

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2020”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 10/20 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità animale

Titolo del progetto:

**Acquisizione di evidenze scientifiche ed epidemiologiche
di campo sulla suscettibilità degli animali a
SARS-CoV-2 ed altri coronavirus in ottica One Health**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Dr Marcello Giovanni Sala

SINTESI

Acquisizione di evidenze scientifiche ed epidemiologiche di campo sulla suscettibilità degli animali a SARS-CoV-2 ed altri coronavirus in ottica One Health

Parole chiave: SARS-CoV-2, Coronavirus, One-Health

Dalla fine del 2019, una nuova sindrome respiratoria a carattere pandemico denominata COVID-19 è emersa negli esseri umani, causata dal nuovo coronavirus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Le evidenze prodotte sin dai primi mesi del 2020, dapprima in studi in silico e studi computazionali e successivamente provenienti da case-report di campo, hanno suggerito e poi confermato la suscettibilità di animali selvatici e domestici all'infezione, alimentando ipotesi circa il loro potenziale ruolo di reservoir. Le segnalazioni di positività al SARS-CoV-2 in animali da compagnia e grandi felini da zoo, le evidenze di infezione e malattia nei visoni allevati, accompagnati da probabili fenomeni di spill-back verso l'uomo, hanno posto all'attenzione generale e della sanità pubblica la necessità di approfondire le conoscenze sulla suscettibilità degli animali e il loro ruolo nel mantenimento del virus in contesti di comunità. Dal 2020, nell'ambito delle attività di supporto alle regioni Lazio e Toscana per la gestione degli animali sospetti SARS-CoV-2, le attività della RC IZS LT10/20 si sono articolate in diverse componenti di monitoraggio/sorveglianza : 1) Sorveglianza passiva su animali da compagnia deceduti con lesioni anatomico-patologiche riferibili a infezione da SARS-CoV-2, pervenuti presso l'IZSLT nell'ambito della diagnostica cadaverica con anamnesi muta; 2) Sorveglianza sindromica su sospetti clinici, includendo animali vivi o deceduti con anamnesi di sospetto clinico e animali vivi o deceduti conviventi con casi umani confermati COVID-19; 3) Sorveglianza attiva su gatti di colonia, in collaborazione con la ASL Roma 4; 4) Sorveglianza sanitaria su primati ospitati in zoo e altre collezioni. La programmazione è stata effettuata in fasi preparatorie successive: a) sono state selezionate ed elencate le specie target dello studio tra gli animali da compagnia e da zoo, inclusi i primati; b) sono state definite le matrici da campionare (dall'apparato enterico e respiratorio); c) sono stati definiti i protocolli per la diagnostica istopatologica, per la diagnostica diretta del virus SARS-CoV-2 e degli altri coronavirus nonché per la diagnosi indiretta, sierologica, di esposizione recente o pregressa all'infezione mediante rilevazione e titolazione delle IgG. In dettaglio, per l'analisi viologica: i) adozione della procedura "Pancorona" mirata ad individuare tutti i Coronavirus possibilmente presenti tramite amplificazione e sequenziamento di un tratto genico target (PCR end-point); ii) analisi molecolari specifiche per rilevare SARS-CoV-2 (RealTime PCR). Sono state elaborate e validate specifiche schede di rilevamento dei metadati anagrafici, anamnestici e di esposizione relativi ai campioni raccolti nell'ambito delle diverse attività di monitoraggio/sorveglianza. Nel periodo 2021-2023 sono stati campionati 319 individui (n=100 per sorveglianza attiva, n=98 per sorveglianza passiva, n=44 per sorveglianza sindromica e n=77 per sorveglianza sanitaria), appartenenti a 36 specie diverse. Complessivamente, sono state effettuate 837 analisi viologiche (n=255 in RealTime PCR per ricerca diretta di SARS-CoV-2, n=582 in PCR end-point Pancorona). Nessun individuo analizzato nell'ambito del progetto è risultato positivo al SARS-CoV-2 alle prove molecolari, mentre 26 individui (8,15%) sono risultati positivi al marcitore Pancorona: 10 gatti dalla sorveglianza attiva, che al sequenziamento hanno restituito l'appartenenza ai *Feline Coronavirus*, 4 cani, 9 gatti, 1 furetto, 1 cavallo e 1 macaco da monitoraggio passivo, sindromico e nella sorveglianza sanitaria degli animali da zoo. Per dieci di questi 16 individui sono state ottenute le sequenze del frammento amplificato, tutte appartenenti ai coronavirus generalmente rilevabili nei rispettivi gruppi tassonomici (*Canine, Feline e Ferret Coronavirus*). L'analisi sierologica su gatti di colonia per la ricerca delle IgG anti-Coronavirus felino ha mostrato un alto tasso di positività (69%), con titoli anticorpali prevalentemente bassi (media=95,65; mediana=20; min=20, max=1280). L'analisi sierologica per SARS-CoV-2, condotta su gatti di colonia vivi e, in maniera esplorativa, su alcuni individui arrivati morti, ha rilevato la positività complessiva in 5 gatti. Tali positività all'analisi di screening non sono state tuttavia confermate al test di conferma eseguiti.

I dati ottenuti dallo studio non hanno evidenziato una esposizione certa a SARS-CoV-2 delle specie animali analizzate provenienti dai diversi contesti di esposizione indagati.

In nessun caso è stato possibile rilevare la presenza del virus nelle analisi condotte.

In accordo con la letteratura scientifica, i risultati dello studio non suggeriscono, peraltro, un possibile ruolo di queste specie animali come reservoir e/o veicolo di trasmissione del virus all'uomo.

Tuttavia, è importante sottolineare che lo studio, ad eccezione della survey condotta sui gatti di colonia, è stato condotto su un campione non rappresentativo di animali delle diverse provenienze. Inoltre, la capacità di reclutamento di animali domestici conviventi con casi umani COVID-19 è stata limitata dalla scarsa disponibilità in fase epidemica delle autorità sanitarie in relazione alla segnalazione dei casi umani ed all'avvio dei rispettivi animali domestici al percorso diagnostico.

Per tale motivo non è possibile alcuna inferenza dei risultati ottenuti verso le singole popolazioni di riferimento delle specie indagate. È quindi possibile, come segnalato in letteratura, che il virus possa essere stato presente a livelli di prevalenza inferiori alla sensibilità del sistema di monitoraggio passivo/sindromico utilizzato.

Un importante obiettivo raggiunto dalla presente ricerca è stato, tuttavia, la sperimentazione di un framework di sorveglianza integrata, che può rappresentare in futuro un modello efficace per la sorveglianza delle infezioni da coronavirus nelle potenziali specie serbatoio. La ricerca ha infatti consentito di accettare la presenza di coronavirus specie-specifici in alcune delle specie animali che vivono a stretto contatto con l'uomo. Si ritiene quindi possibile poter applicare in modalità sistematica questo approccio per monitorare i trend di prevalenza dei coronavirus nelle diverse specie ed identificare precocemente, adottando appropriate procedure di caratterizzazione profonda degli isolati, la presenza di nuovi coronavirus potenzialmente a carattere zoonosico.

Le sorveglianze attiva, passiva e sindromica possono infatti operare sinergicamente, permettendo di raccogliere dati su popolazioni animali ampie, in particolare appartenenti a specie potenzialmente reservoir che vivono a stretto contatto con l'uomo. Il Framework sperimentato, se condotto continuativamente nel tempo, prefigura la possibilità di migliorare l'efficacia preventiva della sorveglianza attraverso la caratterizzazione genomica dei coronavirus rilevati nel corso di attività diagnostiche correnti.

SUMMARY

Assessment of scientific and epidemiological knowledge on susceptibility of animals to SARS-CoV-2 and other coronaviruses in One Health perspective

Keywords: SARS-CoV-2, Coronavirus, One-Health

From the end of 2019, a new pandemic respiratory syndrome called COVID-19 emerged in humans, caused by the new coronavirus Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Evidence produced since the early months of 2020, initially in silico and from computational studies and later from field case reports, has suggested and then confirmed the susceptibility of wild and domestic animals to infection, fueling hypotheses about their potential role as reservoirs. Reports of SARS-CoV-2 positivity in companion animals and large zoo felids, evidence of infection and disease in farmed mink, accompanied by probable spill-back events to humans, have brought to the attention of the public the need to deepen knowledge about the susceptibility of animals and their role in maintaining the virus in community settings.

Since 2020, as part of the activities to support the Lazio and Tuscany regions in the management of SARS-CoV-2 suspected animals, the activities of the RC IZS LT10/20 have been divided into several monitoring/surveillance components: 1) Passive surveillance on deceased companion animals with anatopathological lesions referable to SARS-CoV-2 infection, received at the IZSLT as part of cadaveric diagnostics with mute anamnesis; 2) Syndromic surveillance on clinical suspects, including live or dead animals with a history of previous clinical suspicion and live or deceased animals living with confirmed COVID-19 human cases; 3) Active surveillance on stray cats, in collaboration with the Local Health Unit Roma 4; 4) Health monitoring on primates housed in zoos and other collections. The programming was carried out in successive preparatory phases: a) Target species were selected and listed among companion and zoo animals, including primates; b) Matrices to be sampled were also defined (from the digestive and the respiratory tract); C) Protocols were defined for histopathological diagnostics, for the direct diagnosis of the SARS-CoV-2 virus and other coronaviruses, as well as for the indirect, serological, diagnosis of recent or previous exposure to infection by detecting and titrating SARS-CoV-2 specific IgG. In detail, for virological analysis: i) Adoption of the "Pancorona" procedure aimed at identifying all possible Coronaviruses present by amplifying and sequencing a target gene fragment (PCR end-point); ii) Specific molecular assays to detect SARS-CoV-2 (RealTime PCR). Specific data collection sheets were developed and validated for individual, anamnestic, and exposure data related to the samples collected as part of the different monitoring/surveillance activities.

In the period 2021-2023, 319 individuals were sampled (n=100 for active surveillance, n=98 for passive surveillance, n=44 for syndromic surveillance, and n=77 for health surveillance), belonging to 36 different species. Overall, 837 virological analyses were performed (n=255 in RealTime PCR for direct search of SARS-CoV-2, n=582 in Pancorona end-point PCR). No individual tested positive for SARS-CoV-2, while 26 individuals (8.15%) were positive for the Pancorona marker: 10 cats from active surveillance, which upon sequencing returned to belong to Feline Coronavirus; 4 dogs, 9 cats, 1 ferret, 1 horse and 1 macaque from passive, syndromic monitoring or from the health monitoring of zoo animals. For 10 of these 16 individuals, the sequences of the amplified fragment were obtained, all belonging to coronaviruses generally detectable in their respective taxonomic groups (Canine, Feline, and Ferret Coronavirus). The serological analysis on stray cats for the detection of anti-Feline Coronavirus IgG showed a high positivity rate (69%), with predominantly low antibody titers. The serological analysis for SARS-CoV-2, conducted on live colony cats and, in an exploratory way, on some individuals that arrived dead, showed overall positivity in 5 cats. However, these positivity results to the screening test were not confirmed in 3 out of 5 cases at the confirmatory test performed.

The data obtained from the study did not show a clear exposure to SARS-CoV-2 of the animal species analyzed from the different exposure contexts investigated. In no case was it possible to detect the presence of the virus. According to the scientific literature, the results of the study do not suggest, however, a possible role of these animal species as reservoirs and/or vehicles for the transmission of the virus to humans. However, it is important to emphasize that the study, with the exception of the survey conducted on stray cats, was conducted on a non-representative sample of animals from different origins. Furthermore, the ability to recruit pets cohabiting with human COVID-19 cases, for which a higher probability of eventual detection of the virus was indeed expected, was hampered by the limited availability of health authorities during the epidemic phase in relation to reporting human cases and the referral of their domestic animals to the diagnostic pathway.

For this reason, it is not possible to infer any of the results obtained towards the single reference populations of the species investigated. It is therefore possible, as reported in the literature, that the virus may have been present at prevalence levels below the sensitivity of the passive/syndromic monitoring system adopted.

Anyway, an important objective achieved by the present research was the application of a reliable integrated surveillance framework, which in the future can represent an effective model for the surveillance of coronavirus infections in potential reservoir species. The research has in fact made it possible to ascertain the presence of species-specific coronaviruses in some of the animal species that live in close contact with humans. It is therefore considered possible to apply this approach in a systematic way to monitor the prevalence trends of coronaviruses in different species, thus allowing early detection of coronaviruses potentially with zoonotic potential, by adopting appropriate procedures for deep characterization of isolates.

Active, passive and syndromic surveillance can be successfully integrated, allowing to collect data on large animal populations, in particular belonging to potentially reservoir species that live in close contact with humans. The experimental framework, if conducted continuously over time, opens to the possibility of improving the preventive effectiveness of surveillance through the genomic characterization of coronaviruses detected during current diagnostic activities.