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008; 38(4):799-814, viii. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.006.
- Decaro N, Campolo M, Elia G, Buonavoglia D, Colaianni ML, Lorusso A, Mari V, Buonavoglia C. Infectious canine hepatitis: an "old" disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci.* 2007; 83(2):269-73. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.11.009.
- Dowgier G, Lorusso E, Decaro N, Desario C, Mari V, Lucente MS, Lanave G, Buonavoglia C, Elia G. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol.* 2017; 204:54-58. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.007.
- Headley SA, Alfieri AA, Fritzen JT, Garcia JL, Weissenböck H, da Silva AP, Bodnar L, Okano W, Alfieri AF. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *J Vet Diagn Invest.* 2013; 25(1):129-35. doi: 10.1177/1040638712471344.
- Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, Lin CN. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res.* 2016; 12(1):116. doi: 10.1186/s12917-016-0722-8.
- Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet Res Commun.* 2001; 25(1):77-84. doi: 10.1023/a:1006417203856.
- Ji J, Li W, Hu W, Xu X, Kan Y, Yao L, Bi Y, Xie Q. Novel genotype definition and the first epidemiological investigation of canine adenovirus type 2 in dogs in Central China. *Front Vet Sci.* 2020; 7:534. doi: 10.3389/fvets.2020.00534.
- Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol.* 2012; 86(12):7018. doi: 10.1128/JVI.00791-12.
- King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E (eds). *Virus taxonomy: IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, London. 2011; pp 125–141.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Lavan R, Knesl O. Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *J Small Anim Pract.* 2015; 56(9):572-6. doi: 10.1111/jsap.12389.
- Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, Gaffney P, Dela Cruz FN Jr, Wang C, Delwart E, Pesavento PA. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(4):534-41. doi: 10.3201/eid1904.121390.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25(11):1451-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.

- Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.* 1993; 55(1):60-3. doi: 10.1016/0034-5288(93)90035-e.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med (Auckl).* 2016; 7:91-100. doi: 10.2147/VMRR.S80971.
- Niu L, Wang Z, Zhao L, Wang Y, Cui X, Shi Y, Chen H, Ge J. Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014-2016. *Arch Virol.* 2020; 165(1):137-143. doi: 10.1007/s00705-019-04433-4.
- Pintore MD, Corbellini D, Chieppa MN, Vallino Costassa E, Florio CL, Varello K, Bozzetta E, Adriano D, Decaro N, Casalone C, Iulini B. Canine adenovirus type 1 and *Pasteurella pneumotropica* co-infection in a puppy. *Vet Ital.* 2016; 52(1):57-62. doi: 10.12834/VetIt.270.934.1.
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol.* 2017; 162(5):1447-1463. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.
- Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(23):4433-4448. doi: 10.1007/s00018-016-2299-6.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(2):379-84. doi: 10.1073/pnas.0406765102.
- Urbani L, Tryland M, Ehrich D, Fuglei E, Battilani M, Balboni A. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Norway. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(3):1283-1293. doi: 10.1111/tbed.13783.





### **STUDIO 3: INDAGINE MOLECOLARE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CIRCOVIRUS CANINO IN VOLPI ARTICHE (*VULPES LAGOPUS*) NELLE ISOLE SVALBARD E IN VOLPI ROSSE (*VULPES VULPES*) IN NORVEGIA SETTENTRIONALE**

[Pubblicato su *Transboundary and Emerging Diseases* il 2021, doi: 10.1111/tbed.13783]

#### **3.1 Obiettivi dello studio**

Gli obiettivi del lavoro sono stati: i) indagare la presenza del DNA di circovirus canino (CanineCV) in campioni di volpi artiche (*Vulpes lagopus*) provenienti dalle isole Svalbard (Norvegia) e in volpi rosse (*Vulpes vulpes*) provenienti dalla Norvegia settentrionale campionate nel periodo compreso tra il 1996 e il 2018; ii) caratterizzare geneticamente i virus identificati.

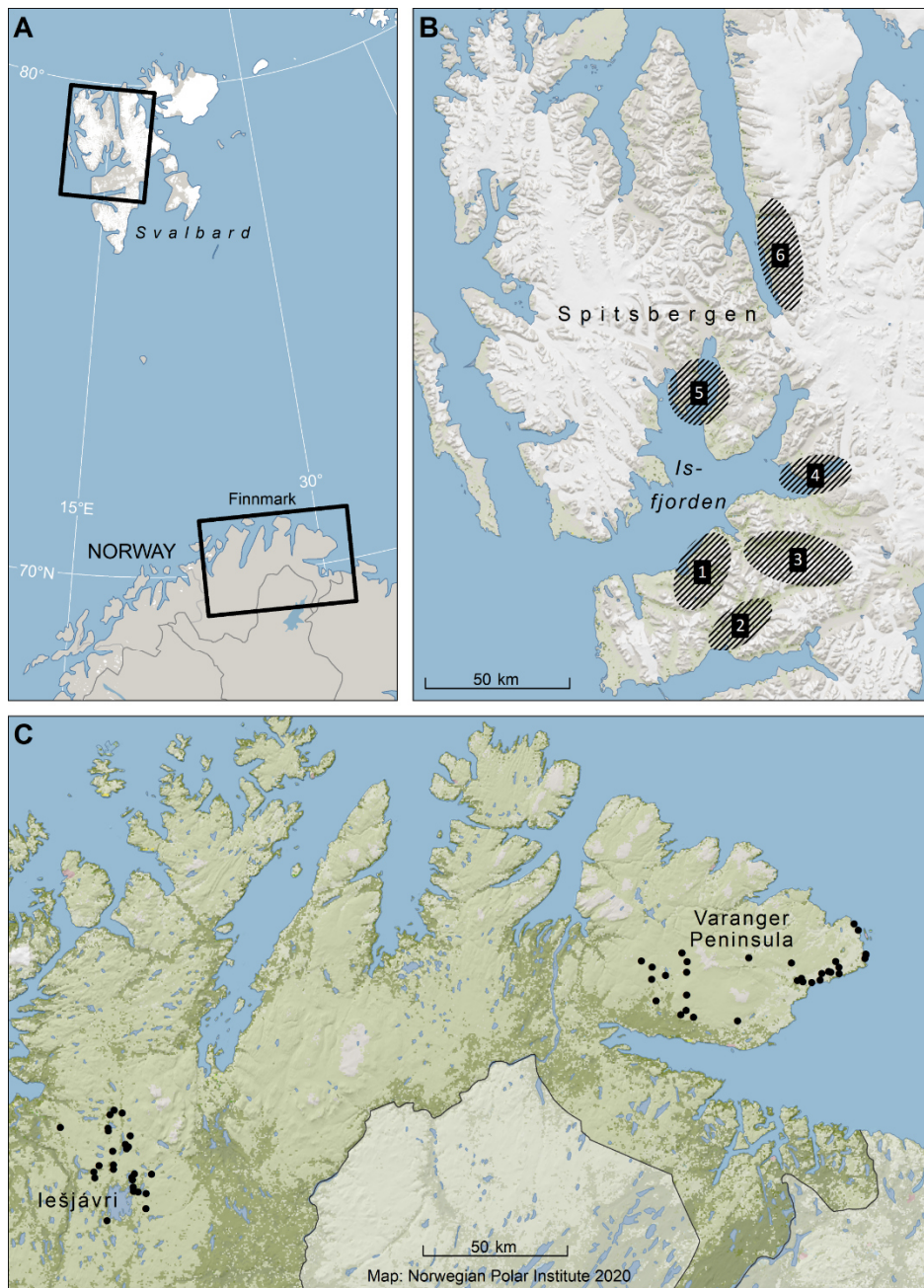
#### **3.2 Materiali e metodi**

##### *3.2.1 Area di studio e campionamento*

Cinquantuno volpi artiche abbattute dai cacciatori locali tra il 1996 e il 2001 mediante l'uso di trappole con esca durante l'annuale stagione di caccia (dal primo novembre al 15 marzo) a Spitsbergen, isole Svalbard, Norvegia (76–81°N, 15–25°E), sono state incluse nello studio (**Figura 3.1A**). Le carcasse sono state recuperate da sei differenti aree di campionamento (**Figura 3.1B**) e congelate prima di essere riferite al Norwegian Polar Institute per eseguire necropsia e campionare diversi tessuti tra cui fegato (n = 47) e/o milza (n = 49). La popolazione di volpi artiche era composta da 25 femmine, 24 maschi e da 2 soggetti di cui il sesso non era noto.

Cinquantanove volpi rosse abbattute dai cacciatori locali tra il 2014 e il 2018 durante la regolare stagione di caccia presso Finnmark County, Norvegia settentrionale, sono state incluse nello studio (**Figura 3.1A**). Le volpi rosse sono state campionate da due differenti aree geografiche: la penisola di Varanger (70.4°N, 29.5°E), situata al confine tra la zona Sub-Artica e la zona Basso-Artica, e la regione montuosa intorno al lago Iešjávri (69.6°N, 24.4°E, **Figura 3.1C**) e congelate a -20 °C prima di essere riferite alla sede UiT The Arctic, University of Norway, Tromsø, Norvegia per eseguire necropsia e campionare diversi tessuti tra cui fegato (n = 58) e/o milza (n = 58). La popolazione di volpi rosse era composta da 28 femmine e 31 maschi.

L'età è stata stimata contando gli strati del cemento dei denti canini sezionati (Grue e Jensen, 1976). L'età delle volpi artiche era compresa tra 1 e 11 anni (mediana pari a 1), mentre quella delle volpi rosse tra 1 e 8 anni (mediana pari a 2).



**Figura 3.1.** Aree di campionamento. (A) Sono illustrate le due principali aree di campionamento: Spitsbergen, isole Svalbard, Norvegia per le volpi artiche (*Vulpes lagopus*) e Finnmark County, Norvegia per le volpi rosse (*Vulpes vulpes*). (B) Sono illustrate le 6 aree di campionamento delle volpi artiche presso Spitsbergen, isole Svalbard. Area 1: Bjørndalen, Coles Bay, Colesdalen e Grumant; Area 2: Reindalen; Area 3: Adventdalen, Flowerdalen, Janssonhaugen, Koslodalen e Nordenskiöld Land; Area 4: Bjonehamna, Fredheim, Kapp Murdoch e Templet; Area 5: Kapp Wijk e Area 6: Austfjordnes. (C) Sono illustrate le due aree di campionamento delle volpi rosse presso Finnmark County: ecosistema Basso-Artico della penisola di Varanger ed ecosistema Sub-Artico della regione montuosa intorno al lago Iešjávri.

### 3.2.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dai tessuti campionati è stata eseguita utilizzando il kit Maxwell 16 Tissue DNA Purification (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e l'estrattore automatico Maxwell 16 System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) partendo da 25-50 mg di tessuto e seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore. Il DNA estratto è stato eluito in 300 µl di Elution

Buffer e stoccato a -20°C fino all'esecuzione dei test molecolari. Le estrazioni del DNA sono state eseguite presso il Department of Arctic and Marine Biology, UiT The Arctic, University of Norway, Tromsø, Norvegia e gli estratti ottenuti sono stati inviati presso il laboratorio dell'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, per eseguire le analisi molecolari.

### *3.2.3 Ricerca del DNA di circovirus canino*

La ricerca del DNA di CanineCV è stata eseguita con una specifica metodica molecolare di SYBR Green real-time PCR in grado di rilevare e quantificare l'acido nucleico del target di amplificazione, come descritto nel paragrafo 1.2.3 (**Studio 1**) (De Arcangeli et al., 2020). La reazione è stata eseguita testando in doppio almeno sei diluizioni scalari in base 10 dello standard plasmidico contenente il frammento di DNA target ed i campioni incogniti. Durante l'esecuzione della reazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi. I campioni sono stati considerati positivi quando entrambe le ripetizioni mostravano un incremento esponenziale nella curva di fluorescenza, una quantità superiore al LOD ed una curva di melting specifica.

### *3.2.4 Caratterizzazione genetica del genoma completo di circovirus canino*

I campioni risultati positivi per la presenza di DNA di CanineCV con la metodica di real-time PCR, sono stati caratterizzati geneticamente mediante amplificazione, sequenziamento ed analisi bioinformatica dell'intero genoma virale. Per le volpi che mostravano specifici prodotti di real-time PCR in più di un organo, è stata scelta la matrice biologica che mostrava quantità di DNA target più elevata e assenza di prodotti aspecifici per le successive analisi.

Il genoma completo di CanineCV è stato amplificato mediante utilizzo di RCA ed end-point PCR (De Arcangeli et al., 2020) con i protocolli di amplificazione descritti nel paragrafo 1.2.4 (**Studio 1**). La end-point PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente un enzima DNA polimerasi proofreading ed il termociclature SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il ceppo di referenza 09-10F/2011 (Genbank ID: MH454599) è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione delle reazioni, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nelle reazioni

per escludere eventuali falsi positivi. Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (p/v) addizionato con Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Chiyoda-ku, Tokyo, Giappone) in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp o 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione.

Le sequenze ottenute sono state assemblate, allineate con sequenze di referenza di CanineCV presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> data di accesso: 02/2020, **Allegato 3.1**) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche.

L'analisi filogenetica è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche del genoma completo e sulle sequenze aminoacidiche dei geni Rep (proteina associata alla replicazione virale) e Cap (proteina del capsido virale) concatenati usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). Gli alberi filogenetici sono stati costruiti usando il metodo Maximum Likelihood e i modelli General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili e Jones-Taylor-Thornton (JTT) con distribuzione gamma e siti invariabili rispettivamente per l'allineamento nucleotidico e quello aminoacidico. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata mediante test di bootstrap eseguendo 1000 ripetizioni dell'analisi.

### **3.3 Risultati**

#### *3.3.1 Ricerca del DNA di circovirus canino*

Il DNA di CanineCV è stato rilevato in 11/51 (21.6%) volpi artiche e in 10/59 (16.9%) volpi rosse. Gli ampliconi specifici per CanineCV sono stati generati per entrambi gli organi campionati (fegato e milza) da 9 delle 11 volpi artiche risultate positive e da 5 delle 10 volpi rosse risultate positive. Per tutte le rimanenti volpi, gli ampliconi sono stati generati solo dalla milza, ad eccezione di una volpe artica in cui il DNA target è stato rilevato solamente nel fegato. La mediana della quantità di copie di DNA di CanineCV per microlitro (copie/µl) di estratto di DNA da milza e fegato era di  $2.3 \times 10^4$  (range:  $7.7 \times 10^1 - 1.7 \times 10^6$ ) nelle volpi artiche e  $5.1 \times 10^2$  (range:  $6.7 \times 10^1 - 3.3 \times 10^5$ ) nelle volpi

rosse. La quantità mediana del DNA virale rilevata negli estratti dei due tessuti era dello stesso ordine di grandezza sia per le volpi artiche sia per le volpi rosse. I dati relativi al segnalamento e alla positività al DNA di CanineCV delle volpi incluse nello studio sono riportate in modo riassuntivo in **Tabella 3.1**.

**Tabella 3.1.** Dati di segnalamento e positività al DNA di CanineCV delle volpi artiche (*Vulpes lagopus*) e delle volpi rosse (*Vulpes vulpes*) incluse nello studio.

Variabili	Volpi artiche			Volpi rosse		
	Positivi	Negativi	Totali	Positivi	Negativi	Totali
Numero di volpi	11	40	51	10	49	59
Sesso						
Maschi	7	17	24	6	25	31
Femmine	4	21	25	4	24	28
ND	-	2	2	-	-	-
Origine geografica						
Isole Svalbard (Norvegia)						
Adventdalen	-	1	1	-	-	-
Austfjordnes	3	8	11	-	-	-
Bjonehamna	1	-	1	-	-	-
Bjørndalen	-	1	1	-	-	-
Coles Bay	1	-	1	-	-	-
Colesdalen/Grumant	3	5	8	-	-	-
Flowerdalen	-	1	1	-	-	-
Fredheim	-	1	1	-	-	-
Janssonhaugen	1	2	3	-	-	-
Kapp Wijk	1	11	12	-	-	-
Koslodalen	-	1	1	-	-	-
Kapp Murdoch	-	1	1	-	-	-
Nordenskiöld Land	-	5	5	-	-	-
Reindalen	-	1	1	-	-	-
Templet	1	-	1	-	-	-
ND	-	2	2	-	-	-
Finnmark County (Norvegia)						
Iešjávri	-	-	-	7	19	26
Penisola Varanger	-	-	-	3	30	33
Anno di campionamento						
1996	1	3	4	-	-	-
1997	6	23	29	-	-	-
1998	1	2	3	-	-	-
1999	3	11	14	-	-	-
2001	-	1	1	-	-	-
2014	-	-	-	2	13	15
2015	-	-	-	2	10	12
2016	-	-	-	1	9	10
2017	-	-	-	3	10	13
2018	-	-	-	2	7	9
Età (anni) <sup>a</sup>	1 [1-3]	1 [1-11]	1 [1-11]	2 [1-3]	2 [1-8]	2 [1-8]

<sup>a</sup> Dati riportati come mediana e [range].

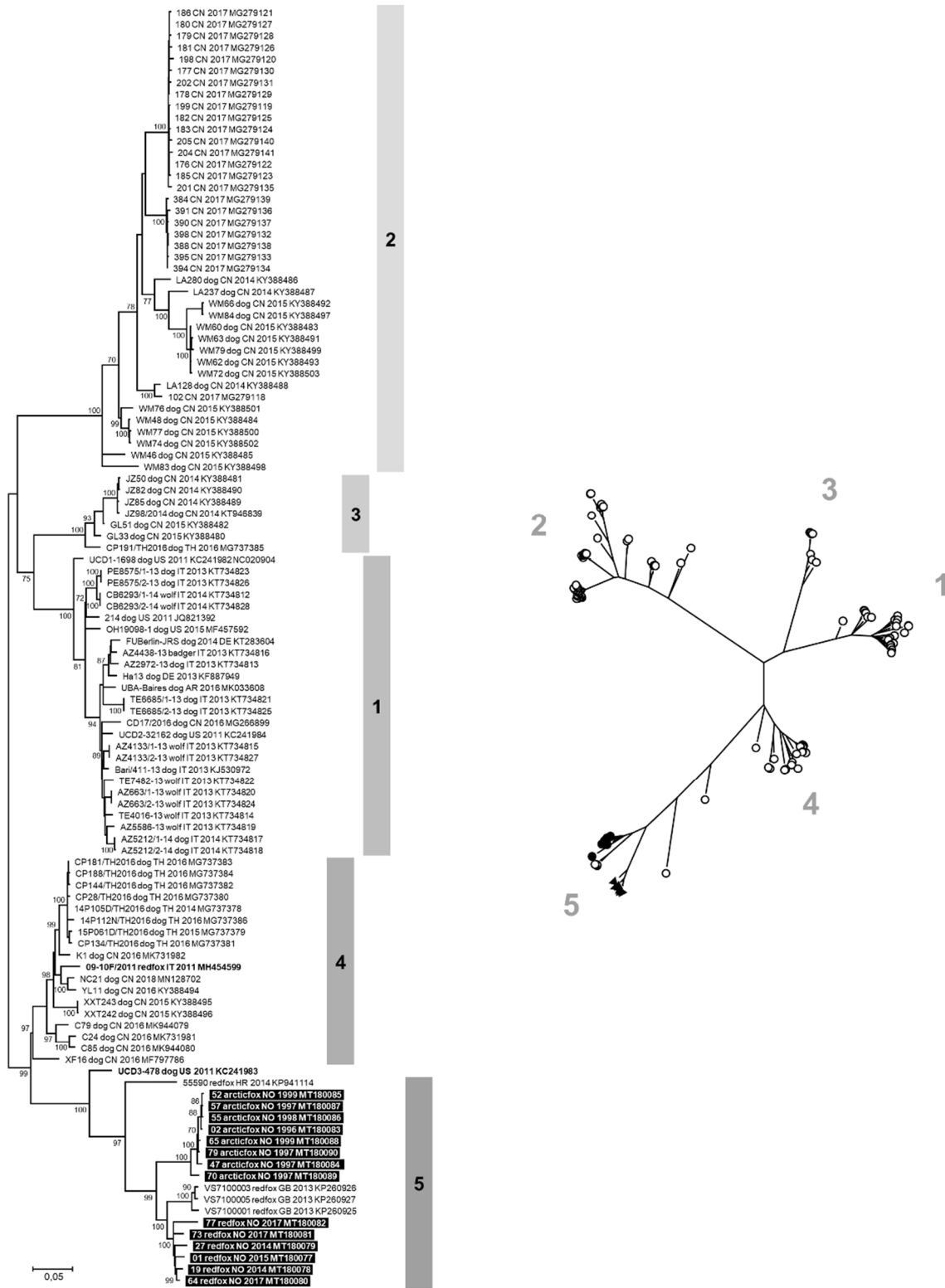
ND: dato non disponibile.

### 3.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

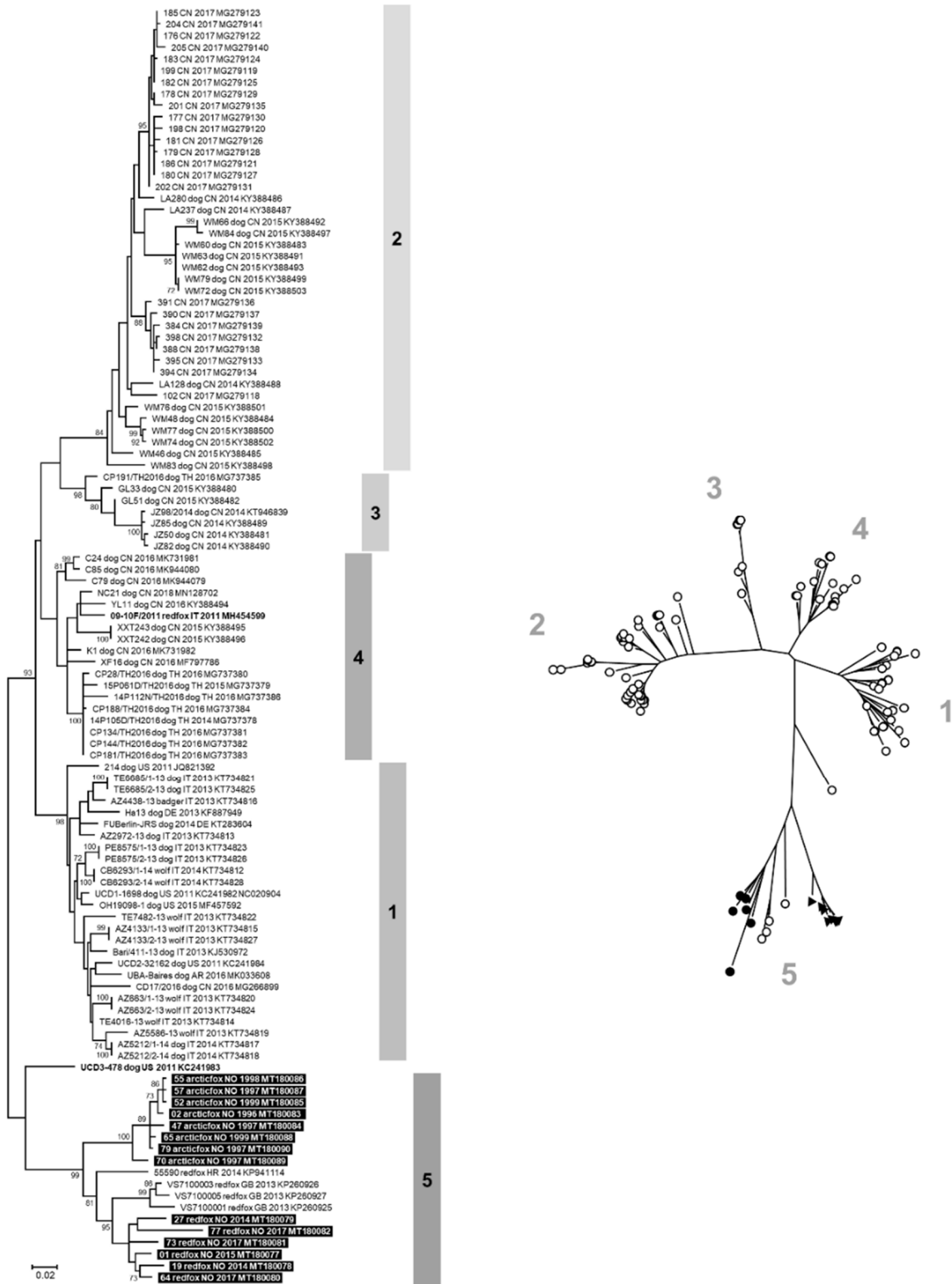
Le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV sono state ottenute da 8 volpi artiche e 6 volpi rosse (GenBank ID: MT180077- MT180090, **Allegato 3.1**). Il genoma dei 14 CanineCV sequenziati in questo studio era di 2063 nucleotidi di lunghezza. La struttura del genoma era la medesima descritta nel paragrafo 1.3.3 (**Studio 1**). L'allineamento nucleotidico tra le sequenze di

CanineCV ottenute in questo studio e 96 sequenze di riferimento ottenute da Genbank (**Allegato 3.1**) ha mostrato una identità nucleotidica complessiva compresa tra 80.8 e 100%. Tutte le sequenze ottenute in questo studio erano diverse tra di loro e formavano due distinti gruppi, uno composto dalle sequenze di CanineCV identificate nelle volpi artiche e uno composto dalle sequenze di CanineCV identificate nelle volpi rosse, dal momento che avevano una identità nucleotidica più elevata all'interno dei gruppi (rispettivamente 97.7-99.8% e 94.3-99.3%) rispetto a quella tra i due gruppi (91.9-93.9%).

I due alberi filogenetici costruiti con le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV (**Figura 3.2**) e con le sequenze aminoacidiche dei geni Rep e Cap concatenati (**Figura 3.3**) mostrava una netta suddivisione dei virus in 5 gruppi, come riportato nel paragrafo 1.3.3 (**Studio 1**). Le sequenze di CanineCV ottenute in questo studio erano tutte incluse nel gruppo 5 insieme ad altri CanineCV identificati in volpi in Gran Bretagna (Bexton et al., 2015). Sulla base delle relazioni filogenetiche, dell'origine geografica e dell'anno di campionamento, all'interno del gruppo 5 è stato possibile evidenziare due ulteriori raggruppamenti composti dai virus identificati rispettivamente nelle volpi artiche e nelle volpi rosse. Faceva eccezione il ceppo 55590 identificato in una volpe rossa in Croazia nel 2014 (GenBank ID: KP941114, Lojkić et al., 2016) che formava un ramo monofiletico distinto all'interno del gruppo 5 (**Figura 3.2**). La sequenza di CanineCV ottenuta da un cane in USA nel 2011 (GenBank ID: KC241983, Li et al., 2013) non raggruppava in nessuno dei 5 gruppi, né nell'analisi eseguita con le sequenze nucleotidiche del genoma intero né in quella eseguita con tra le sequenze aminoacidiche dei geni Rep e Cap concatenati. I valori di identità nucleotidica calcolati per le sequenze di CanineCV appartenenti allo stesso cluster e tra differenti cluster sono riportati in **Tabella 3.2**.



**Figura 3.2.** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del genoma completo di CanineCV ottenute in questo studio e di 96 ceppi di referenza ottenuti da GenBank (**Allegato 3.1**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018), il metodo Maximum Likelihood e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili. I valori di bootstrap, determinati su 1000 replicati, superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in nero: sequenze nucleotidiche di CanineCV generate in questo studio. In grassetto: Sequenze di CanineCV 09-10F/2011 (MH454599) e CanineCV UCD3-478 (KC241983). A destra è illustrato lo stesso albero in stile radiato (triangoli neri: CanineCV identificati nelle volpi artiche incluse in questo studio, cerchi neri: CanineCV identificati nelle volpi rosse incluse in questo studio, cerchi vuoti: sequenze di referenza di CanineCV). I numeri in grigio indicano i gruppi genetici.



**Figura 3.3.** Albero filogenetico costruito con le sequenze aminoacidiche concatenate dei geni Rep e Cap del CanineCV ottenute in questo studio e di 96 ceppi di referenza ottenuti da GenBank (**Allegato 3.1**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018), il metodo Maximum Likelihood e il modello Jones-Taylor-Thornton (JTT) con distribuzione gamma e siti invariabili. I valori di bootstrap, determinati su 1000 replicati, superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni aminoacidiche. Evidenziate in nero: sequenze di CanineCV generate in questo studio. In grassetto: Sequenze di CanineCV 09-10F/2011 (MH454599) e CanineCV UCD3-478 (KC241983). A destra è illustrato lo stesso albero in stile radiato (triangoli neri: CanineCV identificati nelle volpi artiche incluse in questo studio, cerchi neri: CanineCV identificati nelle volpi rosse incluse in questo studio, cerchi vuoti: sequenze di referenza di CanineCV). I numeri in grigio indicano i gruppi genetici.



**Tabella 3.2.** Identità nucleotidiche (%) tra le sequenze del genoma completo di CanineCV (2063-2064 nucleotidi) appartenenti ai cluster indentificati nell'analisi filogenetica.

	<b>Gruppo 1</b>	<b>Gruppo 2</b>	<b>Gruppo 3</b>	<b>Gruppo 4</b>	<b>Gruppo 5</b>	<b>VA</b>	<b>VR</b>	<b>UCD3-478</b>
<b>Gruppo 1</b>	93.5-100	83.8-87.3	88.7-90.4	85.9-92.6	82.5-84.9	82.6-84.7	82.5-84.9	84.6-86.8
<b>Gruppo 2</b>	83.8-87.3	89.1-99.9	85.1-90.1	84.8-90.6	80.8-83.6	81.2-83	80.8-83.6	81.9-84.6
<b>Gruppo 3</b>	88.7-90.4	85.1-90.1	96.4-99.8	85.9-89.8	82.1-83.8	82.4-83.4	82.1-83.8	84.3-84.5
<b>Gruppo 4</b>	85.9-92.6	84.8-90.6	85.9-89.8	92.4-99.9	84.4-86.6	84.4-85.8	84.6-86.6	88.8-90.9
<b>Gruppo 5</b>	82.5-84.9	80.8-83.6	82.1-83.8	84.4-86.6	91.9-99.8	-	-	88.8-89.9
<b>VA</b>	82.6-84.7	81.2-83	82.4-83.4	84.4-85.8	-	97.7-99.8	91.9-93.9	88.9-89.1
<b>VR</b>	82.5-84.9	80.8-83.6	82.1-83.8	84.6-86.6	-	91.9-93.9	94.3-99.3	88.9-89.9
<b>UCD3-478</b>	84.6-86.8	81.9-84.6	84.3-84.5	88.8-90.9	88.8-89.9	88.9-89.1	88.9-89.9	100

Le sequenze utilizzate per l'allineamento sono riportate nell'**Allegato 3.1**. I dati sono espressi come range dal valore di identità minimo al valore massimo. L'identità nucleotidica tra le sequenze di CanineCV identificate in questo studio nelle volpi artiche e nelle volpi rosse e le sequenze di CanineCV all'interno del gruppo 5 non sono riportate in quanto esse stesse appartenevano al gruppo 5. In grigio: valori ottenuti dal confronto tra sequenze di CanineCV appartenenti allo stesso gruppo.

VA: sequenze di CanineCV identificate nelle volpi artiche incluse in questo studio; VR: sequenze di CanineCV identificate nelle volpi rosse incluse in questo studio.

### 3.4 Discussione

Il CanineCV è stato descritto per la prima volta nel 2012 da Kapoor e colleghi (2012) in cani la cui storia clinica non era nota. Negli anni seguenti il virus è stato identificato anche in volpi, lupi e tassi. Ad oggi non è ancora stato chiarito il ruolo patogenetico del CanineCV nel determinare potenziali forme enteriche nel cane e neurologiche nei selvatici (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Hsu et al., 2016; Zaccaria et al., 2016; Bexton et al. 2015; Li et al., 2013). Gli studi relativi alla diffusione del virus nei carnivori domestici e selvatici nelle diverse parti del mondo sono molto scarsi ed inoltre, sono disponibili pochi dati di sequenza, nessuno antecedente al 2011.

L'obiettivo di questo studio è stato di investigare la circolazione dell'infezione da CanineCV in volpi artiche provenienti dalle isole Svalbard (Norvegia) e in volpi rosse provenienti dalla Norvegia settentrionale, due aree geografiche mai indagate in precedenza sulla presenza di questo agente infettivo, campionate dal 1996 al 2018 per cercare di ottenere informazioni antecedenti al 2011. Obiettivo secondario è stato quello di caratterizzare geneticamente i virus identificati. Il DNA di CanineCV è stato rilevato in campioni di fegato e/o milza di 11/51 volpi artiche e 10/59 volpi rosse. La quantità mediana di DNA virale rilevata mediante real-time PCR era maggiore nei tessuti delle volpi artiche rispetto a quella delle volpi rosse. Tuttavia, l'impossibilità di correlare il numero di copie di DNA di CanineCV rilevato per microlitro di estratto alla quantità esatta di tessuto estratto e l'estrema variabilità del tempo trascorso dalla morte delle volpi al momento del campionamento, con potenziale degradazione dei tessuti, non consentono di trarre conclusioni. Sono necessari ulteriori studi per valutare meglio questo aspetto. Il rilevamento del DNA di CanineCV nelle volpi artiche campionate tra il 1996 e il 2001 e incluse in questo studio rappresenta la prima testimonianza in letteratura per questa specie selvatica e dimostra che il virus circolava nelle volpi artiche da almeno 15 anni prima della sua scoperta nel cane domestico negli USA (Kapoor et al., 2012). Di conseguenza,

è possibile ipotizzare che i carnivori selvatici possano aver ospitato un progenitore del CanineCV oggi circolante nel cane, come ipotizzato per il CPV-2, un virus a DNA a singolo filamento molto piccolo e simile al CanineCV, in cui gli ospiti selvatici hanno svolto un ruolo importante nell'emergenza dell'infezione nei cani (Allison et al., 2013; Allison et al., 2012; Frölich et al., 2005; Truyen et al., 1995). La frequenza di positività al DNA di CanineCV nelle volpi rosse in questo studio (10/59) è più basso rispetto a quanto riportato nel Regno Unito (7/15 in volpi rosse sane e 13/17 in volpi rosse con segni neurologici, Bexton et al., 2015) e più alto rispetto a quanto riportato in Italia da De Arcangeli e colleghi (1/32, 2020) e da Zaccaria e colleghi (0/24, 2016). Queste discrepanze nella frequenza di infezione da CanineCV nelle volpi rosse potrebbero essere dovute alla differente circolazione virale nelle aree geografiche indagate, ma anche allo stato di salute degli animali campionati o al tipo di matrice biologica testata nei diversi studi. Infatti sono state testate varie matrici biologiche di volpi per rilevare la presenza del DNA di CanineCV con metodiche molecolari tra cui siero, feci e molti organi interni (milza, tonsille, linfonodi, fegato, intestino, polmone, reni e cervello) (De Arcangeli et al., 2020; Zaccaria et al., 2016; Bexton et al., 2015), ma la limitata disponibilità di informazioni sulla patogenesi e sulle manifestazioni cliniche del CanineCV negli animali selvatici in letteratura rende difficile scegliere la matrice biologica ottimale per la ricerca del DNA virale. Dall'allineamento del genoma completo effettuato in questo studio, tutti i CanineCV identificati in cani, volpi, lupi e tassi mostravano una identità nucleotidica  $\geq 80.8\%$ . La soglia di identità nucleotidica che delimita l'appartenenza ad una medesima specie all'interno della famiglia *Circoviridae* è pari all'80% (Breitbart et al., 2017; Rosario et al., 2017), pertanto questo risultato conferma l'esistenza di un'unica specie di circovirus canino, che include tutti virus ad oggi identificati in cani, volpi, lupi e tassi e anche i virus identificati in questo studio. L'analisi filogenetica ha evidenziato un raggruppamento dei CanineCV in 5 gruppi, ad eccezione del ceppo UCD3-478 che potrebbe rappresentare una variante intermedia tra i gruppi 4 e 5 oppure l'unico virus ad oggi sequenziato di un ulteriore sesto gruppo. Quattro dei cinque gruppi (da 1 a 4) corrispondono ai genotipi proposti da Niu e colleghi (2020). Un quinto gruppo, il gruppo 5, composto solamente dai CanineCV identificati nelle volpi, inclusi i virus identificati in questo studio, conferma l'esistenza di una preferenziale suddivisione in base all'area geografica ed alla specie ospite indagate (Niu et al., 2020). In particolare, nel nostro studio è stata dimostrata l'esistenza di un gruppo di virus che infetta tipicamente le volpi, filogeneticamente distinguibile dai virus che infettano cani, lupi e tassi, come suggerito in precedenza da Zaccaria e collaboratori (2016). Tuttavia, non tutti i CanineCV identificati nelle volpi raggruppavano insieme all'interno del gruppo 5, infatti il ceppo 09-10F/2011 identificato in una volpe clusterizzava nel gruppo 4 con altri virus identificati nei cani. Pertanto, le sequenze di CanineCV non raggruppano strettamente sulla base della specie ospite. Ulteriori indagini per valutare la suscettibilità

dei carnivori domestici e selvatici nei confronti di CanineCV geneticamente diversi sono necessarie. All'interno del gruppo 5, i CanineCV identificati in volpi artiche e volpi rosse formavano due cluster distinti. La distanza genetica potrebbe essere spiegata dall'isolamento geografico delle due popolazioni di volpi investigate in questo studio. Infatti, le volpi rosse dalla Norvegia settentrionale non hanno la possibilità di entrare in diretto contatto con le volpi artiche nelle isole Svalbard (la distanza in linea d'aria è pari a 835 km sul Mare di Barents, che non è coperto dai ghiacci marini), rendendo la trasmissione virale tra le due specie impossibile in questa area geografica. Non esistono neppure vie di trasmissione tra le volpi artiche delle isole Svalbard e le volpi rosse in Gran Bretagna e Croazia in cui sono stati identificati gli altri CanineCV inclusi nel gruppo 5. Tuttavia, una trasmissione virale indiretta tra le popolazioni di volpi artiche e volpi rosse potrebbe verificarsi tramite migrazione delle volpi artiche dalle isole Svalbard ad altre regioni artiche in cui sono presenti le volpi rosse attraverso i blocchi di ghiacci marini (Mørk et al., 2011; Norén et al., 2011; Geffen et al., 2007; Henttonen et al., 2001) o attraverso il trasporto di cani domestici (inclusi i cani da slitta) dalla terraferma norvegese alle isole Svalbard. Un'altra ipotesi che potrebbe spiegare la diversità genetica emersa tra i CanineCV identificati nelle volpi artiche e nelle volpi rosse, potrebbe essere l'acquisizione di mutazioni nel tempo trascorso tra il campionamento delle due specie.

### **3.5 Conclusione**

Nel presente studio è stata riportata l'identificazione del DNA di CanineCV in volpi artiche provenienti dalle isole Svalbard (Norvegia), dal 1996, quindici anni prima del suo primo rilevamento nel cane domestico negli USA. L'analisi di sequenza ha mostrato che i CanineCV identificati nelle volpi artiche provenienti dalle isole Svalbard e nelle volpi rosse provenienti dalla Norvegia settentrionale formano due differenti cluster all'interno di un gruppo di virus filogeneticamente distinti dai CanineCV che infettano altre specie di carnivori domestici e selvatici. Ad oggi, il ruolo patogenetico del CanineCV nei carnivori selvatici non è noto e non si sa con certezza se possa avvenire la trasmissione del virus tra animali selvatici e cani domestici. Tuttavia, è necessaria una costante sorveglianza epidemiologica per studiare l'evoluzione del CanineCV negli animali selvatici e per stimare l'eventuale minaccia rappresentata dal CanineCV per la salute dei cani domestici e la conservazione dei carnivori selvatici.

### 3.6 Bibliografia

- Allison AB, Kohler DJ, Fox KA, Brown JD, Gerhold RW, Shearn-Bochsler VI, Dubovi EJ, Parrish CR, Holmes EC. Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. *J Virol.* 2013; 87(4):2342-7. doi: 10.1128/JVI.02428-12.
- Allison AB, Harbison CE, Pagan I, Stucker KM, Kaelber JT, Brown JD, Ruder MG, Keel MK, Dubovi EJ, Holmes EC, Parrish CR. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. *J Virol.* 2012; 86(2):865-72. doi: 10.1128/JVI.06187-11.
- Anderson A, Hartmann K, Leutenegger CM, Proksch AL, Mueller RS, Unterer S. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec.* 2017; 180(22):542. doi: 10.1136/vr.103926.
- Bexton S, Wiersma LC, Getu S, van Run PR, Verjans GM, Schipper D, Schapendonk CM, Bodewes R, Oldroyd L, Haagmans BL, Koopmans MM, Smits SL. Detection of circovirus in foxes with meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(7):1205-8. doi: 10.3201/eid2107.150228.
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, Ictv Report Consortium. ICTV Virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol.* 2017; 98(8):1997-1998. doi: 10.1099/jgv.0.000871.
- De Arcangeli S, Balboni A, Kaehler E, Urbani L, Verin R, Battilani M. Genomic characterization of canine circovirus detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Italy using a new real-time PCR assay. *J Wildl Dis.* 2020; 56(1):239-242.
- Dowgier G, Lorusso E, Decaro N, Desario C, Mari V, Lucente MS, Lanave G, Buonavoglia C, Elia G. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol.* 2017; 204:54-58. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.007.
- Frölich K, Streich WJ, Fickel J, Jung S, Truyen U, Hentschke J, Dedek J, Prager D, Latz N. Epizootiologic investigations of parvovirus infections in free-ranging carnivores from Germany. *J Wildl Dis.* 2005; 41(1):231-5. doi: 10.7589/0090-3558-41.1.231.
- Geffen E, Waidyaratne S, Dalén L, Angerbjörn A, Vila C, Hersteinsson P, Fuglei E, White PA, Goltsman M, Kapel CM, Wayne RK. Sea ice occurrence predicts genetic isolation in the Arctic fox. *Mol Ecol.* 2007; 16(20):4241-55. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03507.x.
- Grue H, Jensen B. Annual cementum structures in canine teeth in Arctic foxes (*Alopex lagopus L.*) from Greenland and Denmark. *Danish Review of Game Biology.* 1976; 10(3), 1–12.
- Henttonen H, Fuglei E, Gower CN, Haukisalmi V, Ims RA, Niemimaa J, Yoccoz NG. *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitology.* 2001; 123(Pt 6):547-52. doi: 10.1017/s0031182001008800.
- Hsu HS, Lin TH, Wu HY, Lin LS, Chung CS, Chiou MT, Lin CN. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res.* 2016; 12(1):116. doi: 10.1186/s12917-016-0722-8.
- Kapoor A, Dubovi EJ, Henriquez-Rivera JA, Lipkin WI. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol.* 2012; 86(12):7018. doi: 10.1128/JVI.00791-12.

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Li L, McGraw S, Zhu K, Leutenegger CM, Marks SL, Kubiski S, Gaffney P, Dela Cruz FN Jr, Wang C, Delwart E, Pesavento PA. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(4):534-41. doi: 10.3201/eid1904.121390.
- Lojkić I, Biđin M, Prpić J, Šimić I, Krešić N, Bedeković T. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 45:10-5. doi: 10.1016/j.cimid.2016.01.005.
- Mørk T, Bohlin J, Fuglei E, Åsbakk K, Tryland M. Rabies in the arctic fox population, Svalbard, Norway. *J Wildl Dis.* 2011; 47(4):945-57. doi: 10.7589/0090-3558-47.4.945.
- Niu L, Wang Z, Zhao L, Wang Y, Cui X, Shi Y, Chen H, Ge J. Detection and molecular characterization of canine circovirus circulating in northeastern China during 2014-2016. *Arch Virol.* 2020; 165(1):137-143. doi: 10.1007/s00705-019-04433-4.
- Norén K, Carmichael L, Fuglei E, Eide NE, Hersteinsson P, Angerbjörn A. Pulses of movement across the sea ice: population connectivity and temporal genetic structure in the arctic fox. *Oecologia.* 2011; 166(4):973-84. doi: 10.1007/s00442-011-1939-7.
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol.* 2017; 162(5):1447-1463. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y.
- Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol.* 1995; 69(8):4702-10. doi: 10.1128/JVI.69.8.4702-4710.1995.
- Zaccaria G, Malatesta D, Scipioni G, Di Felice E, Campolo M, Casaccia C, Savini G, Di Sabatino D, Lorusso A. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology.* 2016; 490:69-74. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.007.



## STUDIO 4: CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI PARVOVIRUS CANINO DI TIPO 2 IN CANI CON GASTROENTERITE ACUTA IN ROMANIA

[Pubblicato su *BMC Veterinary Research* il 2021, doi: 10.1186/s12917-021-02918-6]

### 4.1 Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è stato quello di caratterizzare geneticamente i virus appartenenti alla specie *Carnivore protoparvovirus 1* rilevati in cani con segni clinici di gastroenterite acuta in Romania.

### 4.2 Materiali e metodi

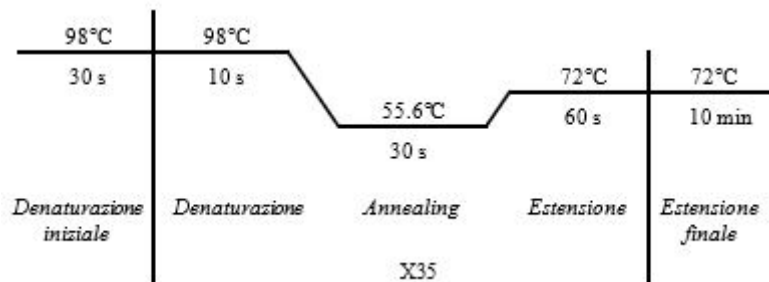
#### 4.2.1 Disegno dello studio e campionamento

In questo studio, è stata investigata la presenza del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* in campioni fecali di dieci cani affetti da gastroenterite acuta e risultati positivi al test antigenico rapido per parvovirus canino (CPV-2) (kit Rapid CPV Ag Test, VetExpert, Łomianki, Polonia e kit Rapid CPV Ag Test, Bionote, Hwaseong-si, Corea del Sud) eseguito in una clinica veterinaria privata (Professionalvet) o presso il Dipartimento di Scienze Cliniche, Università di Scienze Agrarie e Medicina Veterinaria (USAMV), Cluj-Napoca, Romania, nel periodo compreso tra aprile e novembre 2019. L'intero gene VP2 di parvovirus è stato amplificato, sequenziato ed analizzato allo scopo di caratterizzare geneticamente i virus identificati nei cani inclusi nello studio.

#### 4.2.2 Ricerca del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*

L'estrazione del DNA dalle feci è stata eseguita presso i laboratori dell'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, utilizzando il kit Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania) seguendo le istruzioni del produttore, come illustrato nel paragrafo 1.2.2 (**Studio 1**). Il DNA estratto è stato eluito in 100 µl di buffer di eluizione e stoccato a -20 °C fino alle successive analisi di laboratorio. Il DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* è stato ricercato usando una end-point PCR che amplificava un frammento di 1887 nucleotidi, comprendente l'intero gene VP2 (1755 nucleotidi) codificante per la principale proteina del capsido virale, con la coppia di primer VP2\_2684-2705\_For: 5'-ACC AAC TAA AAG AAG TAA ACC A-3' e VP2\_4544-4570\_Rev: 5'-GTA ATA AAC ATA AAA ACA TAG TAA GTA-3'. La end-point PCR è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente un enzima DNA polimerasi proofreading ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mix di reazione è riportata in **Tabella 1.5 (Studio 1)**. Il profilo termico è

riportato in **Figura 4.1**. Il ceppo di riferimento di FPV 1033/2009 (Battilani et al., 2011), è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione della reazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi



**Figura 4.1.** Ciclo di amplificazione per generare un frammento di 1887 nucleotidi di *Carnivore protoparvovirus 1*, comprensivo del gene VP2 completo.

Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (p/v) addizionato con Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Chiyoda-ku, Tokyo, Giappone) in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

#### 4.2.3 Analisi di sequenza

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione ed un terzo primer interno, primer 41 (5'-GCC CTT GTG TAG ACG C-3', Truyen et al., 1998). Le sequenze del gene VP2 completo ottenute sono state assemblate, analizzate con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, data di accesso: 12/03/2021), allineate con 78 sequenze di riferimento presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, data di accesso: 03/2021, **Allegato 4.1**) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche. L'analisi filogenetica è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State



University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo Neighbor-Joining e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. La robustezza dell'albero filogenetico è stata stimata mediante test di bootstrap con 1000 ripetizioni dell'analisi.

### 4.3 Risultati

#### 4.3.1 Popolazione di studio e ricerca del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*

Tutti i 10 cani con gastroenterite acuta sono risultati positivi al DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* (ID da 157/2019 a 166/2019, **Tabella 4.1**). Sette su 10 cani erano avevano ricevuto una singola somministrazione di vaccino vivo attenuato o inattivato contenente l'originale tipo CPV-2 (**Tabella 4.1**). Gli altri 3/10 cani non erano vaccinati.

**Tabella 4.1.** Dati di segnalamento e stato vaccinale dei cani risultati positivi al DNA di *Carnivore protoparvovirus 1*.

Cani	Campionamento	Razza	Sesso	Età (mesi)	Origine geografica	Vaccinazione <sup>a</sup>
157	28/04/2019	Meticcio	M	6	Cluj-Napoca (RO)	No
158	16/08/2019	Meticcio	F	7	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
159	10/07/2019	Meticcio	F	6	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
160	23/08/2019	Meticcio	F	6	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
161	03/08/2019	German shepherd	F	3	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
162	28/07/2019	Meticcio	M	72	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
163	13/07/2019	Jack Russell terrier	M	2	Cluj-Napoca (RO)	No
164	26/07/2019	Siberian husky	F	4	Cluj-Napoca (RO)	Si (A)
165	27/11/2019	Meticcio	M	2	Cluj-Napoca (RO)	No
166	29/11/2019	American Staffordshire terrier	F	5	Cluj-Napoca (RO)	Si (B)

<sup>a</sup> Cani sottoposti ad una sola somministrazione vaccinale nella prima settimana di vita: A) vaccino CPV-2 vivo attenuato o B) vaccino CPV-2 inattivato  
F: femmina, M: maschio, RO: Romania.

#### 4.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

Le sequenze nucleotidiche del gene VP2 completo (1755 nucleotidi) sono state ottenute da tutti i virus identificati ed erano identiche tra loro (GenBank ID: MW659469 - MW659478, **Allegato 4.1**). L'allineamento nucleotidico è stato effettuato tra le sequenze di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute in questo studio e 78 sequenze di referenza reperite sul database Genbank (**Allegato 4.1**). Sulla base dei residui aminoacidici critici della proteina VP2, i virus identificati sono stati classificati come CPV-2c, avendo l'aminoacido glutammato in posizione 426 (codone GAA, Buonavoglia et al., 2001). L'analisi effettuata con l'interfaccia web di BLAST delle sequenze ottenute ha permesso di identificare 32 sequenze di referenza di CPV-2c della stessa lunghezza e con identità nucleotidica del 100% (**Tabella 4.2**) e molte altre sequenze di referenza di CPV-2 che mostravano identità nucleotidica  $\geq 99.89\%$ , riportate dal 2013 al 2020 in molte regioni asiatiche, in Italia e in Nigeria (Chen et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Ogbu et al., 2020; Charoenkul et al., 2019; Mira et al., 2019; Zhuang et al., 2019; Mira et al., 2018; Zhao et al., 2017; Wang et al., 2016). Inoltre, è stata rilevata una identità nucleotidica del 99.89% tra le sequenze ottenute nel nostro studio e un ceppo di CPV-2c identificato

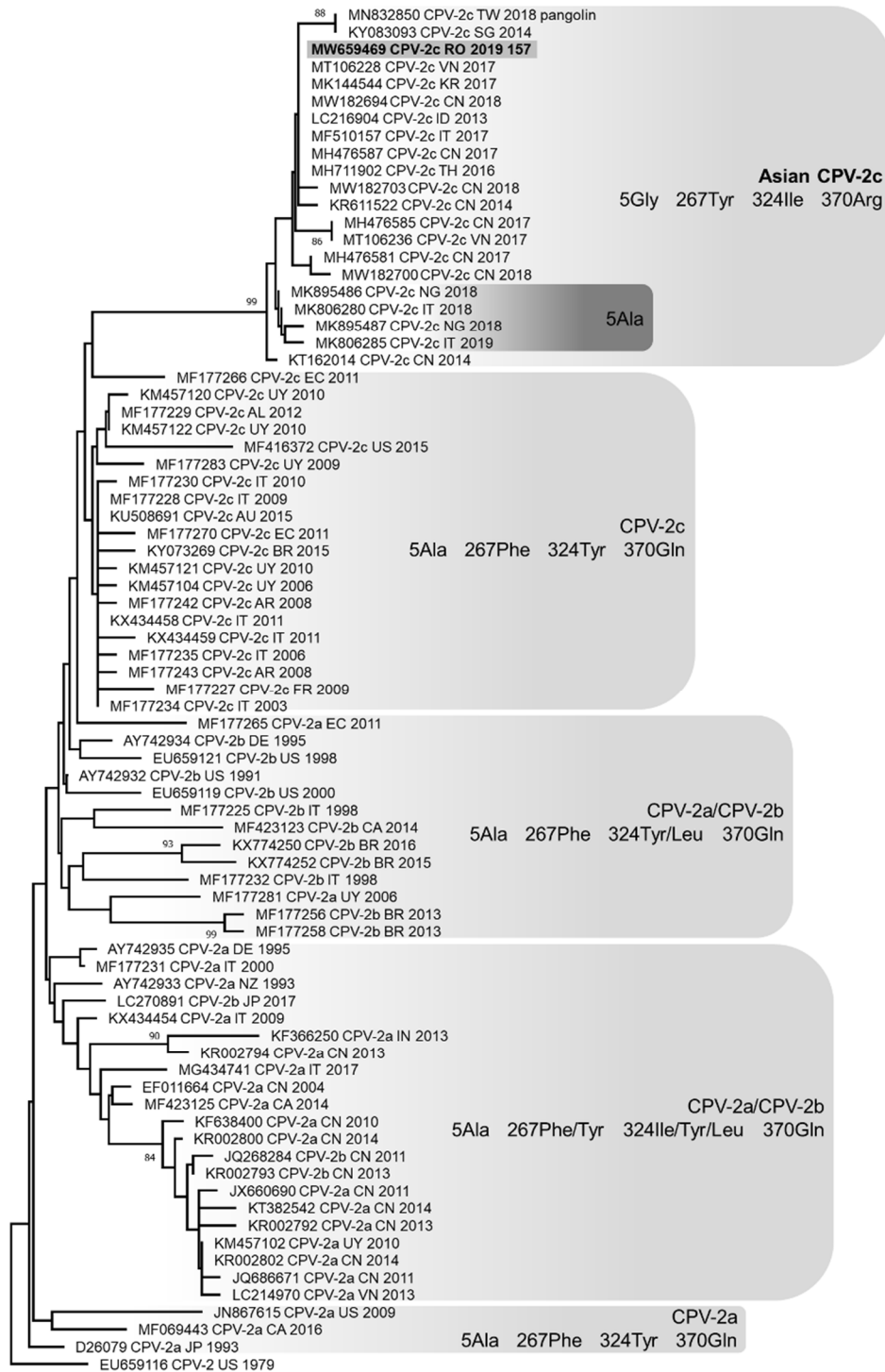
in un pangolino (*Manis pentadactyla pentadactyla*) a Taiwan nel 2018 (GenBank ID: MN832850, Wang et al., 2020).

**Tabella 4.2.** Risultati dell'analisi effettuata con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> al 12/03/2021): 32 sequenze di CPV-2c della stessa lunghezza e con identità nucleotidica del 100% con le sequenze del gene VP2 completo ottenute in questo studio.

GenBank ID	Variante	Anno	Origine geografica
LC216904	CPV-2c	2013	Indonesia
MF510157	CPV-2c	2017	Italia
MG013488	CPV-2c	2017	Cina
MH476583	CPV-2c	2017	Cina
MH476587	CPV-2c	2017	Cina
MH711894	CPV-2c	2016	Thailandia
MH711902	CPV-2c	2016	Thailandia
MK144544	CPV-2c	2017	Corea del Sud
MN451678	CPV-2c	2018	Nigeria
MN451682	CPV-2c	2018	Nigeria
MN810876	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810878	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810879	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810889	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810890	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810893	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810896	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810904	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810909	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810910	CPV-2c	2017-2019	Cina
MN810912	CPV-2c	2017-2019	Cina
MT106228	CPV-2c	2017	Vietnam
MT179767	CPV-2c	2019	Cina
MW182694	CPV-2c	2018	Cina
MW182698	CPV-2c	2018	Cina
MW182706	CPV-2c	2019	Cina
MW182709	CPV-2c	2019	Cina
MW182712	CPV-2c	2018	Cina
MW182714	CPV-2c	2018	Cina
MW182715	CPV-2c	2018	Cina
MW182719	CPV-2c	2020	Cina
MW182720	CPV-2c	2020	Cina

CPV-2c: parvovirus canino variante 2c.

Tutte le sequenze di riferimento di CPV-2c restituite dall'analisi con BLAST e i CPV-2c identificati in Romania in questo studio erano caratterizzati da residui aminoacidici distintivi nella proteina VP2: 5-glicina (5Gly), 267-tirosina (267-Tyr), 324-isoleucina (324-Ile) e 370-arginina (370-Arg), con l'eccezione di alcuni ceppi di CPV-2c riportati in Italia e Nigeria che mostravano il residuo più comune 5-alanina (5-Ala) (Ogbu et al., 2020; Mira et al., 2019). L'albero filogenetico ha mostrato un cluster monofiletico, supportato da elevati valori di bootstrap, che raggruppava i CPV-2c caratterizzati dai residui aminoacidici 5Gly(Ala), 267Tyr, 324Ile e 370Arg della proteina VP2, incluse le sequenze virali identificate in cani in Romania in questo studio (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2.** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del gene VP2 completo di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute in questo studio e di 78 ceppi di riferimento ottenuti da GenBank (**Allegato 4.1**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) e il metodo Neighbor-Joining. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 80% sono indicati nei corrispondenti nodi. Evidenziate in grigio: sequenze di parvovirus canino di tipo 2, variante 2c (CPV-2c) generate in questo studio (è stata riportata solamente la sequenza 157/2019 MW659469 in quanto tutte le sequenze ottenute erano identiche). Per ogni cluster sono riportate le varianti antigeniche e i residui aminoacidici nelle posizioni 5, 267, 324 e 370.

#### 4.4 Discussione

Questo studio ha riportato la prima caratterizzazione genetica di virus appartenenti al genere *Carnivore protoparvovirus 1* identificati in cani con gastroenterite acuta in Romania. Sebbene in questo studio sia stato analizzato un ridotto numero di campioni rendendo difficile trarre delle conclusioni sul ruolo epidemiologico del CPV-2 in Romania, tutti i virus identificati appartenevano alla variante CPV-2c, avevano sequenze nucleotidiche identiche del gene VP2, e mostravano residui aminoacidici distintivi nella proteina VP2: 5Gly, 267Tyr, 324Ile e 370Arg. Questi residui aminoacidici distintivi sono già stati riportati nei CPV-2c circolanti in Asia e occasionalmente rilevati in Italia e Nigeria (Chen et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Ogbu et al., 2020; Mira et al., 2019; Zhuang et al., 2019; Mira et al., 2018; Wang et al., 2016). La stretta correlazione tra questi CPV-2c è stata anche evidenziata dall'analisi filogenetica del gene VP2. I CPV-2c con questi tipici residui aminoacidici nella proteina VP2 sono stati precedentemente riconosciuti come "Asian CPV-2c" perché rilevati per la prima volta in Asia (Chen et al., 2021; Zhao et al., 2017). Virus aventi le caratteristiche degli "Asian CPV-2c" sono progressivamente diventati dominanti in molte aree dell'Asia in pochi anni dalla loro prima identificazione (Chen et al., 2021), e allo stesso tempo hanno anche raggiunto l'Europa e l'Africa (Ogbu et al., 2020; Mira et al., 2019; Mira et al., 2018). Molte delle mutazioni osservate nei virus appartenenti al genere *Carnivore protoparvovirus 1* sono di breve durata e sia l'evoluzione parallela che la reversione sono all'ordine del giorno per questi virus (Voorhees et al., 2019). Tuttavia, dal momento che i CPV-2c con i residui aminoacidici 5Gly, 267Tyr, 324Ile e 370Arg nel gene VP2 non sono mai stati riportati in letteratura prima del 2013 e dopo di allora sono stati rilevati frequentemente, è possibile ipotizzare che virus con questo profilo aminoacidico stiano progressivamente espandendo la loro diffusione nella popolazione canina mondiale, continuando ad acquisire mutazioni come il cambiamento dell'aminoacido da alanina a glicina nel residuo 5 (Ogbu et al., 2020; Mira et al., 2019). Altri autori hanno anche ipotizzato che i CPV-2c aventi queste quattro sostituzioni aminoacidiche siano più virulenti dei virus precedenti (Wang et al., 2016). Sono pertanto necessari ulteriori studi per comprendere se i residui aminoacidici che caratterizzano il gruppo "Asian CPV-2c" siano in grado di determinare vantaggi nell'interazione tra virus e specie ospite, in termini di replicazione, patogenesi, diffusione, o elusione del sistema immunitario. Il CPV-2c è stato riportato in associazione con gravi patologie in cani vaccinati con l'originale CPV-2 (Decaro et al., 2008). Anche in questo studio, il DNA degli "Asian CPV-2c" è stato identificato in sette cani con gastroenterite acuta che avevano ricevuto una somministrazione di vaccino a base di CPV-2. Sono molte le cause che potrebbero aver portato ad un fallimento nell'immunizzazione: i) prima di tutto, l'esecuzione di un protocollo vaccinale incompleto rispetto alle linee guida della World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) che raccomanda la

vaccinazione nei confronti del parvovirus canino a 6-8 settimane di età, e successivamente ogni 2-4 settimane fino a 16 settimane di età o più per evitare l'interferenza con gli anticorpi di derivazione materna (Day et al., 2016); ii) l'utilizzo di un vaccino inattivato (in un cane, ID: 166, **Tabella 4.1**), che è meno immunogeno di un vaccino vivo attenuato; iii) una esposizione al CPV-2 precedente alla vaccinazione. Inoltre, il ruolo delle varianti di CPV-2 nel causare fallimento nella vaccinazione è oggetto di studio. In letteratura è stato dimostrato che i vaccini attualmente disponibili, inclusi quelli allestiti con il CPV-2 originale, conferiscono un buon grado di protezione nei confronti di CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c (Decaro et al., 2020). Ricerche precedenti hanno sollevato alcuni dubbi sull'efficacia dei vaccini attualmente adottati per la profilassi nel cane nel fornire una protezione completa contro l'"Asian CPV-2c" (Charoenkul et al., 2019; Wang et al., 2016). A questo proposito, alcuni autori hanno suggerito una maggiore efficacia del vaccino vivo attenuato allestito con CPV-2b nei confronti della variante CPV-2c (Wilson et al., 2013; Larson e Schultz, 2008). Studi futuri sarebbero di fondamentale importanza per valutare la capacità dei vaccini attualmente adottati per prevenire le manifestazioni cliniche e ridurre la circolazione di questo nuovo virus.

#### **4.5 Conclusione**

Questo studio aggiunge nuovi dati sulla progressiva circolazione di "Asian CPV-2c" caratterizzati dai residui aminoacidici 5Gly, 267Tyr, 324Ile e 370Arg nella proteina VP2 in Europa e solleva preoccupazioni per quanto riguarda il potenziale impatto che questo nuovo virus può avere sulla salute della popolazione canina.

## 4.6 Bibliografia

- Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Vet Res.* 2011; 42(1):43. doi: 10.1186/1297-9716-42-43.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001; 82(Pt 12):3021-3025. doi: 10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Charoenkul K, Tangwangvivat R, Janetanakit T, Boonyapisitsopa S, Bunpapong N, Chaiyawong S, Amonsin A. Emergence of canine parvovirus type 2c in domestic dogs and cats from Thailand. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(4):1518-1528. doi: 10.1111/tbed.13177.
- Chen Y, Wang J, Bi Z, Tan Y, Lv L, Zhao H, Xia X, Zhu Y, Wang Y, Qian J. Molecular epidemiology and genetic evolution of canine parvovirus in East China, during 2018-2020. *Infect Genet Evol.* 2021; 90:104780. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104780.
- Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. Vaccination guidelines group (VGG) of the world small animal veterinary association (WSAVA). WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 2016; 57(1):E1-E45. doi: 10.1111/jsap.2\_12431.
- Decaro N, Buonavoglia C, Barrs VR. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Vet Microbiol.* 2020; 247:108760. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108760.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 2008; 31(1):125-30.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Larson LJ, Schultz RD. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? *Vet Ther.* 2008; 9(2):94-101.
- Mira F, Purpari G, Di Bella S, Colaianni ML, Schirò G, Chiaramonte G, Gucciardi F, Pisano P, Lastra A, Decaro N, Guercio A. Spreading of canine parvovirus type 2c mutants of Asian origin in southern Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(6):2297-2304. doi: 10.1111/tbed.13283.
- Mira F, Purpari G, Lorusso E, Di Bella S, Gucciardi F, Desario C, Macaluso G, Decaro N, Guercio A. Introduction of Asian canine parvovirus in Europe through dog importation. *Transbound Emerg Dis.* 2018; 65(1):16-21. doi: 10.1111/tbed.12747.
- Nguyen Manh T, Piewbang C, Rungsipipat A, Techangamsuwan S. Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2c originated from dogs reveals a new Asia-IV clade. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(3):1445-1453. doi: 10.1111/tbed.13811.
- Ogbu KI, Mira F, Purpari G, Nwosuh C, Loria GR, Schirò G, Chiaramonte G, Tion MT, Di Bella S, Ventriglia G, Decaro N, Anene BM, Guercio A. Nearly full-length genome characterization of canine parvovirus strains circulating in Nigeria. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67(2):635-647. doi: 10.1111/tbed.13379.

- Truyen U, Müller T, Heidrich R, Tackmann K, Carmichael LE. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol Infect.* 1998; 121(2):433-40. doi: 10.1017/s0950268898001319.
- Voorhees IEH, Lee H, Allison AB, Lopez-Astacio R, Goodman LB, Oyesola OO, Omobowale O, Fagbohun O, Dubovi EJ, Hafenstein SL, Holmes EC, Parrish CR. Limited intrahost diversity and background evolution accompany 40 years of canine parvovirus host adaptation and spread. *J Virol.* 2019; 94(1):e01162-19. doi: 10.1128/JVI.01162-19.
- Wang SL, Tu YC, Lee MS, Wu LH, Chen TY, Wu CH, Tsao EH, Chin SC, Li WT. Fatal canine parvovirus-2 (CPV-2) infection in a rescued free-ranging Taiwanese pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*). *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67(3):1074-1081. doi: 10.1111/tbed.13469.
- Wang J, Lin P, Zhao H, Cheng Y, Jiang Z, Zhu H, Wu H, Cheng S. Continuing evolution of canine parvovirus in China: Isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP2 protein. *Infect Genet Evol.* 2016; 38:73-78. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.009.
- Wilson S, Stirling C, Borowski S, Thomas A, King V, Salt J. Vaccination of dogs with Duramune DAPPi+LC protects against pathogenic canine parvovirus type 2c challenge. *Vet Rec.* 2013; 172(25):662. doi: 10.1136/vr.101509.
- Zhao H, Wang J, Jiang Y, Cheng Y, Lin P, Zhu H, Han G, Yi L, Zhang S, Guo L, Cheng S. Typing of canine parvovirus strains circulating in North-East China. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 64(2):495-503. doi: 10.1111/tbed.12390.
- Zhuang QY, Qiu Y, Pan ZH, Wang SC, Wang B, Wu WK, Yu JM, Yi Y, Sun FL, Wang KC. Genome sequence characterization of canine parvoviruses prevalent in the Sichuan province of China. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(2):897-907. doi: 10.1111/tbed.13100.





## **STUDIO 5: DIAGNOSI DI INFEZIONE, CARATTERIZZAZIONE GENETICA E NEUTRALIZZAZIONE ANTICORPALE DI CANINE DISTEMPER VIRUS IN FAINE (MARTES FOINA)**

[Pubblicato su *Research in Veterinary Science* il 2021, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.06.015]

### **5.1 Obiettivi dello studio**

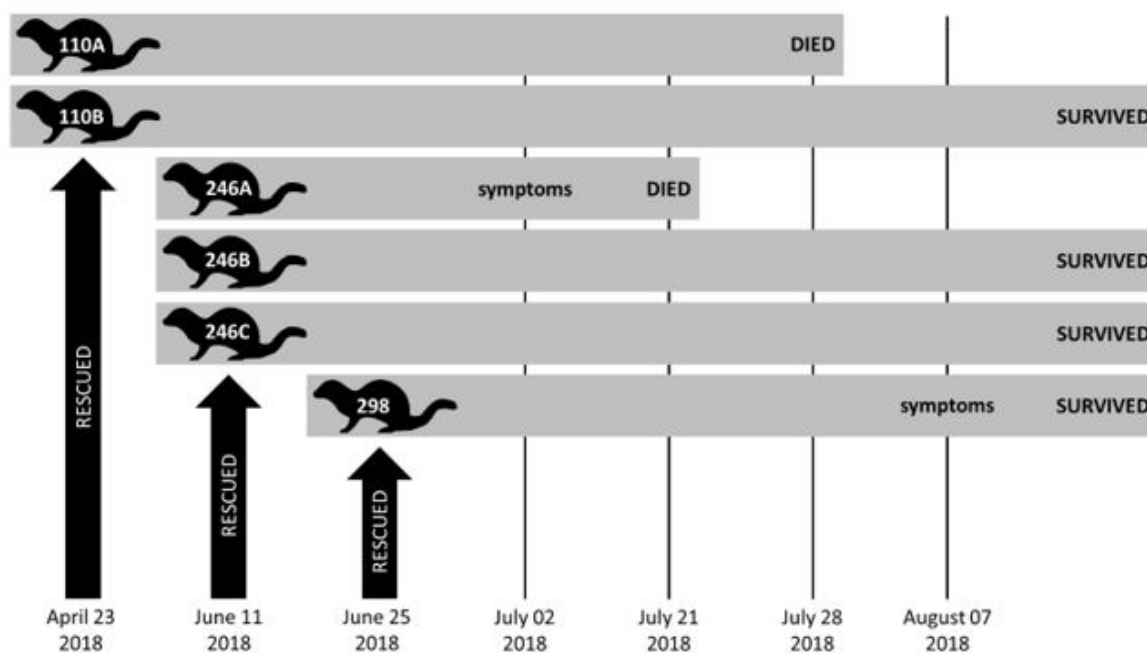
In questo studio è stato descritto un focolaio di infezione da canine distemper virus (CDV) in sei faine ospitate presso il Centro Tutela e Ricerca Fauna Esotica e Selvatica Monte Adone, in provincia di Bologna, nel 2018. I virus identificati sono stati inoltre caratterizzati geneticamente.

### **5.2 Materiali e metodi**

#### *5.2.1 Popolazione di studio e campionamento*

Lo studio riportato era di natura retrospettiva. La popolazione di studio era composta da sei faine: due (ID: 110A e 110B) sono state recuperate alla fine di aprile, tre (ID: 246A, 246B e 246C) all'inizio di giugno e una (ID: 298) alla fine di giugno (**Figura 5.1**). Tutti i soggetti inclusi nello studio erano giovani, ritrovati in uno stato di apparente abbandono in aree antropizzate (nei pressi di abitazioni umane), ed entrati nella struttura in buone condizioni generali di salute, ad eccezione della faina 298, un maschio che mostrava lieve depressione del sensorio e che lasciava sospettare un investimento stradale. Tuttavia, l'animale è guarito completamente in cinque giorni. All'ingresso degli animali nella struttura di recupero, veniva effettuato un periodo di osservazione (da 2 a 30 giorni) in un'area di isolamento separata prima di introdurli in un'area comune esterna recintata. A luglio 2018, al ventunesimo giorno dal ricovero, la faina 246A (femmina) ha mostrato ipertermia e violente convulsioni ed è deceduta dopo 19 giorni (a 40 giorni dal ricovero). In seguito a necropsia ed esame istologico la faina 246A ha mostrato enterite con disepitelizzazione, accorciamento e fusione dei villi intestinali e polmonite interstiziale. Una settimana dopo, la faina 110A (femmina) è deceduta, senza mostrare sintomatologia nei giorni precedenti. Su entrambe le faine decedute (246A e 110A) è stata effettuata una biopsia dal cuscinetto plantare per confermare l'infezione da CDV mediante ricerca dell'RNA virale e per caratterizzare geneticamente i virus identificati. Dieci giorni dopo la morte della faina 110A, la faina 298, al giorno 43 dal suo ricovero, ha sviluppato sintomatologia oculare con secrezione nasale e oculare e ulcere labiali, pertanto è stata messa in quarantena. Le altre tre faine (110B, 246B e 246C), anch'esse poste in quarantena, non hanno sviluppato sintomatologia clinica nel periodo successivo. Da tutti gli animali sopravvissuti (110B, 246B, 246C e 298) è stata monitorata l'eliminazione mediante ricerca dell'RNA di CDV da tamponi congiuntivali e orofaringei prelevati a cadenza temporale fino al momento della reimmissione in natura (24 agosto 2018, 12 settembre 2018,

16 ottobre 2018, 19 dicembre 2018, 20 febbraio 2019, 27 maggio 2019 e 17 aprile 2019). Al termine del periodo di isolamento (giugno 2019) e prima della reintroduzione in natura, le quattro faine sopravvissute sono state sottoposte ad un campionamento ematico per ricercare nel siero la presenza di anticorpi neutralizzanti nei confronti del CDV e valutare la presenza di una adeguata copertura anticorpale che riducesse il rischio di reinfezione.

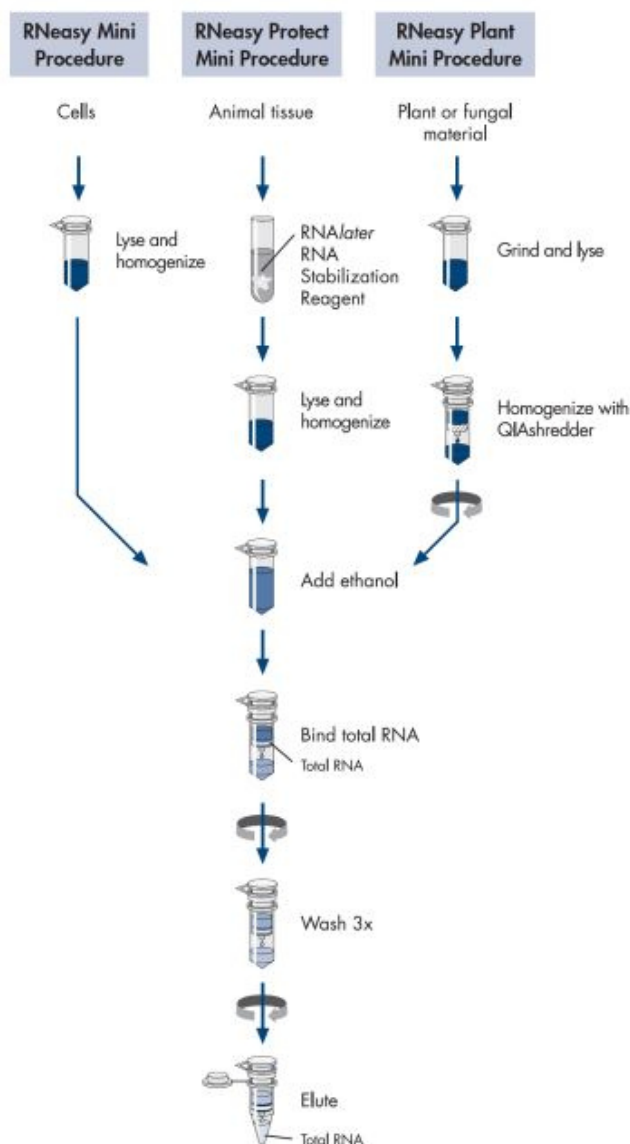


**Figura 5.1.** Linea temporale relativa al focolaio di infezione da canine distemper virus nel Centro Tutela e Ricerca Fauna Esotica e Selvatica Monte Adone, in provincia di Bologna, nel 2018.

Nessuna faina è stata campionata esclusivamente per le finalità di questa ricerca, tutti i campioni utilizzati sono stati raccolti a scopo diagnostico durante le procedure mediche eseguite sugli animali, in accordo con il medico veterinario curante e l’ente di gestione. Le prove di laboratorio sono state eseguite presso l’Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell’Università di Bologna, e l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER).

### 5.2.2 Estrazione dell’RNA

Per l’estrazione dell’RNA dai cuscinetti plantari e dai tamponi congiuntivali e orofaringei è stato utilizzato il kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni del produttore riportate in **Figura 5.2**. I tamponi congiuntivali e orofaringei sono stati eluiti in 230 µl di Phosphate Buffer Saline (PBS) prima di essere sottoposti ad estrazione dell’acido nucleico. Gli estratti ottenuti sono stati conservati a -80 °C fino al momento di eseguire le metodiche di amplificazione dell’RNA.



**Figura 5.2.** Schema di estrazione dell'RNA da tessuti (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germania).

### 5.2.3 Ricerca dell'RNA di canine distemper virus tramite real-time RT-PCR e end-point RT-PCR

La ricerca dell'RNA di CDV dai cuscinetti plantari delle faine decedute (110A e 246A) è stata eseguita utilizzando un saggio molecolare di SYBR Green one-tube real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR). L'RT-qPCR amplificava un frammento di 114 nucleotidi del gene P, con i primer qCDVF4: 5'-GTC GGT AAT CGA GGA TTC GAG AG-3' e qCDVR3: 5'-GCC GAA AGA ATA TCC CCA GTT AG-3' (Scagliarini et al., 2007).

La reazione è stata eseguita utilizzando il kit commerciale EXPRESS One-Step SYBR GreenER (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e la piattaforma StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La mix di reazione è riportata in **Tabella 5.1** e il ciclo termico in **Figura 5.3**. Al termine della fase di

amplificazione è stata eseguita l'analisi della curva di melting mediante un progressivo incremento della temperatura da 55 a 95 °C per valutare la specificità della reazione e la temperatura di melting (Tm) specifica era di circa 78 °C.

**Tabella 5.1.** Mix di reazione adottata per l'amplificazione con real-time reverse transcriptase PCR dell'RNA di cane distemper virus (EXPRESS One-Step SYBR GreenER Kit, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Componenti kit	Concentrazione iniziale	Volume di reazione	Concentrazione finale
Supermix	2X	10 µl	1X
Primer forward	20 picomoli/µl	0.4 µl	0.4 picomoli/µl
Primer reverse	20 picomoli/µl	0.4 µl	0.4 picomoli/µl
Superscript	40X	0.5 µl	1X
DNA template	-	5 µl	-
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	3.7 µl	-
Volume finale	-	20 µl	-



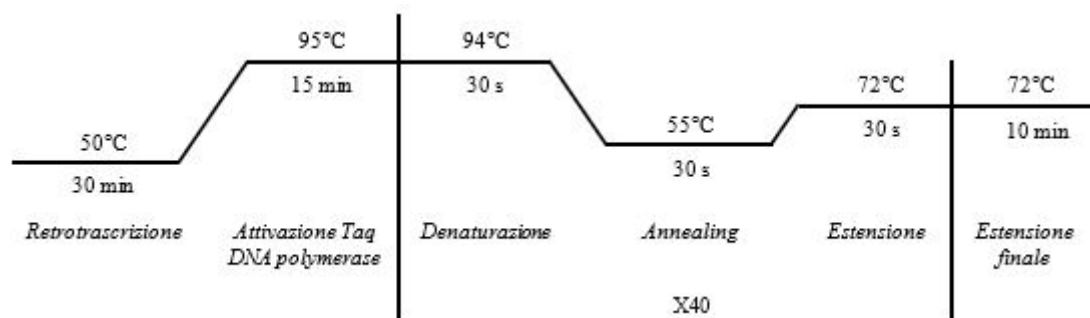
**Figura 5.3.** Ciclo di amplificazione in real-time reverse transcriptase PCR per il gene P di CDV.

La determinazione del numero di copie di RNA virale e l'efficienza della metodica di RT-qPCR sono state valutate sulla base di una curva di calibrazione ottenuta testando diluizioni seriali in base 10 di un plasmide ricombinante (plasmide pCR4, TOPO TA Cloning Kit, Life Technologies, USA) contenente una copia del target di amplificazione. La curva di taratura ottenuta rapportando il numero di copie plasmidiche e il valore del ciclo soglia corrispondente (Ct), ha permesso di definire un limite di detection (LOD) della reazione sulla base della più alta diluizione del plasmide ricombinante che era possibile amplificare con una buona riproducibilità, ed era pari a 1 copia di RNA target/µl di template.

La reazione è stata eseguita testando in doppio almeno sei diluizioni scalari in base 10 dello standard plasmidico ed i campioni incogniti. Durante l'esecuzione della reazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi. I campioni sono stati considerati positivi quando entrambe le ripetizioni mostravano un

incremento esponenziale nella curva di fluorescenza, una quantità superiore al LOD ed una curva di melting specifica.

Per valutare l'eliminazione virale nel tempo, gli estratti di RNA da tamponi congiuntivali e orofaringei, prelevati dai quattro soggetti sopravvissuti (110B, 246B, 246C e 298) per sette volte in nove mesi tra agosto 2018 ed aprile 2019, sono stati testati tramite un saggio di one-step end-point reverse transcriptase PCR (RT-PCR). La RT-PCR amplificava un frammento del gene NP (nucleoprotein) usando la coppia di primer PP-I\_p1: 5'-ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT-3' e PP-I\_p2: 5'-CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC-3' che generava un amplicone di 267 nucleotidi (Frisk et al., 1999). La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando il kit OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Germania), seguendo le indicazioni fornite dal produttore, in un volume finale di 25 µl. Il profilo termico è riportato in **Figura 5.4**. L' RNA estratto da una dose del vaccino CANIGEN Ceppi L (Virbac, Carros, Francia) è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione della reazione di amplificazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua ultrapura per biologia molecolare, è stato aggiunto per escludere eventuali falsi positivi.



**Figura 5.4.** Ciclo di amplificazione adottato per la end-point RT-PCR che amplificava un frammento di 267 paia di basi del gene NP del cane distemper virus.

Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% (p/v) addizionato con SYBR Green (1X) in 0.5X buffer tris-borato-EDTA (TBE) (Merck, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 8µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

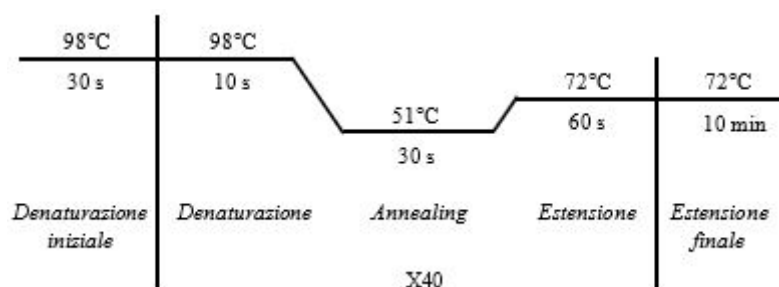
#### 5.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

I virus identificati nelle faine decedute (110A e 246A) sono stati caratterizzati geneticamente mediante amplificazione, sequenziamento ed analisi dell'intero gene H. Gli estratti di RNA da cuscinetto plantare risultati positivi in RT-qPCR sono stati retrotrascritti in cDNA usando il kit SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La mix e il ciclo di reazione di retrotrascrizione sono riportati in **Tabella 5.2**. Un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi. Il cDNA è stato conservato a -20 °C fino al successivo utilizzo.

**Tabella 5.2** Mix e ciclo di reazione utilizzati per la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA (SuperScript IV VILO Master Mix Kit, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Mix di reazione			
Componenti kit	Concentrazione iniziale	Volume di reazione	Concentrazione finale
Superscript	5X	4 µl	1X
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	6 µl	-
RNA templat	-	10 µl	-
Volume finale	-	20 µl	-
Ciclo di reazione			
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo	
Annealing	25 °C	10 min	
Retrotrascrizione	50 °C	10 min	
Denaturazione	85 °C	5 min	

L'amplificazione del gene H di CDV è stata eseguita mediante una metodica di end-point PCR usando la coppia di primer C-for: 5'-AAC TTA GGG CTC AGG TAG TC-3' e C-rev: 5'-AGA TGG ACC TCA GGG TAT AG-3' che generava un amplicone di 2023 nucleotidi (Demeter et al., 2007). La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente un enzima DNA polimerasi proofreading ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mix di reazione è riportata in **Tabella 1.5 (Studio 1)** e il profilo termico in **Figura 5.5**.



**Figura 5.5.** Ciclo di amplificazione per il gene H del cane distemper virus.

Il ceppo 99.2011 (Genbank ID: KF184989, Balboni et al., 2014) è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione della reazione di amplificazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed il bianco di reazione amplificato durante lo step di retro-trascrizione insieme ad un nuovo bianco di reazione, costituito da acqua ultrapura per biologia molecolare, sono stati aggiunti per escludere eventuali falsi positivi.

Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (p/v) addizionato con bromuro di etidio in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza di potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione.

Le sequenze ottenute sono state assemblate, analizzate con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, data di accesso: 08/2020), allineate con 116 sequenze di referenza (**Allegato 5.1**) presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, data di accesso: 08/2020) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche. Le relazioni filogenetiche tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di referenza sono state analizzate usando il metodo Neighbor-Joining implementato nel software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). L'albero filogenetico è stato costruito usando il modello di sostituzione nucleotidica Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata mediante test di bootstrap con 1000 ripetizioni.

### *5.2.5 Test di sieroneutralizzazione virale*

I sieri delle faine sopravvissute (110B, 246B, 246C e 298) prelevati prima della reimmissione in natura sono stati testati in duplicato per l'esecuzione del test di sieroneutralizzazione virale seguendo le indicazioni riportate da Confer e colleghi (1975). In breve, il saggio è stato eseguito su piastre da 96 pozzetti allestite con dosi costanti di sospensione virale di riferimento di CDV (ceppo Bussel)

diluite subito prima dell'uso per contenere 100 50% Tissue-Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>) in 25 µl e diluizioni per raddoppio dei sieri da testare. Successivamente 50 µl di sospensione cellulare di cellule Vero SLAM Dog (2 x 10<sup>6</sup> cells/ml), coltivate in medium Eagle minimal essential medium (MEM) addizionato con fetal calf serum (FCS) al 10%, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto della piastra. Per garantire la corretta esecuzione del test, sono stati inclusi una piastra di controllo della sospensione virale e pozzetti di controllo della sospensione cellulare. Le piastre sono state incubate per 72 ore a 37 °C in un'atmosfera con il 5% di CO<sub>2</sub> in aerobiosi e successivamente osservate al microscopio per la valutazione degli effetti citopatici. I pozzetti mostravano un risultato positivo alla neutralizzazione del virus se il 75% del monostrato cellulare rimaneva intatto. La più alta diluizione del siero in cui era visibile completa neutralizzazione dell'effetto citopatico in entrambi i duplicati testati indicava il titolo anticorpale per quel siero.

## 5.3 Risultati

### 5.3.1 Ricerca dell'RNA di canina distemper virus

Le faine decedute 246A e 110A sono risultate positive in RT-qPCR all'RNA di CDV nei cuscinetti plantari, con una quantità media rispettivamente pari a 17 e 2.8 x 10<sup>3</sup> copie di RNA virale per mg di tessuto. I risultati della RT-PCR che amplificava un frammento del gene NP del CDV eseguita sui tamponi congiuntivali e orofaringei delle faine sopravvissute (110B, 246B, 246C e 298) a partire da agosto 2019 sono riportati in **Tabella 5.3**. Le faine 298 e 110B sono risultate positive all'RNA di CDV fino al terzo mese (ottobre 2018), mentre le rimanenti due faine 246B e 246C sono risultate positive fino al quinto mese (dicembre 2018).

**Tabella 5.3.** Risultati della end-point reverse transcriptase PCR (RT-PCR) effettuata sui tamponi orofaringei e congiuntivali campionati dalle faine sopravvissute.

Soggetti e matrici biologiche	Risultati della RT-PCR in differenti momenti di campionamento						
	24 agosto 2018	12 settembre 2018	16 ottobre 2018	19 dicembre 2018	20 febbraio 2019	27 maggio 2019	17 aprile 2019
<b>110B</b>							
TOF	N	N	N	N	N	N	N
TC	P	N	P	N	N	N	N
<b>246B</b>							
TOF	P	N	N	N	N	N	N
TC	N	N	N	P	N	N	N
<b>246C</b>							
TOF	N	N	N	N	N	N	N
TC	P	N	N	P	N	N	N
<b>298</b>							
TOF	P	P	P	N	N	N	N
TC	P	P	P	N	N	N	N

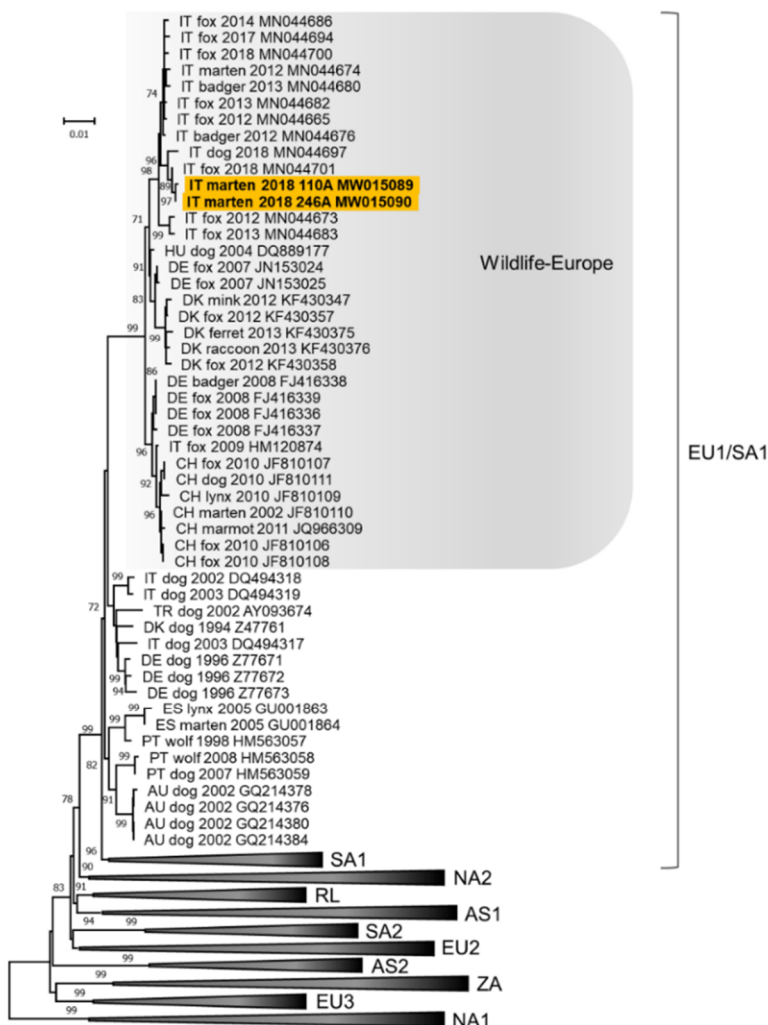
N: negativo, P: positivo, TC: tampone congiuntivale, TOF: tampone orofaringeo.



### 5.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

L'amplificazione e sequenziamento del gene H completo dei virus identificati nelle faine 246A e 110A ha prodotto sequenze di 1824 nucleotidi di lunghezza (ID GenBank: MW015089 e MW015090) che avevano una singola mutazione nucleotidica non sinonima in posizione 268 (corrispondente al residuo aminoacidico 90). Questa mutazione le distingueva dalla sequenza depositata in GenBank (MN044701) che mostrava con loro l'identità nucleotidica maggiore (>99.8%), appartenente a un CDV identificato in una volpe in Italia nord-orientale nel 2018 (Bianco et al., 2020).

L'analisi filogenetica ha mostrato che le sequenze del gene H dei CDV identificati in questo studio raggruppavano con il sottogruppo Wildlife-Europe, lineage Europe 1/South America 1 (**Figura 5.6**), strettamente correlati ad altri CDV identificati di recente in animali selvatici e nel cane domestico in Italia ed Europa.



**Figura 5.6.** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche del gene H (hemagglutinin) del CDV ottenute in questo studio e 116 sequenze di riferimento di CDV ottenute da GenBank (**Allegato 5.1**). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018), il metodo Neighbor-Joining e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. I valori di bootstrap, determinati su 1000 replicati, superiori al 70% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. I ceppi di CDV inclusi nell'analisi filogenetica sono nominati nel seguente modo: acronimo della nazione, specie ospite, anno di identificazione, numero identificativo del laboratorio (solo per le sequenze generate in questo studio), e numero identificativo di GenBank. Quando l'anno di identificazione non era disponibile, è stato indicato l'anno in cui la sequenza nucleotidica è stata depositata su GenBank. Lineages genetici di morbillivirus canino: America 1 (NA1), America 2 (NA2), Europe 1/South America 1 (EU1/SA1), Europe 2/Europe-Wildlife (EU2), Europe 3/Arctic like (EU3), Asia 1 (AS1), Asia 2 (AS2), South Africa (ZA), South America 2 (SA2) e Rockborn like (RL). I cluster genetici che non comprendevano le sequenze di CDV identificate in questo studio sono stati compattati. In grigio: sottogruppo genetico Wildlife Europe. Evidenziate in giallo: sequenze generate in questo studio.

### 5.3.3 Test di sieroneutralizzazione virale

Il test di sieroneutralizzazione virale eseguito sulle faine sopravvissute ha rilevato un titolo anticorpale positivo pari a 1:32 per il soggetto 246C, a 1:64 per i soggetti 110B e 298, e a 1:128 per il soggetto 246B.

## 5.4 Discussione

In questo studio è stato documentato un focolaio di infezione da CDV in sei faine che mostravano un differente decorso clinico: due di esse sono decedute (110A e 246A), una ha mostrato lievi segni clinici (298), mentre le rimanenti tre non hanno mostrato sintomi (110B, 246B e 246C). Per tutti gli animali inclusi nello studio, l'esatta durata dell'esposizione non è nota. Nonostante ciò, è possibile ipotizzare che la faina 246A possa essere stata la fonte di infezione, entrando nella struttura durante la fase di incubazione della malattia e sviluppando crisi convulsive nel luglio 2018, ovvero dopo 21 giorni dal suo ricovero. Dopo 19 giorni lo stesso soggetto è deceduto. Tempistiche simili sono state riportate nei furetti da Perpiñán e colleghi (2008). Inoltre, non può essere esclusa una infezione subclinica concomitante nella faina 298. Infatti, la sintomatologia cerebrale manifestata dal soggetto, inizialmente ricondotta ad un incidente automobilistico, potrebbe essere collegata alla sintomatologia transitoria che si presenta nei primi giorni dall'infezione da CDV. La successiva diffusione del virus nell'organismo potrebbe essere stata responsabile delle secrezioni nasali e oculari e delle ulcere labiali manifestate a distanza di 38 giorni. In letteratura è stata documentata la presenza di portatori asintomatici in altri mustelidi come il visone (Zhao et al., 2015). Anche nel cane, è stato stimato che almeno il 50% delle infezioni da CDV sia subclinica (Peterson e Kutzler, 2011).

Il rilevamento prolungato nel tempo dell'RNA virale da tamponi congiuntivali e orofaringei suggerisce che l'eliminazione virale sia durata a lungo in tutti i soggetti. In particolare, nelle faine 298 e 110B l'escrezione virale è durata almeno tre mesi mentre nei restanti due soggetti almeno cinque mesi. Tale persistenza è riconducibile alla patogenesi descritta nei cani, dove la diffusione del virus può continuare per tre o quattro mesi (Sykes, 2014). Il fatto che la rilevazione dell'RNA in queste matrici sia stata intermittente per alcuni soggetti è potenzialmente riconducibile alla tecnica di campionamento, alle condizioni di conservazione tra il campionamento e l'esecuzione dei test di laboratorio e alla sensibilità del saggio di RT-PCR utilizzato. Gli animali eliminano il virus attraverso le secrezioni e, poiché è noto che il CDV non persista a lungo nell'ambiente, gli animali con sintomatologia lieve e in fase di guarigione possono svolgere un ruolo importante nel mantenimento del virus nei canili (Miller e Hurley, 2009). Ciò è particolarmente importante all'interno dei centri di recupero, che ospitano animali con anamnesi clinica sconosciuta e fauna selvatica in via di estinzione. Infatti, il CDV può rappresentare una minaccia per le specie selvatiche a causa della sua propensione

al salto di specie e ad infettare nuovi ospiti, comprese le specie in via di estinzione (Sulikhan et al., 2018; Feng et al., 2016). Le manifestazioni cliniche e i reperti istologici confermano che il tratto gastrointestinale, il sistema respiratorio e il sistema nervoso erano i più colpiti nelle faine, come già documentato in altri mustelidi (Perpiñán et al., 2008).

I virus appartenenti al genere *Morbillivirus* inducono un'immunità a lungo termine, in particolare, la risposta immunitaria all'infezione da CDV dovrebbe durare per tutta la vita (Schultz et al., 2010), quindi il rilevamento di animali sieropositivi implica la protezione nei confronti del virus. È stato descritto che la sierconversione nel visone, in condizioni sperimentali, si verifica 14 giorni dopo l'infezione raggiungendo titoli anticorpali più alti a 21 giorni dopo l'infezione (Zhao et al., 2015). Dal momento che i soggetti inclusi in questo studio non sono stati testati così precocemente, non è possibile confrontare i nostri risultati, tuttavia, è possibile ipotizzare che, come descritto nei cani, i segni clinici si risolvano e il virus venga eliminato dalla maggior parte dei tessuti quando il titolo anticorpale aumenta (Greene e Vandeveld, 2012). Infatti, il test di sieroneutralizzazione è ancora considerato il gold standard per misurare la protezione contro le infezioni e i titoli anticorpali sono correlati al livello di protezione (Appel e Robson, 1973).

I virus identificati appartenevano al sottogruppo genetico Wildlife-Europe CDV (lineage Europe 1/South America 1, Bianco et al., 2020; Panzera et al., 2015). Questo sottogruppo di CDV ben adattato alla fauna selvatica è stato rilevato in Europa (Monne et al., 2011). In Italia il sottogruppo Wildlife-Europe ha anche causato il primo spillover, dalla fauna selvatica a un cane domestico non vaccinato (Bianco et al., 2020). In letteratura sono stati segnalati la coevoluzione e il raggruppamento filogenetico dei CDV identificati sia nella fauna selvatica che nei cani domestici (Piewbang et al., 2020), descrivendo un'intricata dinamica epidemiologica caratterizzata da infezioni multiple nella specie ospite e trasmissione interspecie (Duque-Valencia et al., 2019). In quest'ottica, il ruolo centrale della fauna selvatica nell'epidemiologia della malattia dovrebbe essere indagato (Anis et al., 2020), intensificando la sorveglianza passiva dell'ampio spettro di specie animali suscettibili per estendere l'analisi evolutiva del CDV, un patogeno che mostra un elevato tasso di mutazioni, al fine di intraprendere strategie affidabili per la conservazione della fauna selvatica.

## 5.5 Bibliografia

- Anis E, Needle DB, Stevens B, Yan L, Wilkes RP. Genetic characteristics of canine distemper viruses circulating in wildlife in the United States. *J Zoo Wildl Med.* 2020; 50(4):790-797. doi: 10.1638/2019-0052.
- Appel M, Robson DS. A microneutralization test for canine distemper virus. *Am J Vet Res.* 1973; 34(11):1459-63.
- Balboni A, De Lorenzo Dandola G, Scagliarini A, Prosperi S, Battilani M. Occurrence of different Canine distemper virus lineages in Italian dogs. *Vet Ital.* 2014; 50(3):227-31. doi: 10.12834/VetIt.52.2173.2.
- Bianco A, Zecchin B, Fusaro A, Schivo A, Ormelli S, Bregoli M, Citterio CV, Obber F, Dellamaria D, Trevisiol K, Lorenzetto M, De Benedictis P, Monne I. Two waves of canine distemper virus showing different spatio-temporal dynamics in Alpine wildlife (2006-2018). *Infect Genet Evol.* 2020; 84:104359. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104359.
- Confer AW, Kahn DE, Koestner A, Krakowka S. Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. *Infect Immun.* 1975; 11(4):835-44. doi: 10.1128/iai.11.4.835-844.1975.
- Demeter Z, Lakatos B, Palade EA, Kozma T, Forgách P, Rusvai M. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet Microbiol.* 2007; 122(3-4):258-69. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.001.
- Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J. Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus-an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi-host virus. *Viruses.* 2019; 11(7):582. doi: 10.3390/v11070582.
- Feng N, Yu Y, Wang T, Wilker P, Wang J, Li Y, Sun Z, Gao Y, Xia X. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Sci Rep.* 2016; 6:27518. doi: 10.1038/srep27518.
- Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11):3634-43. doi: 10.1128/JCM.37.11.3634-3643.1999.
- Greene CE, Vandeveld M. Canine distemper. In: Greene CE. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, fourth ed. 2012. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, p. 2542.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Miller L, Hurley K, *Infectious Disease Management in Animal Shelters.* 2009. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Monne I, Fusaro A, Valastro V, Citterio C, Dalla Pozza M, Obber F, Trevisiol K, Cova M, De Benedictis P, Bregoli M, Capua I, Cattoli G. A distinct CDV genotype causing a major epidemic in Alpine wildlife. *Vet Microbiol.* 2011; 150(1-2):63-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.01.009.
- Panzer Y, Sarute N, Iraola G, Hernández M, Pérez R. Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. *Mol Phylogenet Evol.* 2015; 92:147-54. doi: 10.1016/j.ympev.2015.06.015.

- Perpiñán D, Ramis A, Tomás A, Carpintero E, Bargalló F. Outbreak of canine distemper in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Rec.* 2008; 163(8):246-50. doi: 10.1136/vr.163.8.246.
- Peterson ME, Kutzler MA. *Small animal pediatrics: the first 12 months of life.* 2011. Saunders/Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Piewbang C, Chansaenroj J, Kongmakee P, Banlunara W, Poovorawan Y, Techangamsuwan S. Genetic adaptations, biases, and evolutionary analysis of canine distemper virus Asia-4 lineage in a fatal outbreak of wild-caught civets in Thailand. *Viruses.* 2020; 12(4):361. doi: 10.3390/v12040361.
- Scagliarini A, Dal Pozzo F, Gallina L, Vaccari F, Morganti L. TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. *Vet Res Commun.* 2007; 31 Suppl 1:261-3. doi: 10.1007/s11259-007-0020-9.
- Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, Sharp P, Larson LJ. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J Comp Pathol.* 2010; 142 Suppl 1:S102-8. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.10.009.
- Sulikhan NS, Gilbert M, Blidchenko EY, Naidenko SV, Ivanchuk GV, Gorpenchenko TY, Alshinetskiy MV, Shevtsova EI, Goodrich JM, Lewis JCM, Goncharuk MS, Uphyrkina OV, Rozhnov VV, Shedko SV, McAloose D, Miquelle DG, Seimon TA. Canine distemper virus in a wild far eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *J Wildl Dis.* 2018; 54(1):170-174. doi: 10.7589/2017-03-065.
- Sykes JE. Canine distemper virus infection. In: Sykes JE. (Ed.), *Canine and Feline Infectious Diseases.* 2014. Elsevier, pp. 152-165.
- Zhao J, Shi N, Sun Y, Martella V, Nikolin V, Zhu C, Zhang H, Hu B, Bai X, Yan X. Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks. *Antiviral Res.* 2015; 122:1-11. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.07.007.



## STUDIO 6: STUDIO DELLA CORRELAZIONE TRA POLIARTRITE E INFEZIONE DA CALICIVIRUS FELINO NEI GATTI

[Pubblicato su *Veterinary Research Communications* il 2022, doi: 10.1007/s11259-022-09933-4]

### 6.1 Obiettivi dello studio

Gli obiettivi di questo studio sono stati di descrivere casi clinici di poliartrite in gatti di proprietà affetti dal calicivirus felino (FCV) e di eseguire l'analisi filogenetica dei virus identificati.

### 6.2 Materiali e metodi

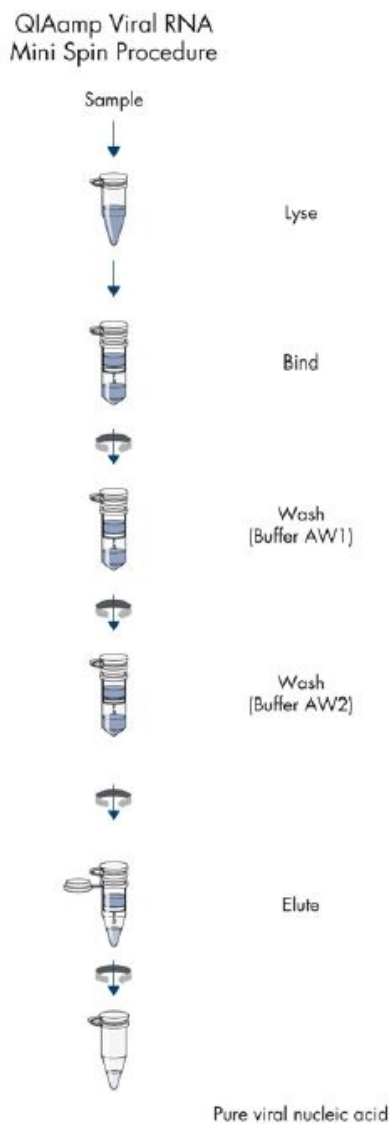
#### 6.2.1 Popolazione di studio e campionamento

Lo studio, condotto presso l'Ospedale Veterinario Universitario (OVU) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), era di natura retrospettiva. Sono stati inclusi i gatti con zoppia portati in visita presso l'OVU nel periodo compreso tra il 2017 e il 2019, solo se era stata effettuata una diagnosi di poliartrite ed era stato rilevato l'RNA o gli antigeni virali di FCV nelle articolazioni patologiche. La poliartrite è stata diagnosticata in gatti che mostravano segni sistemici di infiammazione (letargia, anoressia e febbre) e riluttanza al movimento associati a rigonfiamento e dolorabilità di almeno due articolazioni (Lemetayer e Taylor, 2014). La diagnosi è stata confermata mediante esame citologico del liquido sinoviale compatibile con infiammazione suppurativa in due o più articolazioni (Stone, 2017; Lemetayer e Taylor, 2014). I campioni di liquido sinoviale sono stati analizzati al momento del ricovero dei gatti e considerati affetti da infiammazione suppurativa se mostravano un aumento nella conta delle cellule nucleate totali:  $>2$  cellule/ingrandimento 400X (Barger, 2016) o  $>1000$  cellule/ml se valutata utilizzando un rilevatore di cellule automatizzato (Pacchiana et al., 2004), e i neutrofili rappresentavano  $>10\%$  delle cellule nucleate totali (Rondeau et al., 2005; Clements et al., 2004) e presentavano una morfologia non degenerata (Darren e Gibson, 2021). Nessun gatto è stato campionato esclusivamente per gli scopi di questo studio e sono stati utilizzati solamente i campioni prelevati per finalità diagnostiche previo consenso dei proprietari. Tutte le analisi sono state condotte durante il ricovero dei gatti presso l'OVU su campioni biologici freschi, ad eccezione del sequenziamento del genoma virale e dell'immunoistochimica (IHC) che sono state condotte al momento dello studio rispettivamente sugli estratti di RNA conservati a  $-80$  °C e su campioni di organi stoccati in blocchetti di paraffina. I dati relativi al segnalamento, lo stato vaccinale e le alterazioni clinicopatologiche dei gatti inclusi nello studio sono stati recuperati dalle cartelle cliniche. La presenza dell'RNA di FCV è stata investigata in campioni di liquido sinoviale (prelevato da due o più articolazioni patologiche) e anche in pool di campioni di tamponi

congiuntivali, nasali e orofaringei. L'artrocentesi è stata eseguita seguendo le indicazioni di Lemetayer e Taylor (2014).

### 6.2.2 Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA virale dal liquido sinoviale e dai tamponi (congiuntivali, nasali e orofaringei) è stata eseguita presso i laboratori dell'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del DIMEVET, utilizzando il kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni del produttore riportate in **Figura 6.1**. Per ogni gatto incluso nello studio i tamponi congiuntivali, nasali e orofaringei sono stati eluiti in 250 µl di Phosphate Buffer Saline (PBS) ed uniti in un pool prima di essere sottoposti ad estrazione dell'acido nucleico. Gli estratti ottenuti sono stati conservati a -80 °C fino al momento di eseguire le metodiche di amplificazione dell'RNA.



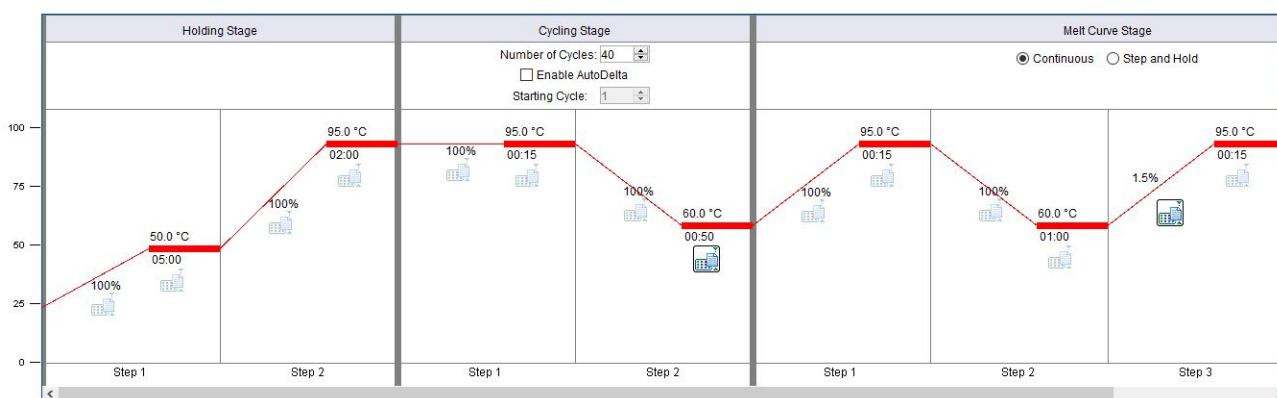
**Figura 6.1.** Schema di estrazione dell'RNA da liquidi biologici (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germania).



### 6.2.3 Ricerca dell'RNA di feline calicivirus tramite un saggio di real-time RT-PCR

La ricerca dell'RNA di FCV dal liquido sinoviale e dal pool di tamponi è stata eseguita utilizzando un saggio molecolare di SYBR Green one-tube real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) in grado di rilevare e quantificare l'acido nucleico virale. L'RT-qPCR impiegata in questo studio amplificava un frammento di 83 nucleotidi dell'ORF1, con i primer qFCVFor: 5'-TAA TTC GGT GTT TGA TTT GGC CTG GGC T-3' e qFCVRev: 5'-CAT ATG CGG CTC TGA TGG CTT GAA ACT G-3' (Helps et al., 2002).

La reazione è stata eseguita utilizzando il kit commerciale EXPRESS One-Step SYBR GreenER (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e la piattaforma StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La mix di reazione è riportata in **Tabella 5.1 (Studio 5)** ed il profilo termico in **Figura 6.2**.



**Figura 6.2.** Ciclo di amplificazione utilizzato per la metodica di real-time reverse transcriptase PCR.

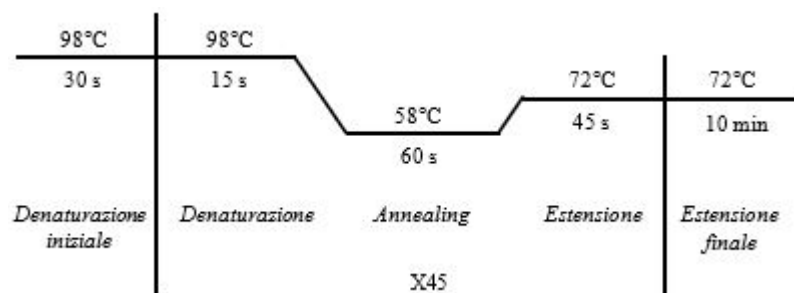
Al termine della fase di amplificazione è stata eseguita l'analisi della curva di melting mediante un progressivo incremento della temperatura da 60 a 95 °C per valutare la specificità della reazione e il picco di melting specifico era di circa 81 °C.

La determinazione del numero di copie di RNA e l'efficienza della metodica di RT-qPCR sono state valutate sulla base di una curva di calibrazione ottenuta testando diluizioni seriali in base 10 di un plasmide ricombinante (plasmide pCR4, TOPO TA Cloning Kit, Life Technologies, USA) contenente una copia del target d'interesse. La curva di taratura ottenuta riportando il numero di copie plasmidiche e il valore del ciclo soglia corrispondente (Ct), ha permesso di definire un limite di detection (LOD) della reazione sulla base della più alta diluizione del plasmide ricombinante che era possibile amplificare con una buona riproducibilità, ed era pari a 1 copia di RNA target/μl di template. La reazione è stata eseguita testando in doppio almeno sei diluizioni scalari in base 10 dello standard plasmidico contenente il frammento di RNA target ed i campioni incogniti. Durante l'esecuzione della reazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni

ed un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi. I campioni sono stati considerati positivi quando entrambe le ripetizioni mostravano un incremento esponenziale nella curva di fluorescenza, una quantità superiore al LOD ed una curva di melting specifica.

#### 6.2.4 Caratterizzazione genetica dei virus identificati

I virus identificati sono stati caratterizzati geneticamente mediante amplificazione, sequenziamento ed analisi della regione 3' dell'ORF2 di FCV. L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA usando il kit SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La mix e il ciclo di reazione di retrotrascrizione sono riportati in **Tabella 5.2 (Studio 5)**. Un bianco di reazione, costituito da acqua per biologia molecolare ultrapura, è stato incluso nella reazione per escludere eventuali falsi positivi. Il cDNA è stato conservato a -20 °C fino al successivo utilizzo. Il cDNA è stato utilizzato per amplificare mediante una metodica di end-point PCR un frammento di circa 950 nucleotidi all'interno nella regione 3' dell'ORF2 di FCV (dal nucleotide 6562 al nucleotide 7509 del ceppo di riferimento di FCV avente come codice identificativo di GenBank M86379), contenente la regione ipervariabile E, usando la coppia di primer FW4: 5'-CCT GAT GGT TGG CCA GAC AC-3' e FR4: 5'-GTA CCC TTT GCT CAA GAA TTT TGT-3' (Battilani et al., 2013). La reazione di amplificazione è stata eseguita utilizzando il kit Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), contenente un enzima DNA polimerasi proofreading ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La mix di reazione è riportata in **Tabella 1.5 (Studio 1)** e il profilo termico in **Figura 6.3**.



**Figura 6.3** Ciclo di amplificazione per la regione 3' dell'ORF2 di FCV.

L'FCV identificato nel gatto "Oscar" dello studio di Battilani e colleghi (2013) è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione della reazione di amplificazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed il bianco di reazione amplificato durante lo step di retro-trascrizione insieme ad un nuovo bianco

di reazione, costituito da acqua ultrapura per biologia molecolare, sono stati aggiunti per escludere eventuali falsi positivi.

Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'2% (p/v) addizionato con bromuro di etidio in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5µl di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione.

Le sequenze ottenute sono state assemblate, allineate con 65 sequenze di riferimento (**Allegato 6.1**) presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, data di accesso: 06/02/2020) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche. Le relazioni filogenetiche tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di riferimento sono state analizzate usando il metodo Maximum Likelihood implementato nel software MEGA11 versione 11.0.10 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Tamura et al., 2021). L'albero filogenetico è stato costruito usando il modello di sostituzione nucleotidica General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata mediante test di bootstrap con 1000 ripetizioni dell'analisi.

#### *6.2.5 Immunoistochimica nelle membrane sinoviali*

Su uno dei gatti inclusi nello studio (ID: 1072/2018) è stata effettuata l'eutanasia per motivi etici. Sullo stesso soggetto è stato effettuato un esame post-mortem entro le 24 ore dal decesso e sono stati campionati alcuni organi, incluse le membrane sinoviali, e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a quattro-µm e colorati con ematossilina-eosina per le analisi istopatologiche. Le membrane sinoviali campionate dal soggetto deceduto e conservate in blocchi di paraffina sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica utilizzando un anticorpo monoclonale di topo anti-FCV della proteina del capsido (clone CV8-1A) fornito dalla ditta Custom Monoclonals International (West Sacramento, CA, USA). Le sezioni sono state apposte su vetrini per IHC carichi positivamente, deparaffinate in xilene e poste in etanolo. L'attività della perossidasi

endogena è stata bloccata con perossido di idrogeno allo 0.3% in metanolo per 10 minuti a cui hanno fatto seguito concentrazioni decrescenti di etanolo e idratazione in acqua. Il recupero dell'antigene è stato ottenuto con proteinasi K (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA). I tessuti sono stati successivamente sottoposti a lavaggio in PBS e incubati per un'ora a temperatura ambiente in camera umidificata previa applicazione di 100 µL di anticorpo monoclonale primario diluito 1:100 in PBS. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, i vetrini sono stati sottoposti ad un lavaggio con tris-buffered saline con Tween 20 (TBST) (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA), marcati con anti-mouse EnVision System con l'enzima rafano perossidasi (HRP) (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA) per 30 minuti a temperatura ambiente e infine sottoposti ad ulteriore lavaggio con TBST. Il cromogeno (3-amino-9-etilcarbazole - AEC substrate, Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA) è stato applicato per 10 minuti prima di un lavaggio finale e dell'applicazione del colorante di contrasto Papanicolaou's 1b Hematoxylin Solution (Merck, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e del coprioggetto. Come controllo positivo è stato utilizzato un pellet cellulare fissato in formalina e incluso in paraffina ottenuto da un campione risultato positivo per FCV in PCR. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con un anticorpo policlonale non reattivo. Il liquido sinoviale è stato inoltre campionato durante l'esame necroscopico e testato direttamente (senza essere stoccato a -80 °C) per rilevare la presenza dell'RNA di FCV con l'RT-qPCR.

## 6.3 Risultati

### 6.3.1 Popolazione di studio e ricerca dell'RNA di calicivirus felino

Sono stati inclusi nello studio tre gatti che avevano segni clinici ed alterazioni clinicopatologiche riconducibili a poliartrite. Ciascun soggetto mostrava leucocitosi, neutrofilia e aumento della siero amiloide A (**Allegato 6.2**). L'RNA di FCV è stato rilevato solo nel liquido sinoviale (pool di campioni da carpo sinistro e ginocchio destro) con una quantità di  $1.3 \times 10^2$  copie/µl per il Gatto1 (ID: 1101/2017), in liquido sinoviale (pool di campioni da carpo sinistro, gomito sinistro e destro e ginocchio sinistro) e nei tamponi per il Gatto2 (ID: 1466/2017) con una quantità rispettivamente di  $5.8 \times 10^4$  copie/µl e  $9.7 \times 10^4$  copie/µl, e solo nei tamponi con una quantità di  $7.6 \times 10^1$  copie/µl per il Gatto3 (ID: 1072/2018). Nel Gatto3, la presenza di FCV è stata confermata dall'IHC eseguita sulle membrane sinoviali. I tre gatti erano maschi europei castrati di proprietà, provenienti dalla provincia di Bologna e con stile di vita *indoor* ma con accesso all'esterno. Il Gatto1 aveva nove anni e mostrava segni clinici di poliartrite con linfadenopatia generalizzata ma senza febbre. Il Gatto2 aveva 11 mesi e mostrava manifestazioni cliniche di poliartrite associata a segni prosencefalici. Il Gatto3 aveva sette anni ed era affetto da poliartrite associata a dermatopatia cronica (ipercheratosi, desquamazione e follicolite diffusa); il gatto aveva mostrato zoppia ricorrente per otto mesi dal primo rilevamento

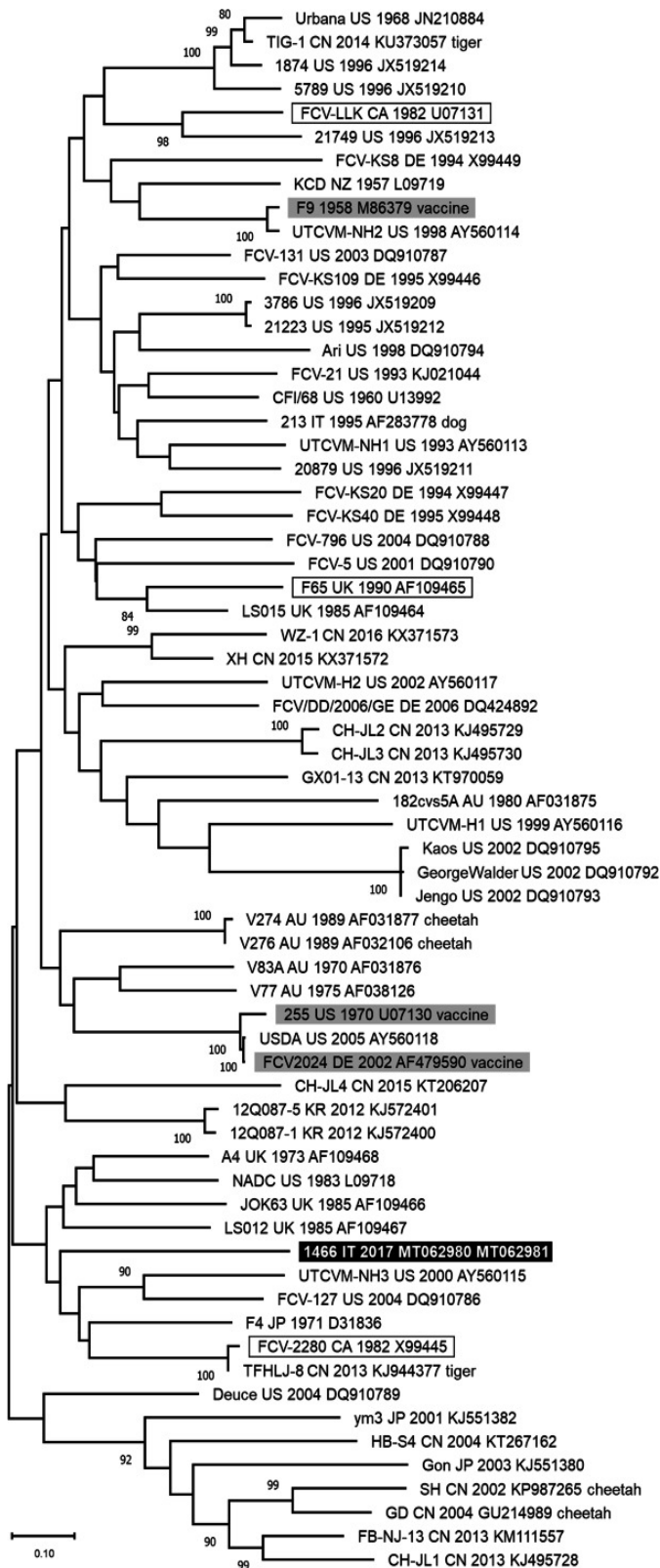
dell'RNA di FCV in un tampone orofaringeo nel 2018 ed è stato sottoposto ad eutanasia nel 2019, nonostante i trattamenti medici, per ragioni etiche. I tre gatti non mostravano alterazioni riconducibili a malattie delle vie aeree superiori. Il Gatto2 e il Gatto3 erano regolarmente vaccinati nei confronti del virus della panleucopenia felina, delle infezioni da herpesvirus felino e FCV, mentre per il Gatto1 l'anamnesi vaccinale era sconosciuta.

### *6.3.2 Caratterizzazione genetica dei virus identificati*

Un frammento di 873 nucleotidi del genoma di FCV, contenente gli ultimi 717 nucleotidi dell'ORF2, è stato sequenziato dalle due differenti matrici biologiche del Gatto2: pool di liquido sinoviale (GenBank ID: MT062980) e pool di tamponi (GenBank ID: MT062981). Per gli altri due gatti non è stato ottenuto alcun prodotto specifico di PCR dall'amplificazione del gene ORF2 e di conseguenza non è stato possibile generare sequenze nucleotidiche virali. Le due sequenze nucleotidiche di FCV ottenute per il Gatto2 erano identiche e mostravano una identità nucleotidica da 68.4% a 77.5% con tutte le sequenze di riferimento analizzate. La filogenesi non ha permesso di raggruppare le sequenze di FCV su base geografica, temporale o clinica (**Figura 6.4**).

### *6.3.3 Esame post mortem, esame istopatologico ed immunoistochimica nelle membrane sinoviali del Gatto3*

L'esame post mortem del Gatto3 ha messo in evidenza un pallore moderato della cute e delle mucose; mentre le articolazioni (carpo destro e sinistro e tarso destro e sinistro) hanno mostrato ispessimento diffuso e proliferazione sinoviale, edema ed emorragie multifocali con eccesso di liquido sinoviale. Il fegato presentava una diffusa congestione di grado moderato. Oltre alla dermatopatia, non sono state osservate altre alterazioni significative a livello macroscopico negli altri organi. L'esame istopatologico ha messo in evidenza una sinovite fibrinosa diffusa sub-acuta da moderata a grave (a seconda dell'articolazione osservata), con ripiegamento e iperplasia delle membrane sinoviali. In tutte le articolazioni osservate sono stati rilevati neutrofili e macrofagi reattivi e degenerati con distribuzione variabile a seconda dell'articolazione esaminata e, in due diverse sedi, piccole aree di necrosi coagulativa (**Tabella 6.1 e Figura 6.5**). Un'area focalmente estesa di osteoartrite è stata inoltre osservata nel ginocchio sinistro. Nei rimanenti organi è stato osservato solamente un grado variabile di congestione, più grave nel polmone affetto da trombosi diffusa dei vasi polmonari di piccolo e medio calibro. L'IHC ha rilevato l'antigene virale di FCV nel citoplasma dei sinoviociti dello strato più interno e meno frequentemente nei fibroblasti dello strato intermedio in tutte le membrane sinoviali analizzate con diverso grado di positività (**Tabella 6.1 e Figura 6.5**). I campioni di liquido sinoviale prelevati all'esame post mortem sono risultati negativi all'RNA di FCV.



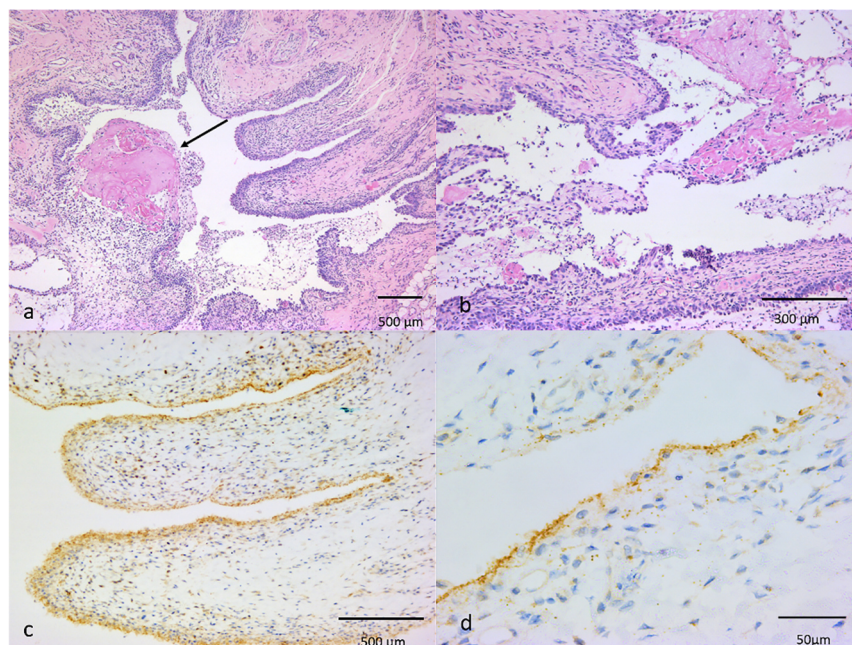
**Figura 6.4.** Albero filogenetico non radicato costruito con le sequenze nucleotidiche di FCV ottenute in questo studio e 65 ceppi di riferimento ottenuti dal database GenBank (**Allegato 6.1**). L'albero è stato costruito sull'allineamento nucleotidico del frammento 3' dell'ORF2, compreso tra i nucleotidi 6604 e 7329 del ceppo di riferimento F9 (GenBank ID: M86379). L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il software MEGA 11 versione 11.0.10 (Tamura et al., 2021) e il metodo Maximum Likelihood. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA 11 e il modello General Time Reversible (GTR) con distribuzione gamma e siti invariabili è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori all'80% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. I ceppi di FCV inclusi nell'analisi filogenetica sono nominati nel seguente modo: ceppo, acronimo della nazione (AU: Australia, CA: Canada, CN: Cina, DE: Germania, IT: Italia, JP: Giappone, KR: Corea del Sud, NZ: Nuova Zelanda, UK: Regno Unito, US: Stati Uniti d'America), anno di identificazione (o anno in cui la sequenza nucleotidica è stata depositata nel database), numero identificativo di GenBank e specie ospite diversa dal gatto. Evidenziate in nero: sequenze nucleotidiche di FCV generate in questo studio. Evidenziate in grigio: ceppi di riferimento di origine vaccinale. Incorniciati: ceppi di riferimento identificati in gatti con zoppia.

**Tabella 6.1.** Principali lesioni istopatologiche e relativo punteggio in differenti articolazioni, incluso il punteggio di immunomarcatura per l'antigene virale di calicivirus felino (FCV) ottenuto dall'esame immunohistochimico (IHC), riscontrati nel Gatto3 (ID: 1072/2018).

	<b>Carpo S</b>	<b>Carpo D</b>	<b>Ginocchio S</b>	<b>Ginocchio D</b>	<b>Tarso S</b>	<b>Tarso D</b>
Iperplasia sinoviale	+++	++	+	+	+++	+
Fibrina	+++	++	+	+	+++	+
Infiammazione	+++	+	+	+	+++	+
Necrosi	+	-	-	-	+	-
IHC	++++	++	++	+	++	++

Punteggio istopatologico: -: assenza di lesioni, +: minimo, ++: lieve, +++: moderato, ++++: grave, +++++: perdita completa della struttura. Punteggio IHC (distribuzione dell'antigene virale di FCV, come determinato dall'esame immunohistochimico): -: negativo, +: presenza occasionale di cellule immunomarcate, ++: scarso numero di cellule, +++: moderato, ++++: numeroso, +++++: presenza diffusa di immunomarcatori.

D: destro, IHC: immunohistochimica, S: sinistro.



**Figura 6.5.** Articolazioni del Gatto3 (ID: 1072/2018). **a.** Istologia del carpo sinistro che mostrava iperplasia diffusa di grado moderato dei sinoviociti dello strato più interno, deposizione di fibrina (freccia) e infiltrati infiammatori. Barra di scala: 500 µm. Ematossilina-eosina. **b.** Istologia del tarso sinistro che mostrava numerosi neutrofili reattivi e degenerati frammentati a fibrina. Barra di scala: 300 µm. Ematossilina-eosina. **c.** Sinoviociti iperplastici nello strato più interno del carpo sinistro risultato positivo nei confronti degli antigeni virali di FCV ad immunocolorazione citoplasmatica. Barra di scala: 500 µm. Immunohistochimica (IHC). **d.** Tarso sinistro, immunocolorazione citoplasmatica positiva nei confronti degli antigeni virali di FCV osservata principalmente nei sinoviociti dello strato più interno e meno frequentemente nei fibroblasti dello strato intermedio. Barra di scala: 50 µm. IHC.

## 6.4 Discussione

In questo studio, il rilevamento dell'RNA o degli antigeni virali di FCV nelle articolazioni patologiche è fortemente indicativo dell'insorgenza di poliartrite nei gatti con infezione da FCV. I tre gatti inclusi in questo studio mostravano all'esame citologico del liquido sinoviale un quadro indicativo di infiammazione suppurativa (>1000 cellule nucleate/ml con >10% di neutrofili, Lemetayer e Taylor, 2014) e alterazioni ematologiche e biochimiche riconducibili a infiammazione, compatibile con poliartrite. Un precedente studio in letteratura ha riportato alcune alterazioni

clinicopatologiche in un gattino con artrite infetto da FCV (Levy e Marsh, 1992) che, a differenza dei gatti inclusi nel nostro studio, mostrava leucopenia con un lieve left-shift e neutrofili tossici, probabilmente derivanti da viremia acuta o vaccinazione recente. Il rilevamento degli antigeni virali di FCV nelle membrane sinoviali di un gatto (Gatto3) con grave poliartrite e zoppia, senza rilevamento dell'acido nucleico virale nel liquido sinoviale, supporta l'ipotesi che l'FCV possa essere trovato sottoforma di aggregati di immunocomplessi nelle articolazioni dei gatti infetti (Bennett et al., 1989) o possa agire come innesco della risposta immuno-mediata che coinvolge le articolazioni come riportato per altre patologie (Lemetayer e Taylor, 2014). Dal momento che il liquido sinoviale del Gatto3 è stato testato per l'RNA di FCV subito dopo il campionamento (senza subire fenomeni di congelamento e scongelamento), il risultato negativo ottenuto non può essere correlato alla degradazione dell'RNA virale. Piuttosto, è possibile ipotizzare che il virus (e il suo RNA) fosse localizzato in un compartimento articolare non accessibile dall'artrocentesi. Inoltre, le membrane sinoviali del Gatto3 sono state analizzate otto mesi dopo l'insorgenza della zoppia e il rilevamento dell'RNA di FCV nel tratto respiratorio superiore, indicativo di infezione persistente, è spesso riportato per l'FCV in letteratura (Coyne et al., 2006; Wardley, 1976). Questo risultato è in contrasto con quanto descritto da Pedersen e colleghi (1983) in corso di zoppia transitoria con possibile guarigione dopo pochi giorni dall'insorgenza dei segni clinici.

La regione ipervariabile E del gene ORF2 è stata sequenziata per un FCV identificato in questo studio. Per gli altri due gatti, non è stato possibile ottenere sequenze geniche di FCV probabilmente come conseguenza della scarsa quantità di RNA virale rilevata nei campioni testati. Non sono stati evidenziati raggruppamenti filogenetici per l'FCV identificato nel Gatto2, come riportato in altri studi (Hou et al., 2016; Glenn et al., 1999; Radford et al., 1997). Le sequenze nucleotidiche virali ottenute da entrambi i campioni di liquido sinoviale e tamponi di questo gatto erano identiche, pertanto è possibile escludere una coinfezione con due virus con differente tropismo tissutale. La scarsa identità nucleotidica tra i virus sequenziati e tutte le sequenze di riferimento analizzate è in accordo con quanto riportato in letteratura (Pesavento et al., 2008). Infatti, numerosi studi riportano un'elevata distanza genetica tra FCV epidemiologicamente non correlati, indipendentemente dalla presentazione clinica dei gatti infetti (Hou et al., 2016; Coyne et al., 2012; Glenn et al., 1999; Radford et al., 1997). Sebbene almeno due gatti inclusi in questo studio fossero regolarmente vaccinati nei confronti dell'infezione da FCV e in letteratura la zoppia nei cuccioli sia riportata in seguito alla prima vaccinazione (Dawson et al., 1993), i dati in nostro possesso non supportano correlazioni tra la vaccinazione e lo sviluppo della sintomatologia, in quanto le sequenze di FCV ottenute dal Gatto2 erano diverse dai ceppi vaccinali inclusi nell'analisi filogenetica. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per confermare l'associazione tra la poliartrite e la vaccinazione nei confronti di FCV.



Il presente studio aveva alcuni limiti. Prima di tutto, è stato incluso un ridotto numero di gatti, pertanto, sarebbero necessari studi prospettici con un numero più elevato di gatti, al fine di valutare in modo più accurato la frequenza di poliartrite in gatti con infezione da FCV. Inoltre, il rilevamento dell'RNA di FCV nei campioni di liquido sinoviale, anche se fortemente indicativo, non dimostra il rapporto di causa-effetto tra l'infezione e l'insorgenza di poliartrite, quindi la presenza di altre cause concomitanti e non diagnosticate di poliartrite, per quanto improbabile, non può essere esclusa con assoluta certezza nei due gatti non sottoposti a IHC.

## **6.5 Conclusione**

Questo studio ha fornito nuovi dati sull'insorgenza di poliartrite in gatti con infezione da FCV, ha rilevato tramite IHC la presenza di FCV nelle membrane sinoviali di un gatto con poliartrite persistente ed ha evidenziato l'assenza di correlazione tra zoppia e raggruppamento filogenetico dei virus.

## 6.6 Bibliografia

- Barger AM. Musculoskeletal System. In: Rose E, Meyer D. (Eds), *Canine and feline cytology. A color atlas and interpretation guide*, third ed. 2016. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 353-368.
- Battilani M, Vaccari F, Carelle MS, Morandi F, Benazzi C, Kipar A, Dondi F, Scagliarini A. Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: a case description. *Res Vet Sci.* 2013; 95(1):283-90. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.025.
- Bennett D, Gaskell RM, Mills A, Knowles J, Carter S, McArdle F. Detection of feline calicivirus antigens in the joints of infected cats. *Vet Rec.* 1989; 124(13):329-32. doi: 10.1136/vr.124.13.329.
- Clements DN, Gear RN, Tattersall J, Carmichael S, Bennett D. Type I immune-mediated polyarthritis in dogs: 39 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 224(8):1323-7. doi: 10.2460/javma.2004.224.1323.
- Coyne KP, Christley RM, Pybus OG, Dawson S, Gaskell RM, Radford AD. Large-scale spatial and temporal genetic diversity of feline calicivirus. *J Virol.* 2012; 86(20):11356-67. doi: 10.1128/JVI.00701-12.
- Coyne KP, Dawson S, Radford AD, Cripps PJ, Porter CJ, McCracken CM, Gaskell RM. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Vet Microbiol.* 2006; 118(1-2):12-25. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.06.026.
- Darren Wood R, Gibson T. In: Sharkey LC, Radin MJ, Seelig D. (Eds), *Synovial fluid analysis of the dog and cat, veterinary cytology*, first ed. 2021. Wiley-Blackwell Hoboken, New Jersey, pp. 727-733.
- Dawson S, McArdle F, Bennett D, Carter SD, Bennett M, Ryvar R, Gaskell RM. Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination. *Vet Rec.* 1993; 132(14):346-50. doi: 10.1136/vr.132.14.346.
- Glenn M, Radford AD, Turner PC, Carter M, Lowery D, DeSilver DA, Meanger J, Baulch-Brown C, Bennett M, Gaskell RM. Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCVs. *Vet Microbiol.* 1999; 67(3):175-93. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00043-7.
- Helps C, Lait P, Tasker S, Harbour D. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR. *J Virol Methods.* 2002; 106(2):241-4. doi: 10.1016/s0166-0934(02)00167-2.
- Hou J, Sánchez-Vizcaíno F, McGahie D, Lesbros C, Almeras T, Howarth D, O'Hara V, Dawson S, Radford AD. European molecular epidemiology and strain diversity of feline calicivirus. *Vet Rec.* 2016; 178(5):114-5. doi: 10.1136/vr.103446.
- Lemetayer J, Taylor S. Inflammatory joint disease in cats: diagnostic approach and treatment. *J Feline Med Surg.* 2014; 16(7):547-62. doi: 10.1177/1098612X14539086.
- Levy JK, Marsh A. Isolation of calicivirus from the joint of a kitten with arthritis. *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 201(5):753-5.

- Pacchiana PD, Gilley RS, Wallace LJ, Hayden DW, Feeney DA, Jessen CR, Aird B. Absolute and relative cell counts for synovial fluid from clinically normal shoulder and stifle joints in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 225(12):1866-70. doi: 10.2460/javma.2004.225.1866.
- Pedersen NC, Ekman S, Laliberte L. A transient febrile “limping” syndrome of kittens caused by two different strains of feline calicivirus. *Feline Pract.* 1983; 13:26-35.
- Pesavento PA, Chang KO, Parker JS. Molecular virology of feline calicivirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008; 38(4):775-86, vii. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.03.002.
- Radford AD, Bennett M, McArdle F, Dawson S, Turner PC, Glenn MA, Gaskell RM. The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. *Vaccine.* 1997; 15(12-13):1451-8. doi: 10.1016/s0264-410x(97)00059-5.
- Rondeau MP, Walton RM, Bissett S, Drobatz KJ, Washabau RJ. Suppurative, nonseptic polyarthropathy in dogs. *J Vet Intern Med.* 2005; 19(5):654-62. doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[654:snpid]2.0.co;2.
- Stone M. Immune-mediated polyarthritis and other polyarthritides. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E. (Eds), *Textbook of veterinary internal medicine*, eighth ed. 2017. Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 861-865.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021; 38(7):3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.
- Wardley RC. Feline calicivirus carrier state. A study of the host/virus relationship. *Arch Virol.* 1976; 52(3):243-9. doi: 10.1007/BF01348021.



## **STUDIO 7: RICERCA DEL DNA DI *ANAPLASMA* SPP. ED *EHRlichia* SPP. IN DIVERSE MATRICI BIOLOGICHE DI GATTI**

[Pubblicato su *Research in Veterinary Science* il 2021, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.05.003]

### **7.1 Obiettivi dello studio**

Allo scopo di avere una valutazione sulla diffusione delle infezioni trasmesse da vettori nel gatto è stata indagata la presenza del DNA di *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp. in gatti di proprietà e gatti provenienti da rifugi sottoposti a necropsopia nel periodo compreso tra aprile 2016 e maggio 2017 testando con metodiche molecolari campioni di milza, midollo osseo, coagulo di sangue e pelo. I batteri identificati sono stati caratterizzati geneticamente.

### **7.2 Materiali e metodi**

#### *7.2.1 Disegno dello studio e campionamento*

Lo studio è stato realizzato presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna. In questo studio prospettico sono stati inclusi gatti deceduti o sottoposti ad eutanasia per motivi etici da aprile 2016 a maggio 2017 dopo aver ricevuto dai proprietari il consenso per le pratiche autoptiche. Per ciascun gatto incluso è stato eseguito un esame post-mortem e sono stati campionati i seguenti tessuti: milza, midollo osseo, coagulo di sangue e pelo. Le matrici biologiche raccolte sono state stoccate a -20 °C fino all'esecuzione delle prove di laboratorio. I dati relativi al segnalamento e all'anamnesi dei soggetti sono stati recuperati dalle cartelle cliniche. Nel corso della loro vita, alcuni gatti erano stati testati per la presenza di anticorpi (anti-p24 e anti-gp40) verso il virus dell'immunodeficienza felina (FIV) e dell'antigene p27 del virus della leucemia felina (FeLV) in campioni di plasma, siero o sangue intero utilizzando un test point-of-care basato sul saggio ELISA (SNAP FIV/FeLV Combo Plus test, IDEXX, Westbrook, ME, USA).

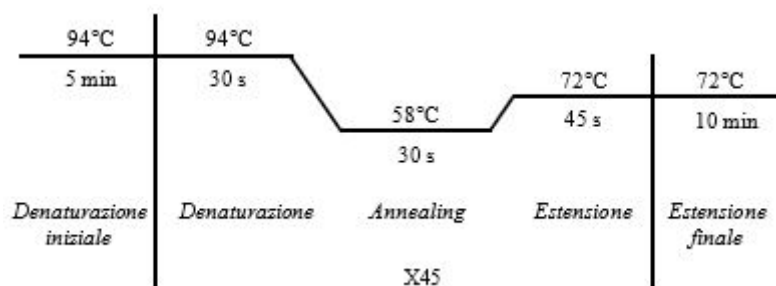
#### *7.2.2 Ricerca del DNA di *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp.*

L'estrazione del DNA dai campioni è stata eseguita presso i laboratori dell'Unità Operativa di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del DIMEVET, utilizzando il kit Nucleo Spin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germania). L'estrazione del DNA da di milza, midollo osseo e coagulo di sangue è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore, come illustrato nel paragrafo 1.2.2 (**Studio 1**). Per l'estrazione del DNA dal pelo è stato utilizzato lo stesso kit ma apportando alcune modifiche. In particolare, il pelo è stato tagliato in tre segmenti (prossimale, centrale e distale) al fine di includere i bulbi piliferi e gli apici del pelo stesso, lisato a 56°C overnight con 250 µl di buffer di lisi (Buffer T1) e 50 µl di proteinasi k e poi si è

proseguito come da protocollo riportato nel paragrafo 1.2.2 (**Studio 1**), come riportato da Urbani e colleghi (2020). Il DNA estratto è stato eluito in 100 µl di buffer di eluizione e stoccato a -20 °C. La presenza del DNA di *Anaplasma* spp. e di *Ehrlichia* spp. è stata rilevata usando un saggio di end-point PCR che amplificava un frammento di circa 600 nucleotidi del gene codificante per la proteina heat shock (groEL) precedentemente descritto da Barber e colleghi (2010), con la coppia di primer groEL\_For\_643: 5'-ACT GAT GGT ATG CAR TTT GAY CG-3' e groEL\_Rev\_1236: 5'-TCT TTR CGT TCY TTM ACY TCA ACT TC-3'. La end-point PCR è stata eseguita utilizzando un kit commerciale con Taq-polymerase (Taq DNA Polymerase Kit, QIAGEN, Hilden, Germania) ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguendo le istruzioni del fornitore. La mix di reazione è riportata in **Tabella 7.1** ed il profilo termico in **Figura 7.1**. L'estratto di DNA positivo per *Anaplasma phagocytophilum* numero 862/2014 (GenBank ID: KT970678, De Arcangeli et al., 2018), è stato utilizzato come controllo positivo della reazione di amplificazione. Durante l'esecuzione della reazione di amplificazione, sono state adottate tutte le precauzioni standard per evitare eventuali contaminazioni ed un bianco di reazione, costituito da acqua ultrapura per biologia molecolare, è stato aggiunto per escludere eventuali falsi positivi.

**Tabella 7.1.** Mix di reazione adottata per l'amplificazione con end-point PCR del DNA di *Anaplasma* spp. e di *Ehrlichia* spp. (Taq DNA Polymerase Kit, QIAGEN, Hilden, Germania).

Componenti kit	Concentrazione iniziale	Volume di reazione	Concentrazione finale
PCR BFR	10X	5 µl	1X
QSol	5X	10 µl	1X
dNTP	2.5 mM	4 µl	0.2 mM
Primer forward	20 picomoli/µl	1 µl	0.4 picomoli/µl
Primer reverse	20 picomoli/µl	1 µl	0.4 picomoli/µl
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0.25 µl	0.025 U/µl
DNA templat	-	5 µl	-
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	23.75 µl	-
Volume finale	-	50 µl	-



**Figura 7.1.** Ciclo di amplificazione per generare un frammento di circa 600 paia di basi del gene groEL di *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp.

Al termine della reazione di amplificazione la presenza degli amplificati delle dimensioni attese è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% (p/v) addizionato con Midori

Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Chiyoda-ku, Tokyo, Giappone) in buffer tris-acetato-EDTA (TAE). La corsa è avvenuta in un campo elettrico con differenza in potenziale di 110 Volt per 40 minuti. Sono stati caricati 5 $\mu$ l di ogni amplicone insieme al marker (Mk) GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) e la visualizzazione del gel è avvenuta mediante raggi UV.

### *7.2.3 Analisi di sequenza*

I prodotti di PCR per i quali era visibile una banda specifica delle dimensioni attese sono stati purificati con il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le indicazioni riportate nel manuale del produttore, quantificati allo spettrofotometro e sequenziati con metodo di Sanger presso l'azienda BioFab Research (Roma, Italia) utilizzando i primer di amplificazione.

Le sequenze ottenute sono state assemblate, analizzate con l'interfaccia web di BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, data di accesso: 09/2020), allineate con sequenze di referenza presenti nel database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, data di accesso: 09/2020) utilizzando il metodo ClustalW implementato nel software BioEdit versione 7.2.5 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), e tradotte in sequenze aminoacidiche. Le relazioni filogenetiche tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di referenza sono state analizzate usando il metodo Minimum Evolution implementato nel software MEGA X versione 10.1.7 (Pennsylvania State University, University Park, PA, USA) (Kumar et al., 2018). L'albero filogenetico è stato costruito usando il modello di sostituzione nucleotidica Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma. La robustezza degli alberi filogenetici è stata stimata mediante test di bootstrap con 1000 ripetizioni dell'analisi.

### *7.2.4 Analisi statistica*

I dati sono stati analizzati mediante statistica descrittiva e il confronto tra i sottogruppi (sesso, età, razza, stile di vita e risultati del test rapido FIV-FeLV) è stato effettuato usando il test del Chi-quadrato. I dati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di  $P < 0.05$ . L'analisi statistica è stata effettuata usando un software statistico disponibile in commercio (MedCalc Statistical Software versione 16.8.4).

## 7.3 Risultati

### 7.3.1 Popolazione di studio e campionamento

Durante il periodo di studio, sono stati inclusi 37 gatti (**Tabella 7.2**) con età mediana di 49 mesi (range: 2 mesi - 16 anni e 7 mesi). L'unico gatto di razza era un Siamese. I gatti inclusi nello studio erano principalmente provenienti da una comunità felina, in cui erano entrati dopo la nascita perché appartenenti a cucciolate non desiderate, oppure perché precedentemente di proprietà e poi abbandonati. Questa comunità felina consentiva l'adozione, anche se molti gatti vi rimanevano per tutta la vita, ed era una struttura ben isolata con accesso all'esterno che impediva ai gatti di entrare in contatto con altri animali. Diciannove dei 37 (51.4%) gatti sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-FIV e dell'antigene FeLV: 6/19 (31.6%) sono risultati positivi, tre per anticorpi anti-FIV, uno per l'antigene FeLV e due per entrambi. Trentaquattro su 37 (91.9%) gatti avevano lesioni macroscopiche in uno o più apparati compatibili con patologie di differente gravità, nove di questi mostravano lesioni riconducibili all'infezione da virus della peritonite infettiva felina (FIP). Tre su 37 (8.1%) gatti non mostravano lesioni macroscopiche all'esame post-mortem. I campioni di fegato, midollo osseo e pelo sono stati prelevati da ogni animale incluso nello studio, mentre il coagulo di sangue è stato campionato da 30/37 gatti perché nei rimanenti sette gatti il sangue era andato incontro a processo di lisi a causa del congelamento e scongelamento delle carcasse.

**Tabella 7.2.** Statistica descrittiva e risultati della ricerca del DNA di *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.

Variabili	Totale	Positivi per <i>A. phagocytophilum</i>	Negativi per <i>A. phagocytophilum</i>	P value <sup>a</sup>
Gatti inclusi nello studio	37	3 (8.1)	34 (91.9)	
Sesso				0.961
Maschi	18 (48.6)	1 (5.6)	17 (94.4)	
Femmine	19 (51.4)	2 (10.5)	17 (89.5)	
Età (mesi)				<b>0.003</b>
Cuccioli <6	4 (10.8)	0 (0)	4 (100)	
Giovani 6–24	8 (21.6)	3 (37.5)	5 (62.5)	
Adulti >24	24 (64.9)	0 (0)	24 (100)	
ND	1 (2.7)	0 (0)	1 (100)	
Razza				0.126
Europeo	35 (94.6)	3 (8.6)	32 (91.4)	
Razza	1 (2.7)	0 (0)	1 (100)	
ND	1 (2.7)	0 (0)	1 (100)	
Stile di vita				0.747
Gatti di proprietà	9 (24.3)	0 (0)	9 (100)	
Comunità feline (gattili)	28 (75.7)	3 (10.7)	25 (89.3)	
IgG anti-FIV e/o Ag FeLV				0.545
Positivi	6 (16.2)	0 (0)	6 (100)	
Negativi	13 (35.1)	3 (23.1)	10 (76.9)	
ND	18 (48.7)	0 (0)	18 (100)	

<sup>a</sup> Valori di P (P value) < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

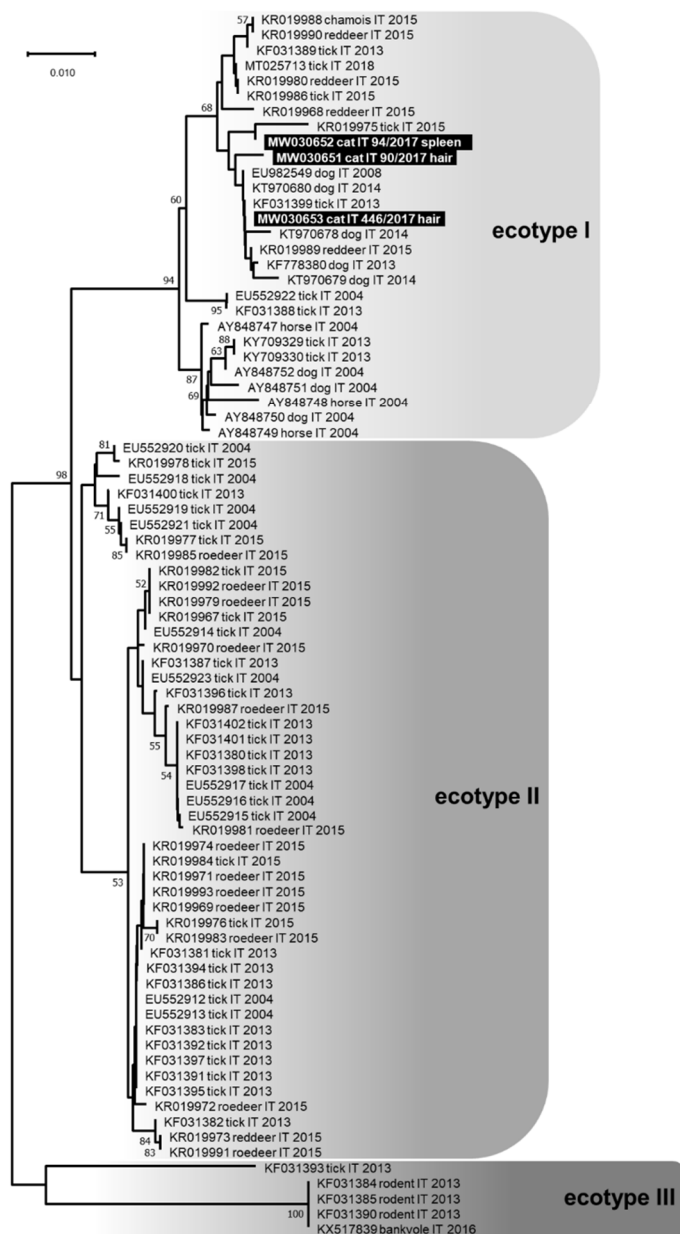
ND: dato non disponibile.

### 7.3.2 Ricerca del DNA di *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp. e analisi di sequenza

Tre su 37 (8.1%) gatti sono risultati positivi in PCR: due nei campioni di pelo (ID: 90/2017 e 446/2017) e uno nel campione di milza (ID 94/2017). Per i gatti 90/2017 e 94/2017 erano state



campionate e testate tutte le quattro matrici biologiche, mentre per il gatto 446/2017 il coagulo di sangue non era stato campionato. Le sequenze nucleotidiche assemblate ottenute per i gatti 90/2017 e 446/2017 erano di 520 paia di basi di lunghezza, mentre la sequenza nucleotidica ottenuta per il gatto 94/2017 era di 232 paia di basi di lunghezza (GenBank ID: MW030651 a MW030653).



**Figura 7.2.** Albero filogenetico non radicato costruito con le sequenze nucleotidiche parziali (546 paia di basi) del gene groEL di *Anaplasma phagocytophilum*. L'analisi filogenetica è stata effettuata usando il metodo Minimum Evolution implementato nel software MEGA X versione 10.1.7 (Kumar et al., 2018) sull'allineamento multiplo costruito con le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio e 77 sequenze di riferimento di *A. phagocytophilum* ottenute da GenBank, identificate nelle zecche e in diversi mammiferi in Italia. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'utilizzo della funzione "Find Best DNA/Protein Model" implementata in MEGA X e il modello Tamura 3-parametri (T92) con distribuzione gamma è risultato ottimale per i dati di sequenza. I valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati. I valori di bootstrap superiori al 50% sono indicati nei corrispondenti nodi. La barra di scala indica il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche. Evidenziate in nero: sequenze generate in questo studio. Sono illustrati i tre principali cluster coincidenti con la classificazione in ecotipi proposta da Jahfari e collaboratori (2014).

Le sequenze ottenute mostravano una identità nucleotidica del 99.1-99.5% tra di loro e l'analisi con BLAST ha trovato maggior similitudine con sequenze di *A. phagocytophilum*. Un'associazione statisticamente significativa è stata riscontrata tra la positività al DNA di *A. phagocytophilum* e l'età dei soggetti, con i gatti positivi che avevano tutti età compresa tra 6 e 24 mesi ( $P = 0.003$ , **Tabella 7.2**). Non sono state rilevate altre associazioni significative tra i dati di segnalamento e anamnestici e la positività al test molecolare. Sebbene il dato non sia risultato statisticamente significativo, tutti i

gatti positivi provenivano da comunità felina e avevano accesso all'ambiente esterno (**Tabella 7.2**). L'albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche di un tratto del gene groEL di *A. phagocytophilum* di origine italiana era caratterizzato da tre principali cluster (**Figura 7.2**), coincidenti con i primi tre dei quattro ecotipi proposti da Jahfari e collaboratori (2014). Tutte e tre le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio raggruppavano nell'ecotipo I con le sequenze di *A. phagocytophilum* identificate nelle zecche e in diverse specie di mammiferi (cane, cavallo, cervo e camoscio).

#### 7.4 Discussione

In questo studio, 3/37 (8.1%) gatti provenienti dal nord Italia sono risultati positivi per la presenza del DNA di *A. phagocytophilum* in campioni di milza (un gatto) o in campioni di pelo (due gatti). Nessuno dei gatti inclusi nello studio è risultato positivo per il DNA di altre specie di *Anaplasma* o *Ehrlichia*. La frequenza di positività al DNA di *A. phagocytophilum* nei gatti in questo studio era più bassa di quanto riportato in gatti randagi urbani in un'area geografica limitrofa testando campioni di sangue (Spada et al., 2014). L'elevata prevalenza (17.7% per *A. phagocytophilum* e 5.4% per *Ehrlichia* spp.) rilevata da Spada e colleghi (2014) è dovuta probabilmente allo stile di vita dei gatti campionati in quanto è stato riportato un aumento statisticamente significativo dell'infezione da *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp. in gatti randagi (Maia et al., 2014). Infatti, i tre gatti risultati positivi nel nostro studio provenivano da una comunità felina con accesso all'ambiente esterno, e avevano pertanto stile di vita ed esposizione a fattori di rischio simili a quelli dei gatti randagi. Nessun gatto di proprietà è risultato positivo. Dall'analisi statistica effettuata sui dati di segnalamento ed anamnestici, solamente l'età è risultata statisticamente associata all'infezione da *A. phagocytophilum*, con tutti i gatti positivi che avevano età compresa tra 6 e 24 mesi. Al contrario, Ebani e Bertelloni (2014) hanno riportato sieroprevalenze più elevate in soggetti di razza europea e di età adulta rispetto ai gatti di razza e più giovani.

Nessuno dei gatti inclusi nello studio è risultato positivo al test molecolare effettuato sui campioni di midollo osseo e coagulo di sangue, inclusi i tre gatti testati positivi in campioni di milza e pelo. Risultati concordi sono stati riportati in Grecia in uno studio in cui non è stato rilevato il DNA di *Anaplasma* spp. né in campioni di midollo osseo né in campioni di sangue di gatti con metodiche molecolari (Mylonakis et al., 2018). Ad oggi, il sangue periferico intero è considerato il campione di elezione per la ricerca del DNA di *Anaplasma* spp. ed *Ehrlichia* spp. nei gatti (Lappin et al., 2020; Schäfer e Kohn, 2020; Pennisi et al., 2017). Le metodiche molecolari impiegate per la ricerca di *A. phagocytophilum* nel sangue hanno elevata sensibilità e specificità ma potrebbero generare falsi negativi a causa dello scarso numero di morule all'interno dei granulociti neutrofili circolanti o per

l'assenza dell'agente patogeno nel sangue in corso di infezioni croniche (Schäfer e Kohn, 2020). L'assenza di risultati positivi nei campioni di sangue testati nel nostro studio, potrebbe essere dovuta ad una bassa sensibilità dalla metodica utilizzata oppure dalla degradazione dei campioni testati, essendo stati raccolti da animali deceduti e spesso sottoposti a congelamento e scongelamento. Contrariamente, in letteratura è stato ipotizzato che *E. canis* possa persistere per lungo tempo in campioni di milza rispetto al sangue periferico, infatti Harrus e colleghi (2004) hanno riportato nei cani percentuali di positività al DNA di *E. canis* in campioni di aspirato splenico piuttosto che di sangue. *A. phagocytophilum* potrebbe avere una persistenza analoga nella milza dei gatti, rendendo questo tessuto una matrice biologica adatta ai fini diagnostici in alternativa al sangue periferico. È noto che il pelo possa accumulare sostanze tossiche ambientali ed espellere sostanze chimiche estranee o sostanze biologiche. In questo contesto, alcuni autori hanno ipotizzato che sia possibile trovare DNA estraneo nel pelo di un organismo infetto, e quindi, essere rilevato mediante test molecolari eseguiti su questa matrice biologica (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). Iniesta e collaboratori (2013) hanno proposto due potenziali meccanismi all'origine del rilevamento di DNA estraneo nel pelo di animali infettati da *Leishmania major*: una eliminazione trans epidermica nel sito di inoculo con incorporazione diretta del DNA parassitario nei cheratinociti e il suo passaggio attraverso il pelo durante il processo di cheratinizzazione, e/o l'incorporazione del DNA parassitario nel pelo tramite migrazione dal circolo sanguigno. Meccanismi simili potrebbero essere ipotizzati per altri patogeni trasmessi da vettori e circolanti nel sangue della specie ospite. Inoltre, nello studio di Iniesta e colleghi (2013), il numero di animali infetti da *L. major* risultati positivi per il DNA del protozoo nel pelo, e la carica di DNA rilevata in questa matrice biologica, aumentava progressivamente con il tempo trascorso dall'infezione. Pertanto, l'uso del pelo per la ricerca del DNA patogeno potrebbe ridurre i risultati falsi negativi che spesso si verificano in animali con infezioni croniche. Il numero limitato di gatti testati nel nostro studio non consente di dare conclusioni definitive a riguardo ma, dai risultati ottenuti, si può ipotizzare che l'utilizzo di matrici biologiche differenti dal sangue, come la milza o il pelo, possa permettere di rilevare il DNA di *A. phagocytophilum* in gatti risultati negativi al test molecolare eseguito su campioni di sangue. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per confermare questa ipotesi.

L'analisi filogenetica ha evidenziato la presenza di tre cluster che includevano tutte le sequenze nucleotidiche del gene groEL di *A. phagocytophilum* identificate in Italia e corrispondevano ai primi tre dei quattro ecotipi proposti da Jahfari e colleghi (2014) nel continente europeo. Il quarto ecotipo, composto da *A. phagocytophilum* identificati negli uccelli, non era presente nell'albero filogenetico perché non sono disponibili in GenBank sequenze nucleotidiche del gene groEL di *A. phagocytophilum* identificate negli uccelli in Italia. L'ecotipo 1, che includeva le sequenze di *A.*

*phagocytophilum* ottenute nel nostro studio, comprende anche ceppi identificati in zecche e numerose specie di mammiferi compreso l'uomo, a dimostrazione del fatto che i ceppi appartenenti a questo ecotipo sono potenzialmente responsabili di zoonosi (Jahfari et al., 2014).

## **7.5 Conclusione**

In questo studio è stato dimostrato come il pelo, facile da campionare e conservare, possa rappresentare una matrice biologica da tenere in considerazione per la diagnosi molecolare di *Anaplasma* spp., ed il suo utilizzo dovrebbe essere preso in considerazione per la diagnosi di tutte le infezioni trasmesse da vettori biologici in cui gli agenti patogeni circolano nel sangue. I gatti con anaplasmosi non diagnosticata possono avere un ruolo epidemiologico importante agendo da fonte di infezione per gli ospiti invertebrati aumentando il rischio di trasmissione del patogeno all'uomo e rappresentando di conseguenza un problema di sanità pubblica. Pertanto, sono necessari studi futuri per comparare l'uso di differenti matrici biologiche per la ricerca a scopo diagnostico del DNA di *A. phagocytophilum* ed altri patogeni trasmessi da vettori nella specie felina, per individuare quelle che permettono di ridurre i risultati falsi negativi.

## 7.6 Bibliografia

- Barber RM, Li Q, Diniz PP, Porter BF, Breitschwerdt EB, Claiborne MK, Birkenheuer AJ, Levine JM, Levine GJ, Chandler K, Kenny P, Nghiem P, Wei S, Greene CE, Kent M, Platt SR, Greer K, Schatzberg SJ. Evaluation of brain tissue or cerebrospinal fluid with broadly reactive polymerase chain reaction for *Ehrlichia*, *Anaplasma*, spotted fever group *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in canine neurological diseases (109 cases). *J Vet Intern Med.* 2010; 24(2):372-8. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0466.x.
- Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Parejo JC, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Soto M, Alonso C, Gómez Nieto LC. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2013; 192(1-3):43-50. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.007.
- De Arcangeli S, Balboni A, Serafini F, Battilani M, Dondi F. *Anaplasma phagocytophilum* infection in thrombocytopenic dogs. *Vet Ital.* 2018; 54(1):73-78. doi: 10.12834/VetIt.1070.5796.2.
- Ebani VV, Bertelloni F. Serological evidence of exposure to *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Central Italian healthy domestic cats. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):668-71. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.04.019.
- Harrus S, Kenny M, Miara L, Aizenberg I, Waner T, Shaw S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(11):4488-90. doi: 10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004.
- Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Soto M, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Monroy I, Baz V, Gómez-Luque A, Parejo JC, Alonso C, Nieto LC. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 2013; 128(3):468-72. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.07.007.
- Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, Szekeres S, van Duijvendijk G, Tack W, Rijks JM, van der Giessen J, Takken W, van Wieren SE, Takumi K, Sprong H. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors.* 2014; 7:365. doi: 10.1186/1756-3305-7-365.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Lappin MR, Tasker S, Roura X. Role of vector-borne pathogens in the development of fever in cats: 2. Tick- and sandfly-associated diseases. *J Feline Med Surg.* 2020; 22(1):41-48. doi: 10.1177/1098612X19895942.
- Maia C, Ramos C, Coimbra M, Bastos F, Martins A, Pinto P, Nunes M, Vieira ML, Cardoso L, Campino L. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasit Vectors.* 2014; 7:115. doi: 10.1186/1756-3305-7-115.
- Mylonakis ME, Schreeg M, Chatzis MK, Pearce J, Marr HS, Saridomichelakis MN, Birkenheuer AJ. Molecular detection of vector-borne pathogens in Greek cats. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(2):171-175. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.08.013.

- Pennisi MG, Hofmann-Lehmann R, Radford AD, Tasker S, Belák S, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Horzinek MC, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Thiry E, Truyen U, Möstl K. *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* species infections in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2017; 19(5):542-548. doi: 10.1177/1098612X17706462.
- Schäfer I, Kohn B. *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats: A literature review to raise clinical awareness. *J Feline Med Surg.* 2020; 22(5):428-441. doi: 10.1177/1098612X20917600.
- Spada E, Proverbio D, Galluzzo P, Della Pepa A, Perego R, Bagnagatti De Giorgi G, Ferro E. Molecular study on selected vector-borne infections in urban stray colony cats in northern Italy. *J Feline Med Surg.* 2014; 16(8):684-8. doi: 10.1177/1098612X13514422.
- Urbani L, Tirolo A, Salvatore D, Tumbarello M, Segatore S, Battilani M, Balboni A, Dondi F. Serological, molecular and clinicopathological findings associated with *Leishmania infantum* infection in cats in Northern Italy. *J Feline Med Surg.* 2020; 22(10):935-943. doi: 10.1177/1098612X19895067.

## Considerazioni finali

L'utilizzo integrato di metodiche molecolari negli studi riportati (**Studi 1-7**) ha consentito l'identificazione e la caratterizzazione genetica dei principali agenti infettivi che colpiscono i carnivori domestici e selvatici. In generale, i saggi di real-time PCR impiegati hanno permesso di valutare la presenza e diffusione di agenti infettivi virali e batterici in differenti popolazioni animali; mentre i saggi di end-point PCR e il successivo sequenziamento, hanno consentito la caratterizzazione genetica degli agenti infettivi identificati.

Per il *Carnivore protoparvovirus 1*, dagli **Studi 1 e 4**, è emerso che la prevalenza di infezione nella popolazione di lupi nell'appennino italiano è elevata e che tutti i parvovirus identificati in questa specie appartenevano alla variante CPV-2b, eccetto uno che era un FPV-like; mentre i parvovirus identificati nei cani domestici in Romania appartenevano tutti alla variante CPV-2c con un profilo aminoacidico caratteristico per i ceppi "Asian-like".

Per l'adenovirus canino di tipo 1 e 2 (CA<sub>AdV</sub>-1 e CA<sub>AdV</sub>-2), dagli **Studi 1 e 2** è emerso che entrambi i virus circolano nelle popolazioni di carnivori domestici e selvatici in Italia. In particolare, il CA<sub>AdV</sub>-1 sequenziato in un lupo nello **Studio 1** raggruppava con tutti i CA<sub>AdV</sub>-1 identificati in canidi domestici e selvatici in Italia e Francia che mostravano il residuo 388-Ser nella proteina Hexon; mentre il CA<sub>AdV</sub>-2 più datato rilevato in un cane incluso nello **Studio 2** era filogeneticamente separato da tutti gli altri CA<sub>AdV</sub>-2 identificati nei cani che raggruppavano con il ceppo vaccinale Toronto A26/61.

I risultati ottenuti negli **Studi 1, 2 e 3** confermano che il circovirus canino (CanineCV) circola ampiamente in lupi e cani in Italia e nelle volpi rosse e artiche in Norvegia. Inoltre hanno dimostrato che il CanineCV circola nella popolazione di carnivori domestici e selvatici da più tempo rispetto a quanto precedentemente ipotizzato. Tutti i CanineCV caratterizzati geneticamente nei lupi e cani in Italia negli **Studi 1 e 2** erano strettamente correlati ai virus identificati in cani, lupi e un tasso da Europa, USA, Argentina e Cina, eccetto un CanineCV identificato in un lupo nello **Studio 1** che raggruppava con i virus tipici delle volpi, compresi i CanineCV identificati nelle volpi norvegesi dello **Studio 3**.

Il canine distemper virus (CDV) identificato e caratterizzato nello **Studio 5** in alcune faine ospitate presso un Centro di Recupero in Emilia Romagna apparteneva al sottogruppo genetico Wildlife-Europe (lineage Europe 1/South America 1), altamente diffuso nella fauna selvatica in Centro Europa e Nord Italia e responsabile del primo spillover dalla fauna selvatica a un cane domestico non vaccinato. Mentre due faine infette sono decedute per la gravità della sintomatologia, altre quattro sono guarite dall'infezione e sono state reintrodotte in natura a distanza di circa un anno dal ricovero e con titolo anticorpale considerato adeguatamente protettivo.

Lo **Studio 6** ha permesso di approfondire l'associazione tra la "limping syndrome", con sviluppo di poliartrite e zoppia, e l'infezione da calicivirus felino (FCV) nei gatti. In particolare è stato possibile rilevare la presenza di RNA virale o degli antigeni virali in articolazioni patologiche. La diversità genetica degli FCV sequenziati nello studio rispetto ai ceppi vaccinali non ha evidenziato una possibile correlazione della poliartrite con la vaccinazione.

Il ritrovamento del DNA di *A. phagocytophilum* nel pelo dei gatti avvenuto nello **Studio 7** suggerisce che l'utilizzo di matrici biologiche a bassa invasività di campionamento potrebbe facilitare la diagnosi di infezione in gatti risultati negativi testando il sangue, che rappresenta la matrice biologica di elezione per la ricerca del DNA di questo agente infettivo. L'analisi filogenetica dei batteri identificati, basata sull'analisi del gene *groEL*, ne ha evidenziato l'appartenenza all'ecotipo 1, che include anche ceppi identificati in zecche e numerose specie di mammiferi compreso l'uomo.

Dagli studi inclusi in questa tesi di dottorato emerge come l'applicazione integrata di diverse metodiche molecolari di amplificazione, sequenziamento ed analisi degli acidi nucleici abbia una ricaduta pratica per la prevenzione e il controllo dei patogeni infettivi che circolano nelle popolazioni di carnivori domestici e selvatici: da un lato le tecniche molecolari di amplificazione consentono una diagnosi rapida, tempestiva ed accurata delle malattie ad eziologia virale e batterica, dall'altro le tecniche di sequenziamento ed analisi degli acidi nucleici permettono di ottenere dati relativi all'evoluzione dei patogeni e all'epidemiologia delle infezioni sostenute da tali agenti infettivi.



## Allegati

**Allegato 1.1.** Sequenze nucleotidiche di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute nello **Studio 1** e sequenze di referenza reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Patogeno	Dimensione (nt)	Specie ospiti	Matrice biologica	Anno	Origine geografica
AF306450	637	CPV-2b	1745	Cane	ND	1996	Italia
AY742934	CPV-447	CPV-2b	4432	Cane	ND	1995	Germania
AY742935	CPV-U6	CPV-2a	4432	Cane	ND	1995	Germania
D26079	Y1	CPV-2a	5075	Cane	ND	1993	Giappone
DQ354068	RPPV	CPV-2a	1755	Panda rosso	ND	2004	Cina
EF418569	PT06	FPV	1850	Leone	Feci	2006	Portogallo
EU145593	389/07	FPV	1755	Zibetto asiatico delle palme	ND	2007	Ungheria
EU498688	134/04-1	FPV	1755	Gatto	Feci	2004	Italia
EU659116	CPV-5.us.79	CPV-2	4269	Cane	ND	1979	USA
EU659121	CPV-411b.us.98	CPV-2b	4269	Cane	ND	1998	USA
FPU22185	BFPV-1	FPV	2256	Volpe artica	ND	1983	Finlandia
FPU22188	377	FPV	1957	Gatto selvatico	ND	1993	Germania
GQ857595	BFPV	FPV	1755	Volpe blu	ND	2008	Cina
JF422105	PT09	FPV	1755	Mangusta egiziana	Intestino, limfonodo	2009	Portogallo
JN867615	CPV/Raccoon/GA/287/08	CPV-2a	4627	Procione	ND	2009	USA
JQ268284	CPV-LZ2	CPV-2b	5053	Cane	ND	2011	Cina
JX411926	PT10	CPV-2b	1755	Faina	Intestino, limfonodo	2010	Portogallo
JX475240	AZ/16382-01/99	CPV-2b	1755	Lupo	ND	1999	USA
JX475241	NM/16401-01/99	CPV-2b	1755	Lupo	ND	1999	USA
KF373569	603/1995	CPV-2b	1745	Cane	ND	1995	Italia
KF373599	461/2009	CPV-2b	1745	Cane	ND	2009	Italia
KF803600	BJ-A68	CPV-2a	1752	Cane	ND	2010	Cina
KJ813848	ND/1162/2013	CPV-2c	1755	Lince	ND	2013	USA
KJ813854	ND/F205/2013	CPV-2c	1755	Puma	ND	2013	USA
KJ813863	ND/M96/2013	CPV-2b	1755	Puma	ND	2013	USA
KJ813871	VT/460/2013	CPV-2a	1755	Procione	ND	2013	USA
KJ813882	NI/1423/2012	CPV-2b	1755	Procione	ND	2012	USA
KM457120	UY242	CPV-2c	4269	Cane	ND	2010	Uruguay
KP682511	150	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2011	Spagna
KP682512	158	CPV-2b	1746	Lupo	Milza	2012	Spagna
KP682513	163	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2012	Spagna
KP682516	171	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2013	Spagna
KP682517	173	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2013	Spagna
KP682520	351	FPV	1746	Tasso	Milza	2013	Spagna
KP682521	417	CPV-2c	1746	Tasso	Milza	2009	Spagna
KP682523	154	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2012	Spagna
KP682526	298	FPV	1746	Faina	Milza	2002	Spagna
KP682527	172	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2011	Spagna
KP682528	170	CPV-2c	1746	Lupo	Milza	2011	Spagna

GenBank ID	Ceppo	Patogeno	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica
KP682530	160	CPV-2c	1678	Lupo	Milza	2012	Spagna
KR002794	CPV/CN/HB3/2013	CPV-2a	4269	Cane	ND	2013	Cina
KU662350	W52/PT/05	CPV-2b	1755	Lupo	Fegato	2005	Portogallo
KU662351	Sm14/PT/08	CPV-2c	1755	Faina	Milza	2008	Portogallo
KX268106	TR-02	CPV-2b	1752	Cane	ND	2013	Turchia
KX774252	Bel2015-02	CPV-2b	5020	Cane	ND	2015	Brasile
KX943311	IZSSI/3201intl	FPV	1745	Gatto	Intestino	2015	Italia
LC214970	CPV/dog/HCM/22/2013	CPV-2a	4269	Cane	ND	2013	Vietnam
LC216904	CPV/dog/HCM/2/2013	CPV-2c	1755	Cane	ND	2013	Indonesia
M23255	CPV-d	CPV-2	2605	Cane	ND	1988	USA
MF177227	202-09	CPV-2c	4269	Cane	ND	2009	Francia
MF177232	201-98	CPV-2b	4269	Cane	ND	1998	Italia
MF177270	E23	CPV-2c	4269	Cane	ND	2011	Ecuador
MF416372	NYC/Bronx/poolP16-17	CPV-2c	4809	Topo	Feci	2015	USA
MF423123	CPV/Coyote/C16/NL	CPV-2b	4468	Coyote	ND	2014	Canada
MF423125	CPV/Coyote/C67/NL	CPV-2a	4468	Coyote	ND	2014	Canada
MF510157	CPV/IZSSI/2743/17	CPV-2c	4450	Cane	Intestino	2017	Italia
MG434741	CPV/IZSSI/PA5610/2017	CPV-2a	4381	Cane	Tampone rettale	2017	Italia
MH491866	16450	CPV-2b	1752	Cane	ND	2011	Italia
MH491882	27507	CPV-2a	1752	Cane	ND	2014	Italia
MH491898	31179	CPV-2b	1752	Cane	ND	2015	Italia
MH491910	4495	CPV-2a	1752	Cane	ND	2008	Italia
MH491914	15263	CPV-2c	1752	Cane	ND	2011	Italia
MH491940	26156	CPV-2b	1737	Cane	ND	2014	Italia
MH614271	Majella/pack7/07	CPV-2b	1752	Lupo	Feci	2017	Italia
MK295775	JL-3	FPV	1755	Gatto	ND	2017	Cina
MK348090	392/2013	CPV-2b	1755	Cane	Feci	2013	Italia
MK348102	1418/2016	CPV-2b	1755	Cane	Feci	2016	Italia
MK348104	850/2017	CPV-2b	1755	Cane	Feci	2017	Italia
MK413726	149/15	FPV	4269	Gatto	Intestino	2015	Italia
MK413742	PA13600/17	CPV-2b	4269	Cane	Milza	2017	Italia
MK413743	PA15423/16	CPV-2c	4269	Gatto	Milza	2016	Italia
MK806285	IZSSI/PA5632/19	CPV-2c	4269	Cane	Milza	2019	Italia
MK895486	IZSSI/PA1464/19/rdYV2	CPV-2c	4269	Cane	Tampone rettale	2018	Nigeria
MN119597	CH-HN-D22	CPV-2c	1755	Cane	ND	2019	Cina
MN451663	39	CPV-2b	4269	Cane	Feci	1984	USA
MN451682	609	CPV-2c	4269	Cane	Feci	2018	Nigeria
MN603976	Tasman island/Tasmania/Felis catus/2010	FPV	1744	Gatto	ND	2010	Australia
MN832850	Taiwan/2018	CPV-2c	4960	Pangolino	ND	2018	Taiwan
MT106236	DN02	CPV-2c	4269	Cane	ND	2017	Vietnam
MT274377	51	FPV	1755	Volpe rossa	ND	2017	Italia
MT274378	245/19-1478	FPV	1755	Tasso	Intestino	2019	Italia
MT353760	289/19-5518	CPV-2c	1755	Tasso	Intestino	2019	Italia
MT353761	415/19-3530	CPV-2b	1755	Lupo	Intestino	2019	Italia

GenBank ID	Ceppo	Patogeno	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica
MT353762	289/19-5860	CPV-2b	1755	Tasso	Intestino	2019	Italia
MT353763	289/19-5771	CPV-2b	1755	Faina	Intestino	2019	Italia
MT353764	289/19-5624	CPV-2b	1755	Tasso	Intestino	2019	Italia
MT454908	67/20-1302	CPV-2c	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454909	67/20-1106	CPV-2c	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454910	663/19-6976	CPV-2c	736	Lupo	ND	2020	Italia
MT454911	67/20-276	CPV-2b	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454913	145/20-1863	CPV-2b	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454914	145/20-1788	CPV-2a	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454915	145/20-1274	CPV-2b	736	Lupo	Intestino	2020	Italia
MT454916	51/20-178	FPV	736	Volpe rossa	Milza	2014	Italia
MT454917	51/20-114	FPV	736	Volpe rossa	ND	2014	Italia
MW182703	2018/20	CPV-2c	1755	Cane	ND	2018	Cina
<b>MW829208</b>	<b>451</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Lingua</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829209</b>	<b>453</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Lingua</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829210</b>	<b>454</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829211</b>	<b>456</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829212</b>	<b>457</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829213</b>	<b>458</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829214</b>	<b>188</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Lingua</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829215</b>	<b>189</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Lingua</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829216</b>	<b>190</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829217</b>	<b>193</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829218</b>	<b>195</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829219</b>	<b>197</b>	<b>CPV-2b</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>
<b>MW829220</b>	<b>198</b>	<b>FPV</b>	<b>532</b>	<b>Lupo</b>	<b>Lingua</b>	<b>2019</b>	<b>Italia</b>

CPV-2: parvovirus canino di tipo 2, CPV-2a: parvovirus canino variante 2a, CPV-2b: parvovirus canino variante 2b, CPV-2c: parvovirus canino variante 2c, FPV: virus della panleucopenia felina, ND: dato non disponibile, nt: nucleotidi. In grassetto: sequenze nucleotidiche di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute nello **Studio 1**.

**Allegato 1.2.** Sequenze nucleotidiche di CAdV-1 ottenute nello **Studio 1** e sequenze di riferimento reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Patogeno	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica
JN252129	PPV1	BtAdV	31616	Pipistrello	Fegato/Rene	2011	Germania
KP840545 + KP840544	113-5L	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe rossa	Fegato	2011	Italia
KP840547 + KP840546	417-L	CAdV-1	2718 + 1632	Cane	Fegato	2013	Italia
KP840549 + KP840548	574-RS	CAdV-1	2718 + 1632	Cane	Tampone rettale	2013	Italia
KX545420	ITL2015	CAdV-1	30531	Lupo	Fegato	2015	Italia
MF344666 + MF344672	602-07	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia
MF344667 + MF344673	603-06	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe artica	Fegato	1997-98	Norvegia
MF344668 + MF344674	603-07	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe artica	Rene	1997-98	Norvegia
MF344669 + MF344675	603-10	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe artica	Milza	1999-00	Norvegia
MF344670 + MF344676	603-12	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe artica	Milza	2001-02	Norvegia
MF344671 + MF344677	603-13	CAdV-1	2718 + 1632	Volpe artica	Linfonodo	1999-00	Norvegia
MH048659	835	CAdV-1	30534	Lupo	Fegato	2015	Francia
MH105809 + MH105810	874	CAdV-1	2718 + 1632	Lupo	Lingua	2014	Italia
<b>MW829200 + MW829199</b>	<b>452</b>	<b>CAdV-1</b>	<b>2718 + 1632</b>	<b>Lupo</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>
NC_001734	RI261	CAdV-1	30536	Cane	ND	1996	Gran Bretagna
U55001	CLL	CAdV-1	30288	Cane/vaccino	Rene	1996	ND
U77082	TorontoA26/61	CAdV-2	31323	Cane/vaccino	ND	1961	Canada

BtAdV: adenovirus del pipistrello, CAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, ND: dato non disponibile, nt: nucleotidi. In grassetto: sequenze nucleotidiche di CAdV-1 ottenute nello **Studio 1**.

**Allegato 1.3.** Sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello **Studio 1** e sequenze di referenza reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
JQ821392	214	2063	Cane	Siero	2011	USA		
KC241982 (NC020904)	UCD1-1698	2063	Cane	Fegato	2011	USA		
KC241983	UCD3-478	2063	Cane	Sangue	2011	USA		
KC241984	UCD2-32162	2063	Cane	Feci	2011	USA		
KF887949	Ha13	2063	Cane	Sangue	2013	Germania		
KJ530972	Bari/411-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KP260925	VS7100001	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KP260926	VS7100003	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KP260927	VS7100005	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KP941114	55590	2055	Volpe rossa	Feci	2014	Croazia		
KT283604	FUBerlin-JRS	2063	Cane	Milza	2014	Germania		
KT734812	CB6293/1-14	2063	Lupo	Linfonodo mesenterico	2014	Italia		
KT734813	AZ2972-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734814	TE4016-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734815	AZ4133/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734816	AZ4438-13	2063	Tasso	Intestino	2013	Italia		
KT734817	AZ5212/1-14	2063	Cane	Polmone	2014	Italia		
KT734818	AZ5212/2-14	2063	Cane	Polmone	2014	Italia		
KT734819	AZ5586-13	2063	Lupo	Polmone	2013	Italia		
KT734820	AZ663/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734821	TE6685/1-13	2063	Cane	Cervello	2013	Italia		
KT734822	TE7482-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734823	PE8575/1-13	2063	Cane	Linfonodo mesenterico	2013	Italia		
KT734824	AZ663/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734825	TE6685/2-13	2063	Cane	Polmone	2013	Italia		
KT734826	PE8575/2-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734827	AZ4133/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734828	CB6293/2-14	2063	Lupo	Intestino	2014	Italia		
KT946839	JZ98/2014	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388480	GL33	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388481	JZ50	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388482	GL51	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388483	WM60	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388484	WM48	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388485	WM46	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388486	LA280	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388487	LA237	2064	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388488	LA128	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388489	JZ85	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388490	JZ82	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388491	WM63	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388492	WM66	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388493	WM62	2064	Cane	Siero	2015	Cina		

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
KY388494	YL11	2063	Cane	Siero	2016	Cina		
KY388495	XXT243	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388496	XXT242	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388497	WM84	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388498	WM83	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388499	WM79	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388500	WM77	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388501	WM76	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388502	WM74	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388503	WM72	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
MF457592	OH19098-1	2063	Cane	Milza	2015	USA		
MF797786	XF16	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MG266899	CD17/2016	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MG279118	102	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279119	199	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279120	198	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279121	186	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279122	176	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279123	185	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279124	183	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279125	182	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279126	181	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279127	180	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279128	179	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279129	178	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279130	177	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279131	202	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279132	398	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279133	395	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279134	394	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279135	201	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279136	391	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279137	390	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279138	388	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279139	384	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279140	205	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279141	204	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG737378	14P105D/TH2016	2039	Cane	Polmone	2014	Thailandia		
MG737379	15P061D/TH2016	1911	Cane	Polmone	2015	Thailandia		
MG737380	CP28/TH2016	1907	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737381	CP134/TH2016	1902	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737382	CP144/TH2016	1905	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737383	CP181/TH2016	1907	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737384	CP188/TH2016	1903	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
MG737385	CP191/TH2016	1954	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737386	14P112N/TH2016	1989	Cane	Polmone	2016	Thailandia		
MH454599	09-10F/2011	2001	Volpe rossa	Feci	2011	Italia		
MK033608	UBA-Baires	2063	Cane	Limfonodo	2016	Argentina		
MK731981	C24	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK731982	K1	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944079	C79	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944080	C85	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MN128702	NC21	2063	Cane	ND	2018	Cina		
MT180077	gen-15	2063	Volpe rossa	Milza	2015	Norvegia		
MT180078	19/2014	2063	Volpe rossa	Milza	2014	Norvegia		
MT180079	27/2014	2063	Volpe rossa	Milza	2014	Norvegia		
MT180080	64/2017	2063	Volpe rossa	Fegato	2017	Norvegia		
MT180081	73/2017	2063	Volpe rossa	Milza	2017	Norvegia		
MT180082	77/2017	2063	Volpe rossa	Milza	2017	Norvegia		
MT180083	feb-96	2063	Volpe artica	Fegato	1996	Norvegia		
MT180084	47/1997	2063	Volpe artica	Milza	1997	Norvegia		
MT180085	52/1999	2063	Volpe artica	Milza	1999	Norvegia		
MT180086	55/1998	2063	Volpe artica	Milza	1998	Norvegia		
MT180087	57/1997	2063	Volpe artica	Milza	1997	Norvegia		
MT180088	65/1999	2063	Volpe artica	Fegato	1999	Norvegia		
MT180089	70/1997	2063	Volpe artica	Fegato	1997	Norvegia		
MT180090	79/1997	2063	Volpe artica	Fegato	1997	Norvegia		
MT293519	MED-1	2063	Cane	Feci	2018	Colombia		
MT293520	MED-2	2063	Cane	Feci	2018	Colombia		
MT293521	MED-3	2063	Cane	Feci	2018	Colombia		
<b>MW829201</b>	<b>447</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829202</b>	<b>448</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829203</b>	<b>449</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829204</b>	<b>450</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2017</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829205</b>	<b>454</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829206</b>	<b>457</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>		
<b>MW829207</b>	<b>458</b>	<b>2063</b>	<b>Lupo</b>	<b>Intestino</b>	<b>2018</b>	<b>Italia</b>		

I: sequenze utilizzate per il calcolo dell'identità nucleotidica, ND: dato non disponibile, nt: nucleotidi, P: sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica. In grassetto: sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello Studio 1.

**Allegato 2.1.** Sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello **Studio 2** e sequenze di referenza reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	I	P
MG279118	102	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279122	176	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279130	177	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279129	178	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279128	179	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279127	180	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279126	181	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279125	182	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279124	183	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279123	185	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279121	186	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279120	198	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279119	199	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279135	201	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279131	202	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279141	204	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279140	205	2063	ND	ND	2017	Cina		
JQ821392	214	2063	ND	Siero	2011	USA		
MG279139	384	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279138	388	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279137	390	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279136	391	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279134	394	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279133	395	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279132	398	2064	ND	ND	2017	Cina		
MT180077	01/2015	2063	Volpe rossa	Milza	2015	Norvegia		
MT180078	19/2014	2063	Volpe rossa	Milza	2014	Norvegia		
MT180079	27/2014	2063	Volpe rossa	Milza	2014	Norvegia		
MT180080	64/2017	2063	Volpe rossa	Fegato	2017	Norvegia		
MT180081	73/2017	2063	Volpe rossa	Milza	2017	Norvegia		
MT180082	77/2017	2063	Volpe rossa	Milza	2017	Norvegia		
MT180083	02/1996	2063	Volpe artica	Fegato	1996	Norvegia		
MT180084	47/1997	2063	Volpe artica	Milza	1997	Norvegia		
MT180085	52/1999	2063	Volpe artica	Milza	1999	Norvegia		
MT180086	55/1998	2063	Volpe artica	Milza	1998	Norvegia		
MT180087	57/1997	2063	Volpe artica	Milza	1997	Norvegia		
MT180088	65/1999	2063	Volpe artica	Fegato	1999	Norvegia		
MT180089	70/1997	2063	Volpe artica	Fegato	1997	Norvegia		
MT180090	79/1997	2063	Volpe artica	Fegato	1997	Norvegia		
KP941114	55590	2055 (parziale)	Volpe rossa	Feci	2014	Croazia		
MH454599	09-10F/2011	2001 (parziale)	Volpe rossa	Feci	2011	Italia		
MG737378	14P105D/TH2016	2039 (parziale)	Cane	Polmone	2014	Thailandia		
MG737386	14P112N/TH2016	1989 (parziale)	Cane	Polmone	2016	Thailandia		



GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	I	P
MG737379	15P061D/TH2016	1911 (parziale)	Cane	Polmone	2015	Thailandia		
KT734813	AZ2972-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734815	AZ4133/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734827	AZ4133/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734816	AZ4438-13	2063	Tasso	Intestino	2013	Italia		
KT734817	AZ5212/1-14	2063	Cane	Fegato	2014	Italia		
KT734818	AZ5212/2-14	2063	Cane	Polmone	2014	Italia		
KT734819	AZ5586-13	2063	Lupo	Polmone	2013	Italia		
KT734820	AZ663/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734824	AZ663/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KJ530972	Bari/411-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
MK731981	C24	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944079	C79	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944080	C85	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
KT734812	CB6293/1-14	2063	Lupo	Linfonodo mesenterico	2014	Italia		
KT734828	CB6293/2-14	2063	Lupo	Intestino	2014	Italia		
MG266899	CD17/2016	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MG737381	CP134/TH2016	1902 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737382	CP144/TH2016	1905 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737383	CP181/TH2016	1907 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737384	CP188/TH2016	1903 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737385	CP191/TH2016	1954 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
MG737380	CP28/TH2016	1907 (parziale)	Cane	Tampone nasale	2016	Thailandia		
KT283604	FUBerlin-JRS	2063	Cane	Milza	2014	Germania		
KY388480	GL33	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388482	GL51	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KF887949	Ha13	2063	Cane	Sangue	2013	Germania		
KY388481	JZ50	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388490	JZ82	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388489	JZ85	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KT946839	JZ98/2014	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
MK731982	K1	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
KY388488	LA128	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388487	LA237	2064	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388486	LA280	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
MN128702	NC21	2063	Cane	ND	2018	Cina		
MF457592	OHI9098-1	2063	Cane	Milza	2015	USA		
KT734823	PE8575/1-13	2063	Cane	Linfonodo mesenterico	2013	Italia		
KT734826	PE8575/2-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734814	TE4016-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734821	TE6685/1-13	2063	Cane	Cervello	2013	Italia		
KT734825	TE6685/2-13	2063	Cane	Polmone	2013	Italia		
KT734822	TE7482-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
MK033608	UBA-Baires	2063	Cane	Linfonodo	2016	Argentina		

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	I	P
KC241982 (NC020904)	UCD1-1698	2063	Cane	Fegato	2011	USA		
KC241984	UCD2-32162	2063	Cane	Feci	2011	USA		
KC241983	UCD3-478	2063	Cane	Sangue	2011	USA		
KP260925	VS7100001	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KP260926	VS7100003	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KP260927	VS7100005	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Gran Bretagna		
KY388485	WM46	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388484	WM48	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388483	WM60	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388493	WM62	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388491	WM63	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388492	WM66	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388503	WM72	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388502	WM74	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388501	WM76	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388500	WM77	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388499	WM79	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388498	WM83	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388497	WM84	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
MF797786	XF16	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
KY388496	XXT242	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388495	XXT243	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388494	YL11	2063	Cane	Siero	2016	Cina		
<b>MT193159</b>	<b>800/2009</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2009</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193160</b>	<b>115/2010</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2010</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193161</b>	<b>121/2010</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2010</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193162</b>	<b>540/2010</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2010</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193163</b>	<b>570/2013</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2013</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193164</b>	<b>608/2014</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2014</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193165</b>	<b>1203/2016</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2016</b>	<b>Italia</b>		
<b>MT193166</b>	<b>1367/2016</b>	<b>2063</b>	<b>Cane</b>	<b>Feci</b>	<b>2016</b>	<b>Italia</b>		

<sup>a</sup> Anno relativo all'identificazione del virus oppure anno in cui la sequenza è stata depositata nel database di GenBank.

I: sequenze utilizzate per il calcolo dell'identità nucleotidica, ND: dato non disponibile, nt: nucleotidi, P: sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica. In grassetto: sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello **Studio 2**.

**Allegato 2.2.** Sequenze nucleotidiche di CAdV-1 e CAdV-2 ottenute nello **Studio 2** e sequenze di referenza reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Specie ospiti	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	E	H	F	D	P
GQ340423	CAdV-1 field strain B579	Cane	Fegato	2009	India					
EF057101	CAdV-1 field strain	Cane	Fluido di coltura cellulare infetta	2006 <sup>b</sup>	India					
S38238	CAdV-1 field strain Utrecht	Cane	ND	1992 <sup>b</sup>	Olanda					
KP670422	CAdV-1 field strain 384-FFPEL	Cane	Fegato fflp	1966	Italia					
KF676980	CAdV-1 field strain 300-RS	Cane	Tampone rettale	2012	Italia					
KF676977	CAdV-1 field strain 313-Lparaf.	Cane	Fegato fflp	2010	Italia					
JX416838	CAdV-1 field strain 09-13F	Volpe rossa	Feci	2011	Italia					
KU755710	CAdV-1 field strain 300115/3	Volpe rossa	Rene	2015	Regno Unito					
KU755711	CAdV-1 field strain 300115/2	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755712	CAdV-1 field strain 220515/1	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755713	CAdV-1 field strain 201114/2	Volpe rossa	Fegato	2014	Regno Unito					
KU755714	CAdV-1 field strain 201114/1	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755715	CAdV-1 field strain 111114/1	Volpe rossa	Fegato	2014	Regno Unito					
KU755716	CAdV-1 field strain 090315/2	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755717	CAdV-1 field strain 090315/1	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755718	CAdV-1 field strain 061014/2	Volpe rossa	Fegato	2014	Regno Unito					
KU755719	CAdV-1 field strain 030415/1	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755720	CAdV-1 field strain 010515/5	Volpe rossa	Rene	2015	Regno Unito					
KU755721	CAdV-1 field strain 17157	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755722	CAdV-1 field strain 17154	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755723	CAdV-1 field strain 15195	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755724	CAdV-1 field strain 17066	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755725	CAdV-1 field strain 15620	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755726	CAdV-1 field strain 16036	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KU755727	CAdV-1 field strain 15346	Volpe rossa	Rene	2015	Regno Unito					
KU755728	CAdV-1 field strain 15622	Volpe rossa	Rene	2015	Regno Unito					
KU755729	CAdV-1 field strain 16606	Volpe rossa	Fegato	2015	Regno Unito					
KT853096	CAdV-1 field strain 13-0086	Cane	Fegato	2013	Australia					
KT853097	CAdV-1 field strain 13-0067	Cane	Fegato	2013	Australia					
KJ451612	CAdV-1 field strain SD-1	Cane	ND	2011	Cina					
KX181846	CAdV-1 field strain CADRAD	Cane	Feci	2015	India					
KC577558	CAdV-1 field strain PT/12	Cane	Fegato	2012	Polonia					
KX545420	CAdV-1 field strain ITL2015	Lupo	Fegato	2015	Italia					
U55001	CAdV-1 vaccine strain GLL	ND	ND	1996 <sup>b</sup>	ND					
Y07760 (NC_001734; AC_000003)	CAdV-1 field strain RI261	Cane	Polmone	1996 <sup>b</sup>	Regno Unito					
M60937	CAdV-1 vaccine strain GLAXO	ND	ND	1991 <sup>b</sup>	ND					
JX416839	CAdV-1 field strain 113-5L	Volpe rossa	Fegato	2011	Italia					
KP840544										
KP840545										
KP670423	CAdV-1 field strain 417-L	Cane	Fegato	2013	Italia					
KP840546										
KP840547										
KP670424	CAdV-1 field strain 574-RS	Cane	Tampone rettale	2013	Italia					

GenBank ID	Ceppo	Specie ospite	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	E	H	F	D	P
KP840548										
KP840549										
MF344652	CAdV-1 field strain 602-01-spleen	Volpe rossa	Milza	2007	Norvegia					
MF344653	CAdV-1 field strain 602-02-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344654	CAdV-1 field strain 602-03-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344655	CAdV-1 field strain 602-04-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344656	CAdV-1 field strain 602-05-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344657	CAdV-1 field strain 602-06-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344658	CAdV-1 field strain 602-07-spleen	Volpe rossa	Milza	2008	Norvegia					
MF344666										
MF344672										
MF344659	CAdV-1 field strain 603-05-lymphnode	Volpe artica	Linfonodo	2001/02	Norvegia					
MF344660	CAdV-1 field strain 603-06-liver	Volpe artica	Fegato	1997/98	Norvegia					
MF344667										
MF344673										
MF344661	CAdV-1 field strain 603-07-kidney	Volpe artica	Rene	1997/98	Norvegia					
MF344668										
MF344674										
MF344662	CAdV-1 field strain 603-10-spleen	Volpe artica	Milza	1999/00	Norvegia					
MF344669										
MF344675										
MF344663	CAdV-1 field strain 603-11-kidney	Volpe artica	Rene	2001/02	Norvegia					
MF344664	CAdV-1 field strain 603-12-spleen	Volpe artica	Milza	2001/02	Norvegia					
MF344670										
MF344676	CAdV-1 field strain 603-13-lymphnode	Volpe artica	Linfonodo	1999/00	Norvegia					
MF344665										
MF344671										
MF344677										
MH105809										
MH105810	CAdV-1 field strain 874-2014-Tongue	Lupo	Lingua	2014	Italia					
S38212										
KF676978	CAdV-2 strain Manhattan	Cane	ND	1992	USA					
JX416841	CAdV-2 field strain 60-OFS	Cane	Tampone oro-faringeo	2011	Italia					
JX416842	CAdV-2 field strain 113-3F-c01	Volpe rossa	Feci	2011	Italia					
JX416843	CAdV-2 field strain 113-3F-c04	Volpe rossa	Feci	2011	Italia					
KF676981	CAdV-2 field strain 249-RS	Cane	Tampone rettale	2012	Italia					
KF676982	CAdV-2 field strain 272-RS	Cane	Tampone rettale	2012	Italia					
KF676979	CAdV-2 field strain S1-OFS	Cane	Tampone oro-faringeo	2011	Italia					
KU725671	CAdV-2 field strain SV431/15	Cane	ND	2015	Brasile					
KU725672	CAdV-2 field strain SV435/15	Cane	ND	2015	Brasile					
KU725673	CAdV-2 field strain SV521/13	Cane	ND	2013	Brasile					
KU725674	CAdV-2 field strain SV675/13	Cane	ND	2013	Brasile					
GQ915311	CAdV-2 field strain HB1	Cane	Tampone rettale	2009	Cina					
KU315333	CAdV-2 field strain 1.6	Cane	Tampone nasale	2014	Brasile					
KU315334	CAdV-2 field strain 1.11	Cane	Tampone nasale	2014	Brasile					

GenBank ID	Ceppo	Specie ospite	Matrice biologica	Anno <sup>a</sup>	Origine geografica	E	H	F	D	P
KU315335	CAdV-2 field strain 1.18	Cane	Tampone nasale	2014	Brasile					
KU315336	CAdV-2 field strain 3.55	Cane	Tampone nasale	2014	Brasile					
KU315337	CAdV-2 field strain 3.70	Cane	Tampone nasale	2014	Brasile					
CAU77082 (BK000403, AC_000020)	CAdV-2 strain Toronto A26/61	Cane	ND	1961	Canada					
EU794687	CAdV-2 field strain cc0710QZ	Cane	ND	2007	Cina					
EU717145	CAdV-2 field strain CC0710QB	Cane	ND	2007	Cina					
DQ839392	CAdV-2 field strain	Cane	ND	2006	India					
EF508034	CAdV-2 field strain YCA-18	Cane	ND	2007	Cina					
GQ241864	CAdV-2 field strain CC0710	Cane	Utero	2009	Cina					
KF727562	CAdV-2 field strain SH01	Cane	ND	2011	Cina					
JN252129	BtAdV-2 field strain PPV1	Pipistrello	Fegato/Rene	2007	Germania					
MT193158	CAdV-1 field strain 334/2012	Cane	Feci	2012	Italia					
MT193150	CAdV-2 field strain 53/2011	Cane	Intestino	2011	Italia					
MT193142										
MT193135										
MT193151	CAdV-2 field strain 55/2011	Cane	Feci	2011	Italia					
MT193143										
MT193152	CAdV-2 field strain 88/2011	Cane	Feci	2011	Italia					
MT193144										
MT193136										
MT193153	CAdV-2 field strain 258/2006	Cane	Feci	2006	Italia					
MT193145										
MT193137										
MT193154	CAdV-2 field strain 618/1995	Cane	Feci	1995	Italia					
MT193146										
MT193138										
MT193155	CAdV-2 field strain 687/1999	Cane	Feci	1999	Italia					
MT193147										
MT193139										
MT193156	CAdV-2 field strain 800/2009	Cane	Feci	2009	Italia					
MT193148										
MT193140										
MT193157	CAdV-2 field strain 1149/2015	Cane	Intestino	2015	Italia					
MT193149										
MT193141										

<sup>a</sup> Anno relativo all'identificazione del virus oppure anno in cui la sequenza è stata depositata nel database di GenBank.

<sup>b</sup> Anno in cui la sequenza è stata depositata nel database di GenBank.

BtAdV: adenovirus del pipistrello, CAdV-1: adenovirus canino di tipo 1, CAdV-2: adenovirus canino di tipo 2, D: sequenze usate per le analisi entropy (H(x)) plot e DnaSP, E: sequenze usate per l'allineamento e l'analisi filogenetica del gene parziale E3 e regioni limitrofe, F: sequenze usate per l'allineamento del gene Fiber, ffp: organo fissato in formalina e incluso in paraffina, H: sequenze usate per l'allineamento del gene Hexon, ND: dato non disponibile, P: sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica dei geni Hexon e Fiber concatenati. In grassetto: sequenze nucleotidiche di CAdV-1 e CAdV-2 ottenute nello **Studio 2**.

**Allegato 3.1.** Sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello **Studio 3** e sequenze di referenza reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza.

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
KT734812	CB6293/1-14	2063	Lupo	Linfonodo mesenterico	2014	Italia		
KT734813	AZ2972-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734814	TE4016-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734815	AZ4133/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734816	AZ4438-13	2063	Tasso	Intestino	2013	Italia		
KT734817	AZ5212/1-14	2063	Cane	Fegato	2014	Italia		
KT734818	AZ5212/2-14	2063	Cane	Polmone	2014	Italia		
KT734819	AZ5586-13	2063	Lupo	Polmone	2013	Italia		
KT734820	AZ663/1-13	2063	Lupo	Milza	2013	Italia		
KT734821	TE6685/1-13	2063	Cane	Cervello	2013	Italia		
KT734822	TE7482-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734823	PE8575/1-13	2063	Cane	Linfonodo mesenterico	2013	Italia		
KT734824	AZ663/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734825	TE6685/2-13	2063	Cane	Polmone	2013	Italia		
KT734826	PE8575/2-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
KT734827	AZ4133/2-13	2063	Lupo	Intestino	2013	Italia		
KT734828	CB6293/2-14	2063	Lupo	Intestino	2014	Italia		
MH454599	09-10F/2011	2001	Volpe rossa	Feci	2011	Italia		
KY388480	GL33	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388481	JZ50	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388482	GL51	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388483	WM60	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388484	WM48	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388485	WM46	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388486	LA280	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388487	LA237	2064	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388488	LA128	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388489	JZ85	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388490	JZ82	2063	Cane	Siero	2014	Cina		
KY388491	WM63	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388492	WM66	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388493	WM62	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388494	YL11	2063	Cane	Siero	2016	Cina		
KY388495	XXT243	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388496	XXT242	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388497	WM84	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388498	WM83	2063	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388499	WM79	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388500	WM77	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388501	WM76	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388502	WM74	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KY388503	WM72	2064	Cane	Siero	2015	Cina		
KT946839	JZ98/2014	2063	Cane	Siero	2014	Cina		

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
MK033608	UBA-Baires	2063	Cane	Linfonodo	2016	Argentina		
MG737378	14P105D/TH2016	2039	Cane	Polmone	2014	Thailandia		
MG737379	15P061D/TH2016	1911	Cane	Polmone	2015	Thailandia		
MG737380	CP28/TH2016	1907	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737381	CP134/TH2016	1902	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737382	CP144/TH2016	1905	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737383	CP181/TH2016	1907	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737384	CP188/TH2016	1903	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737385	CP191/TH2016	1954	Cane	Tamponne nasale	2016	Thailandia		
MG737386	14P112N/TH2016	1989	Cane	Polmone	2016	Thailandia		
KC241982 (NC020904)	UCD1-1698	2063	Cane	Fegato	2011	USA		
KC241983	UCD3-478	2063	Cane	Sangue	2011	USA		
KC241984	UCD2-32162	2063	Cane	Feci	2011	USA		
JQ821392	214	2063	Cane	Cane	2011	USA		
KP941114	55590	2055	Volpe rossa	Feci	2014	Croazia		
KP260925	VS7100001	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Regno Unito		
KP260926	VS7100003	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Regno Unito		
KP260927	VS7100005	2063	Volpe rossa	Siero	2013	Regno Unito		
KJ530972	Bari/411-13	2063	Cane	Intestino	2013	Italia		
MK731982	K1	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MF797786	XF16	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK731981	C24	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944079	C79	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MK944080	C85	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MF457592	OH19098-1	2063	Cane	Milza	2015	USA		
KF887949	Hal3	2063	Cane	Sangue	2013	Germania		
KT283604	FUBerlin-JRS	2063	Cane	Milza	2014	Germania		
MG266899	CDI7/2016	2063	Cane	Feci	2016	Cina		
MG279118	102	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279119	199	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279120	198	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279121	186	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279122	176	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279123	185	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279124	183	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279125	182	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279126	181	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279127	180	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279128	179	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279129	178	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279130	177	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279131	202	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279132	398	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279133	395	2064	ND	ND	2017	Cina		

GenBank ID	Ceppo	Dimensione (nt)	Specie ospite	Matrice biologica	Anno	Origine geografica	I	P
MG279134	394	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279135	201	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279136	391	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279137	390	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279138	388	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279139	384	2064	ND	ND	2017	Cina		
MG279140	205	2063	ND	ND	2017	Cina		
MG279141	204	2063	ND	ND	2017	Cina		
MIN128702	NC21	2063	Cane	ND	2018	Cina		
<b>MT180077</b>	<b>01/2015</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Milza</b>	<b>2015</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180078</b>	<b>19/2014</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Milza</b>	<b>2014</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180079</b>	<b>27/2014</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Milza</b>	<b>2014</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180080</b>	<b>64/2017</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Fegato</b>	<b>2017</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180081</b>	<b>73/2017</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180082</b>	<b>77/2017</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe rossa</b>	<b>Milza</b>	<b>2017</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180083</b>	<b>02/1996</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Fegato</b>	<b>1996</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180084</b>	<b>47/1997</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Milza</b>	<b>1997</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180085</b>	<b>52/1999</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Milza</b>	<b>1999</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180086</b>	<b>55/1998</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Milza</b>	<b>1998</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180087</b>	<b>57/1997</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Milza</b>	<b>1997</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180088</b>	<b>65/1999</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Fegato</b>	<b>1999</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180089</b>	<b>70/1997</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Fegato</b>	<b>1997</b>	<b>Norvegia</b>		
<b>MT180090</b>	<b>79/1997</b>	<b>2063</b>	<b>Volpe artica</b>	<b>Fegato</b>	<b>1997</b>	<b>Norvegia</b>		

I: sequenze utilizzate per il calcolo dell'identità nucleotidica, ND: dato non disponibile, nt: nucleotidi, P: sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica. In grassetto: sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute nello **Studio**

3.



**Allegato 4.1.** Sequenze nucleotidiche di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute nello **Studio 4** e sequenze di referenza ottenute da GenBank ed utilizzate per l'analisi di sequenza.

<b>GenBank ID</b>	<b>Variante</b>	<b>Anno</b>	<b>Origine geografica</b>	<b>Note</b>
AY742932	CPV-2b	1991	USA	
AY742933	CPV-2a	1993	Nuova Zelanda	
AY742934	CPV-2b	1995	Germania	
AY742935	CPV-2a	1995	Germania	
D26079	CPV-2a	1993	Giappone	
EF011664	CPV-2a	2004	Cina	
EU659116	CPV-2	1979	USA	
EU659119	CPV-2b	2000	USA	
EU659121	CPV-2b	1998	USA	
JN867615	CPV-2a	2009	USA	
JQ268284	CPV-2b	2011	Cina	
JQ686671	CPV-2a	2011	Cina	
JX660690	CPV-2a	2011	Cina	
KF366250	CPV-2a	2013	India	
KF638400	CPV-2a	2010	Cina	
KM457102	CPV-2a	2010	Uruguay	
KM457104	CPV-2c	2006	Uruguay	
KM457120	CPV-2c	2010	Uruguay	
KM457121	CPV-2c	2010	Uruguay	
KM457122	CPV-2c	2010	Uruguay	
KR002792	CPV-2a	2013	Cina	
KR002793	CPV-2b	2013	Cina	
KR002794	CPV-2a	2013	Cina	
KR002800	CPV-2a	2014	Cina	
KR002802	CPV-2a	2014	Cina	
KR611522	CPV-2c	2014	Cina	
KT162014	CPV-2c	2014	Cina	
KT382542	CPV-2a	2014	Cina	
KU508691	CPV-2c	2015	Australia	
KX434454	CPV-2a	2009	Italia	
KX434458	CPV-2c	2011	Italia	
KX434459	CPV-2c	2011	Italia	
KX774250	CPV-2b	2016	Brasile	
KX774252	CPV-2b	2015	Brasile	
KY073269	CPV-2c	2015	Brasile	
KY083093	CPV-2c	2014	Singapore	
LC214970	CPV-2a	2013	Vietnam	
LC216904	CPV-2c	2013	Indonesia	
LC270891	CPV-2b	2017	Giappone	
MF069443	CPV-2a	2016	Canada	
MF177225	CPV-2b	1998	Italia	
MF177227	CPV-2c	2009	Francia	
MF177228	CPV-2c	2009	Italia	
MF177229	CPV-2c	2012	Albania	
MF177230	CPV-2c	2010	Italia	
MF177231	CPV-2a	2000	Italia	
MF177232	CPV-2b	1998	Italia	
MF177234	CPV-2c	2003	Italia	
MF177235	CPV-2c	2006	Italia	
MF177242	CPV-2c	2008	Argentina	
MF177243	CPV-2c	2008	Argentina	
MF177256	CPV-2b	2013	Brasile	
MF177258	CPV-2b	2013	Brasile	
MF177265	CPV-2a	2011	Ecuador	
MF177266	CPV-2c	2011	Ecuador	
MF177270	CPV-2c	2011	Ecuador	
MF177281	CPV-2a	2006	Uruguay	
MF177283	CPV-2c	2009	Uruguay	
MF416372	CPV-2c	2015	USA	
MF423123	CPV-2b	2014	Canada	
MF423125	CPV-2a	2014	Canada	
MF510157	CPV-2c	2017	Italia	
MG434741	CPV-2a	2017	Italia	
MH476581	CPV-2c	2017	Cina	

<b>GenBank ID</b>	<b>Variante</b>	<b>Anno</b>	<b>Origine geografica</b>	<b>Note</b>
MH476585	CPV-2c	2017	Cina	
MH476587	CPV-2c	2017	Cina	
MH711902	CPV-2c	2016	Thailandia	
MK144544	CPV-2c	2017	Corea del Sud	
MK806280	CPV-2c	2018	Italia	
MK806285	CPV-2c	2019	Italia	
MK895486	CPV-2c	2018	Nigeria	
MK895487	CPV-2c	2018	Nigeria	
MN832850	CPV-2c	2018	Taiwan	Ospite: pangolino
MT106228	CPV-2c	2017	Vietnam	
MT106236	CPV-2c	2017	Vietnam	
MW182694	CPV-2c	2018	Cina	
MW182700	CPV-2c	2018	Cina	
MW182703	CPV-2c	2018	Cina	
<b>MW659469</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>157/2019</b>
<b>MW659470</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>158/2019</b>
<b>MW659471</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>159/2019</b>
<b>MW659472</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>160/2019</b>
<b>MW659473</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>161/2019</b>
<b>MW659474</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>162/2019</b>
<b>MW659475</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>163/2019</b>
<b>MW659476</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>164/2019</b>
<b>MW659477</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>165/2019</b>
<b>MW659478</b>	<b>CPV-2c</b>	<b>2019</b>	<b>Romania</b>	<b>166/2019</b>

CPV-2: parvovirus canino di tipo 2, CPV-2a: parvovirus canino variante 2a, CPV-2b: parvovirus canino variante 2b, CPV-2c: parvovirus canino variante 2c. In grassetto: sequenze nucleotidiche di *Carnivore protoparvovirus 1* ottenute nello **Studio 4**.

**Allegato 5.1.** Sequenze nucleotidiche di referenza di canine distemper virus reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza nello **Studio 5**.

<b>CDV lineages genetici</b>	<b>Sequenze nucleotidiche</b>
America 1 (NA1)	Convac_Z35493 Lederle_EF418782 Onderstepoort_AF305419 SnyderHill_AF259552
America 2 (NA2)	US_raccoon_1998_AY548109 US_dog_1995_Z47762 US_bleopard_1992_Z47763 US_raccoon_2001_AY498692 US_raccoon_2001_AY526496
Europe 1/South America 1 (EU1/SA1)	AR_dog_2003_FJ392652 AU_dog_2002_GQ214376 AU_dog_2002_GQ214378 AU_dog_2002_GQ214380 AU_dog_2002_GQ214384 BR_dog_2007_EU098102 BR_dog_2007_EU098103 BR_dog_2012_JX912960 BR_dog_1998_JX912965 BR_dog_2010_JX912971 CH_fox_2010_JF810106 CH_fox_2010_JF810107 CH_fox_2010_JF810108 CH_lynx_2010_JF810109 CH_marten_2002_JF810110 CH_dog_2010_JF810111 CH_marmot_2011_JQ966309 DE_dog_1996_Z77671 DE_dog_1996_Z77672 DE_dog_1996_Z77673 DE_fox_2008_FJ416336 DE_fox_2008_FJ416337 DE_badger_2008_FJ416338 DE_fox_2008_FJ416339 DE_fox_2007_JN153024 DE_fox_2007_JN153025 DK_dog_1994_Z47761 DK_mink_2012_KF430347 DK_fox_2012_KF430357 DK_fox_2012_KF430358 DK_ferret_2013_KF430375 DK_raccoon_2013_KF430376 ES_lynx_2005_GU001863 ES_marten_2005_GU001864 HU_dog_2004_DQ889177 IT_dog_2003_DQ494317 IT_dog_2002_DQ494318 IT_dog_2003_DQ494319 IT_fox_2009_HM120874 IT_fox_2012_MN044665 IT_fox_2012_MN044673 IT_marten_2012_MN044674 IT_badger_2012_MN044676 IT_badger_2013_MN044680 IT_fox_2013_MN044682 IT_fox_2013_MN044683 IT_fox_2014_MN044686 IT_fox_2017_MN044694 IT_dog_2018_MN044697 IT_fox_2018_MN044700 IT_fox_2018_MN044701 PT_wolf_1998_HM563057 PT_wolf_2008_HM563058 PT_dog_2007_HM563059 TR_dog_2002_AY093674

CDV lineages genetici	Sequenze nucleotidiche
Europe 2/Europe-Wildlife (EU2)	UY_dog_2007_JN215473
	UY_dog_2008_JN215474
	UY_dog_2008_JN215475
	UY_dog_2009_JN215476
	UY_dog_2009_JN215477
	AU_marten_2007_GQ214369
	AU_badger_2006_GQ214374
	DE_raccoon_2007_JN153019
	DE_raccoon_2007_JN153020
	DE_raccoon_2007_JN153021
	DE_raccoon_2007_JN153022
	DE_raccoon_2007_JN153023
	DK_mink_1992_Z47759
	HU_dog_2006_DQ889187
HU_dog_2006_DQ889188	
HU_dog_2006_DQ889189	
Europe 3/Arctic like (EU3)	IT_fox_2000_DQ228166
	AU_dog_2003_GQ214373
	CN_fox_2005_EF445052
	GL_dog_1992_Z47760
	HU_dog_2005_DQ889178
	HU_dog_2006_DQ889185
	IT_wolf_2013_KC966928
	IT_dog_2013_KM115536
	US_dog_2004_AY964108
	US_dog_2004_AY964112
	CN_gpanda_1999_AF178038
Asia 1 (AS1)	CN_fox_2006_EU325722
	CN_dog_2008_FJ409464
	CN_fox_2006_HQ540293
	CN_mink_2014_KJ660069
	JP_dog_1996_D85754
	JP_dog_2005_AB212965
	JP_badger_2007_AB329581
	TW_dog_2005_EU296481
	TW_dog_2005_EU296490
	CN_fox_2005_EU743935
Asia 2 (AS2)	JP_dog_1998_AB025270
	JP_dog_2006_AB252718
	KR_dog_1997_EU716073
	KR_marten_1998_EU716074
	ZA_dog_2007_FJ461714
	ZA_dog_2007_FJ461720
South Africa (ZA)	ZA_dog_2007_FJ461724
	ZA_dog_2007_FJ461698
	AR_dog_2005_FJ392651
South America 2 (SA2)	AR_dog_2010_KC257463
	AR_dog_2010_KC257464
Rockborn like (RL)	CN_lesser-panda_1999_AF178039
	Rockborn-Candur_GU266280
	Rockborn-46th_GU810819
	US_dog_2004_AY964114

Le sequenze di canine distemper virus (CDV) sono state rinominate nel seguente ordine: abbreviazione della nazione, specie ospite, anno di identificazione e numero di accesso di GenBank.

**Allegato 6.1.** Sequenze nucleotidiche di referenza di feline calicivirus reperite sul database GenBank utilizzate per l'analisi di sequenza nello **Studio 6**.

<b>GenBank ID</b>	<b>Ceppo</b>	<b>Specie ospite</b>	<b>Anno</b>	<b>Origine geografica</b>	<b>Note e segni clinici</b>
AF283778	213	Cane	1995	Italia	Diarrea
U07130	255	Gatto	1970	USA	Lesioni orali e polmonite - ceppo vaccinale
JX519214	1874	Gatto	1996	USA	Patologie delle vie aeree superiori
JX519209	3786	Gatto	1996	USA	Asintomatico
JX519210	5789	Gatto	1996	USA	Stomatite cronica
JX519211	20879	Gatto	1996	USA	Stomatite cronica
JX519212	21223	Gatto	1995	USA	Polmonite
JX519213	21749	Gatto	1996	USA	Stomatite cronica
KJ572400	12Q087-1	Gatto	2012	Corea del Sud	ND
KJ572401	12Q087-5	Gatto	2012	Corea del Sud	ND
AF031875	182cvs5A	Gatto	1980	Australia	Patologie delle vie aeree superiori
AF109468	A4	Gatto	1973	Regno Unito	Patologie delle vie aeree superiori
DQ910794	Ari	Gatto	1998	USA	Segni clinici virulenti sistemici
U13992	CFI/68	Gatto	1960	USA	Patologie delle vie aeree superiori
KJ495728	CH-JL1	Gatto	2013	Cina	Asintomatico
KJ495729	CH-JL2	Gatto	2013	Cina	Patologie delle vie aeree superiori
KJ495730	CH-JL3	Gatto	2013	Cina	Patologie delle vie aeree superiori
KT206207	CH-JL4	Gatto	2015	Cina	ND
DQ910789	Deuce	Gatto	2004	USA	Segni clinici virulenti sistemici
D31836	F4	Gatto	1971	Giappone	Patologie delle vie aeree superiori
AF109465	F65	Gatto	1990	Regno Unito	Zoppia e stomatite
M86379	F9	Gatto	1958	ND	Ceppo vaccinale
KM111557	FB-NJ-13	Gatto	2013	Cina	ND
DQ424892	FCV/DD/2006/GE	Gatto	2006	Germania	ND
DQ910786	FCV-127	Gatto	2004	USA	Patologie delle vie aeree superiori
DQ910787	FCV-131	Gatto	2003	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AF479590	FCV2024	Gatto	2002	Germania	Ceppo vaccinale
KJ021044	FCV-21	Gatto	1993	USA	Asintomatico
X99445	FCV-2280	Gatto	1982	Canada	Zoppia
DQ910790	FCV-5	Gatto	2001	USA	Segni clinici virulenti sistemici
DQ910788	FCV-796	Gatto	2004	USA	Patologie delle vie aeree superiori
X99446	FCV-KS109	Gatto	1995	Germania	Stomatite cronica
X99447	FCV-KS20	Gatto	1994	Germania	Stomatite cronica
X99448	FCV-KS40	Gatto	1995	Germania	Patologie delle vie aeree superiori
X99449	FCV-KS8	Gatto	1994	Germania	Stomatite acuta
U07131	FCV-LLK	Gatto	1982	Canada	Zoppia
GU214989	GD	Ghepardo	2004	Cina	ND
DQ910792	George Walder	Gatto	2002	USA	Segni clinici virulenti sistemici
KJ551380	Gon	Gatto	2003	Giappone	ND
KT970059	GX01-13	Gatto	2013	Cina	ND
KT267162	HB-S4	Gatto	2004	Cina	ND
DQ910793	Jengo	Gatto	2002	USA	Segni clinici virulenti sistemici
AF109466	JOK63	Gatto	1985	Regno Unito	Patologie delle vie aeree superiori e stomatite
DQ910795	Kaos	Gatto	2002	USA	Segni clinici virulenti sistemici
L09719	KCD	Gatto	1957	Nuova Zelanda	Asintomatico
AF109467	LS012	Gatto	1985	Regno Unito	Stomatite cronica
AF109464	LS015	Gatto	1985	Regno Unito	Stomatite cronica
L09718	NADC	Gatto	1983	USA	Asintomatico
KP987265	SH	Ghepardo	2002	Cina	ND
KJ944377	TFHLJ-8	Tigre	2013	Cina	ND
KU373057	TIG-1	Tigre	2014	Cina	ND
JN210884	Urbana	Gatto	1968	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AY560118	USDA	Gatto	2005	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AY560116	UTCVM-H1	Gatto	1999	USA	Segni clinici virulenti sistemici
AY560117	UTCVM-H2	Gatto	2002	USA	Segni clinici virulenti sistemici
AY560113	UTCVM-NH1	Gatto	1993	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AY560114	UTCVM-NH2	Gatto	1998	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AY560115	UTCVM-NH3	Gatto	2000	USA	Patologie delle vie aeree superiori
AF031877	V274	Ghepardo	1989	Australia	Patologie delle vie aeree superiori e lesioni orali
AF032106	V276	Ghepardo	1989	Australia	Patologie delle vie aeree superiori e lesioni orali
AF038126	V77	Gatto	1975	Australia	Lesioni orali e aborto
AF031876	V83A	Gatto	1970	Australia	Morte improvvisa e danno polmonare

GenBank ID	Ceppo	Specie ospite	Anno	Origine geografica	Note e segni clinici
KX371573	WZ-1	Gatto	2016	Cina	ND
KX371572	XH	Gatto	2015	Cina	ND
KJ551382	ym3	Gatto	2001	Giappone	ND

ND: dato non disponibile.

#### Allegato 6.2. Alterazioni clinicopatologiche dei gatti inclusi nello Studio 6.

Variabili	Gatto1	Gatto2	Gatto3	Intervallo di riferimento
<b>Ematologia</b>				
RBCs (cellule/mm <sup>3</sup> )	8,540,000	7,820,000	6,680,000	7,000,000–11,000,000
WBCs (cellule/mm <sup>3</sup> )	44,230	22,580	27,590	4800–14,930
Hb (g%)	11.8	11.1	8.7	10–16
Hct (g%)	35.3	32.2	27.1	32–48
MCV (fl)	41.3	41.1	40.6	36–55
MCH (pg)	13.8	14.2	13.1	12.3–16.2
MCHC (g%)	33.4	34.6	32.2	31–36
MPV (fl)	18.9	28.5	13.3	8–26
RDW (%)	16.4	14.3	15.8	13.17–17
Piastrine (cellule/mm <sup>3</sup> )	155,000	87,000	461,000	150,000–500,000
Reticolociti (cellule /mm <sup>3</sup> )	46,500	51,200	46,100	0–80,000
Neutrofili (cellule /mm <sup>3</sup> )	41,320	20,780	24,720	1600–10,000
Monociti (cellule /mm <sup>3</sup> )	650	440	1000	0–650
Linfociti (cellule /mm <sup>3</sup> )	1690	1280	1670	900–5600
Basofili (cellule /mm <sup>3</sup> )	120	10	10	0–60
Eosinofili (cellule /mm <sup>3</sup> )	430	0	90	60–1470
<b>Chimica sierica</b>				
ALT (U/l)	13	48	11	20–72
AST (U/l)	24	48	22	9–40
ALP (U/l)	4	6	9	0–140
GGT (U/l)	0.2	0.1	0.1	0–4
Bilirubina totale (mg/dl)	0.35	1.54	0.17	0–0.3
Colesterolo (mg/dl)	105	147	171	64–229
Glucosio (mg/dl)	116	193	119	63–148
Albumina (g/dl)	2.12	3	2.67	2.6–4
Protein totali (g/dl)	6.41	7.04	6.8	6.5–8.8
A:G (g:g)	0.49	0.74	0.65	0.52–1.19
Creatinina (mg/dl)	1.11	0.9	0.67	0.8–1.8
Urea (mg/dl)	41.75	28.39	38.82	30–65
Posforo (mg/dl)	5.65	5.63	5.47	2.5–6.2
Potassio (mEq/l)	4	3.8	4.8	3.4–5.1
Sodio (mEq/l)	150	144	153	145–155
Cloro (mEq/l)	117.7	106.5	120.4	110–123
Magnesio (mg/dl)	2.47	2.62	2.88	1.9–2.8
Calcio totale (mg/dl)	8.4	8.6	9.3	8.5–10.5
SAA (µg/dl)	121	199	82	0–10

L'esame emocromocitometrico (CBC) è stato eseguito con un analizzatore ematologico automatizzato (ADVIA 2120; Siemens Healthcare Diagnostics, Monaco di Baviera, Germania). Il CBC è stato integrato con l'osservazione dello striscio ematico al microscopio previa colorazione con May-Grünwald Giemsa. Il profilo biochimico sierico includeva differenti parametri tra cui creatinina, urea, fosforo, proteine totali, albumina, rapporto albumine e globuline, alanina transaminasi, aspartato transaminasi, fosfatasi alcalina, gamma(γ)-glutamilttransferasi, bilirubina totale, colesterolo, calcio totale, sodio, potassio, cloro, glucosio e siero amiloide A. L'analisi di chimica sierica è stata effettuata con un analizzatore automatizzato (AU480; Beckman Coulter-Olympus, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

A:G: rapporto albumina e globuline, ALP: fosfatasi alcalina, ALT: alanina aminotransferasi, AST: aspartato aminotransferasi, GGT: gamma(γ)-glutamilttransferasi, Hb: emoglobina, Hct: ematocrito, MCH: contenuto emoglobinico corpuscolare medio, MCHC: concentrazione emoglobinica corpuscolare media, MCV: volume corpuscolare medio, MPV: volume piastrinico medio, RBCs: globuli rossi, RDW: ampiezza di distribuzione dei globuli rossi, SAA: siero amiloide A; WBCs: leucociti.

## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare la mia tutor, Prof.ssa Mara Battilani, e il mio correlatore, Dr. Andrea Balboni, per aver permesso la realizzazione di tutti i progetti di ricerca durante il corso di dottorato. I loro insegnamenti sono stati fondamentali per la mia crescita professionale. La Prof.ssa Battilani ha rappresentato per me un punto fermo su cui poter sempre fare affidamento, con la sua pacatezza e delicatezza è riuscita a creare un ambiente di lavoro sereno e collaborativo. Il Dr. Balboni è stato un punto di riferimento importante, i suoi consigli, le sue critiche, la sua infinita pazienza e la sua estrema disponibilità mi hanno supportato moltissimo in questi anni.

Ringrazio la Dott.ssa Elisa Brini per la sua capacità di avere sempre la soluzione ad ogni problema. La sua presenza, a volte anche solo telefonica, è stata più volte rassicurante. Devo a lei parte della mia formazione in laboratorio e della mia crescita personale. Il suo saper ascoltare ed essere disposta ad aiutare in qualsiasi circostanza ha reso le mie giornate lavorative più serene.

Ringrazio la Dott.ssa Laura Gallina per gli insegnamenti e i consigli che ha saputo darmi in laboratorio, sempre disponibile nonostante i molti impegni. Confrontarmi con lei e condividere le decisioni in molte occasioni è stato per me motivo di sollievo.

Ringrazio la Dott.ssa Alessia Terrusi per il grande aiuto con l'organizzazione delle attività di diagnostica e ricerca in laboratorio. La sua presenza e disponibilità sono state per me di grande supporto.

Ringrazio Chiara Lattanzi per l'aiuto nello svolgimento delle attività in laboratorio, la complicità e i consigli sempre preziosi. Poter condividere alcuni problemi con lei mi ha aiutato a sdrammatizzare ed affrontare alcune situazioni con un approccio positivo.

Desidero ringraziare il Prof. Francesco Dondi e tutto il personale del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie per aver messo a mia disposizione i laboratori e per avermi supportato in questo periodo.

