

DIAGNOSTICA INTRAVITALE E POSTMORTALE DELLA PERITONITE INFETTIVA FELINA

Saverio Paltrinieri

Istituto di Patologia Generale Veterinaria – Milano

INTRODUZIONE

La Peritonite Infettiva Felina (FIP) colpisce i felini domestici e selvatici ed è sostenuta da Coronavirus (Feline Coronavirus o FCoV). Il virus responsabile (FIPV) è una variante mutata del FECV (Feline Enteric Coronavirus)¹ identico morfologicamente e antigenicamente, ma meno patogeno: le enteriti da FECV sono inapparenti o lievi,² l'infezione da FIPV è sistemica e letale,¹ soprattutto in gatti giovani o con più di 10 anni.^{3,4} Non sussiste predisposizione di sesso o di razza:^{5,6} la maggior incidenza in gatti di razza pura⁶ è dovuta all'affollamento negli allevamenti⁵ e la maggiore incidenza nei mesi freddi all'affollamento in locali chiusi.^{1,6} Gravidanza, interventi chirurgici, infezioni intercorrenti favoriscono la comparsa della FIP.^{1,7}

Alla diagnosi certa si arriva solo con l'istologia.¹¹ Clinicamente la forma essudativa o umida, è caratterizzata da versamenti intracavitari,¹ mentre quella non essudativa o secca da sintomi legati a lesioni granulomatose in diversi organi, inclusi occhio e sistema nervoso centrale.^{8,9} Da un punto di vista ematologico si riscontrano alterazioni aspecifiche (leucocitosi neutrofila, linfopenia, anemia non rigenerativa) mentre sono considerate specifiche iperproteidemia con iperglobulinemia a carico delle frazioni α_2 e γ .^{1,10} L'indagine sierologica non offre risultati probanti,¹ per l'impossibilità di distinguere antigenicamente il FECV e il FIPV o addirittura altri coronavirus^{1,11,12} con conseguenti false positività, mentre falsi negativi possono dipendere dalla formazione di immunocomplessi.¹ Neppure metodi sofisticati quali la nested RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) distinguono il genoma dei due FCoV.¹²

L'esame del versamento, se presente, può essere invece altamente probante: accanto a particolari caratteristiche macroscopiche e citologiche,¹ si rileva un elevato contenuto proteico, con alte percentuali di γ -globuline.^{1,13,14} Il riscontro del FIPV mediante immunofluorescenza può confermare la diagnosi.¹⁴

Alla luce dei problemi sopraesposti, ci si può avvicinare alla diagnosi certa valutando nell'insieme, dati anamnestici, clinici e di laboratorio. A tale scopo è stato elaborato uno schema diagnostico che attribuisce un diverso peso alle alterazioni sopraelencate.¹

Allo scopo di verificare la potenzialità diagnostica dei differenti test effettuabili "in vivo", e, nel contempo, di trarre informazioni epidemiologiche sulla diffusione della malattia sono stati

analizzati campioni provenienti da gatti con sintomi riferibili a FIP, correlando poi i risultati ottenuti con le successive diagnosi anatomico-istopatologiche.

MATERIALE E METODI

Oggetto della presente indagine sono stati 82 gatti con sintomi riferibili a FIP. Come valori di riferimento sono stati utilizzati quelli ottenuti da 14 gatti clinicamente sani, di età, razza, sesso variabili e correlabili a quelli dei soggetti patologici. Da ogni gatto 3 ml di sangue sono stati prelevati dalla vena cefalica dell'avambraccio e posti in parte in provette contenenti EDTA, e in parte in provette prive di anticoagulante.

Mediante analizzatore automatico (Seac Hemat 8) è stato effettuato un esame emocromocitometrico completo con valutazione della formula leucocitaria su striscio colorato con metodo di May Grunwald-Giemsa e della percentuale reticolocitaria dopo colorazione con blu brillante di cresile. In capillari da microematocrito, è stato valutato l'Icterus Index.¹⁵ Le proteine totali nel siero sono state misurate con un autoanalizzatore discreto (Abbott VP), usando il metodo colorimetrico al biureto (Abbott). L'elettroforesi delle proteine è stata eseguita col metodo semimicro, su strisce di poliacetato di cellulosa, poi lette in densitometro (Gelman DCD16). I titoli anticorpali sono stati valutati mediante un kit ELISA del commercio (Dyaset) e le relative piastre sono state lette a 450 nm in analizzatore automatico (Dasit Multiskan). Sul versamento sono stati effettuati un esame citologico dopo citocentrifugazione e colorazione con May Grünwald-Giemsa, il dosaggio delle proteine, l'elettroforesi e la valutazione del titolo anticorpale anti-FCoV, come descritto in precedenza. Inoltre è stata eseguita la ricerca del FCoV mediante immunofluorescenza diretta.¹⁴ I dati raccolti sono stati utilizzati per la diagnosi "in vivo" di FIP secondo Pedersen.¹

La diagnosi finale è stata ottenuta da campioni biotipici e necroscopici, posti in formalina tamponata isoosmotica al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo, e colorati con Ematossilina-Eosina e mediante immunistochemica, utilizzando, come siero primario, un anticorpo monoclonale di topo anti-FIPV (E₁E₁G₁₁), donatoci dal Prof. N.C. Pedersen (Università di Davis, U.S.A.). Il legame antigene-anticorpo è stato evidenziato con un kit commerciale (Vectastain Elite) mediante la reazione di immunoperossidasi denominata "complesso avidina-biotina-perossidasi" (ABC)¹⁶.

Per i diversi dati ottenuti, sono stati calcolati i seguenti parametri:¹⁷ sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV). I valori relativi ai parametri ematologici ed elettroforetici rilevati nei gatti con FIP, in quelli con altre patologie e nei soggetti di controllo, sono stati confrontati tra loro mediante test ANOVA, o mediante il corrispettivo test non parametrico di Kruskal-Wallis.

RISULTATI

61 animali presentavano versamenti addominali, toracici o bicavitari. Nei restanti 21 gatti non erano presenti versamenti. In 38 casi degli 82 esaminati è stato possibile giungere istologicamente alla diagnosi di FIP, in 32 casi essudativa ed in 6 casi secca. Negli altri 44 casi (29 caratterizzati da versamenti) le diagnosi sono state le seguenti: Tumori, 19 casi (10 carcinomi, 1 linfoma, 2 emangiosarcomi, 1 mesotelioma, 1 plasmocitoma); Degenerazioni epato-renali, 9 casi; Insufficienze cardiache, 6 casi; Malattie infettive, 8 casi (4 Parvovirosi, 1 TBC, 1 Morbo di Aujeszky, 2 Nocardiosi); Parassitosi intestinale, 1 caso; Rottura epatica, 1 caso.

Da un punto di vista epidemiologico, nonostante il campione osservato fosse riferibile solo ad una parte, seppur ampia, dei casi di FIP effettivamente rilevabili nell'area di osservazione, è stato possibile confermare una maggiore incidenza nei mesi freddi, nei concentramenti di gatti e negli animali giovani, senza predisposizione di razza e sesso.

Da un punto di vista ematologico i gatti con FIP hanno mostrato alterazioni non specifiche (modica anemia normocitica normocromica non rigenerativa, aumento del grado di ittero, leucocitosi neutrofila con spostamento a sinistra, eosinopenia e linfopenia), più evidenti nelle forme essudative. Fatta eccezione per eosinopenia e linfopenia nessun parametro ematologico raggiunge valori di predittività tali da diagnosticare o escludere la FIP. In entrambi i gruppi patologici è stato rilevato un aumento delle proteine totali e in particolare delle globuline. Tali aumenti sono risultati molto più marcati in corso di FIP, con aumento di α_2 - e γ -globuline (le prime soprattutto nelle forme umide, le seconde nelle secche) ed abbassamento del rapporto albumine/globuline. Solo elevati livelli delle diverse classi di globuline, comunque, raggiungono alti livelli di specificità, mentre il valore predittivo delle alterazioni del protidogramma non è particolarmente elevato. L'analisi dei titoli anticorpali ha permesso di rilevare, sia nei controlli che nei due gruppi patologici, diversi livelli di positività, senza poter determinare un valore soglia utile a fini diagnostici.

La maggior parte (87,5%) dei versamenti prelevati in corso di FIP ma anche alcuni (27,6%) dei versamenti prelevati da gatti con altre patologie, erano compatibili morfologicamente con la diagnosi di FIP. L'analisi citologica è risultata compatibile nel 75% dei casi di FIP e solo raramente (6,8%) negli altri versamenti, nei quali, spesso (34,5%) si sono evidenziati elementi patognomonic della patologia in atto (cellule neoplastiche, batteri, ecc...). Nei gatti con FIP si sono osservati un contenuto proteico più elevato ed alte concentrazioni di α_2 e γ globuline. Anche nel versamento sono rilevabili livelli variabili di anticorpi indipendentemente dalla presenza di FIP. Anche se le caratteristiche morfologiche, citologiche e proteiche del versamento sono dotate di sensibilità e valori predittivi relativamente elevati, la ricerca del FCoV con immunofluorescenza diretta risulta

l'unico test dotato anche di alta specificità, nonostante un falso positivo, peraltro caratterizzato da aspetti clinico-patologici tali da non escludere una forma iperacuta di FIP.

Lo schema diagnostico suggerito da Pedersen¹ che valuta globalmente aspetti clinico-patologici ed anamnestici, fornisce alti valori predittivi solo nelle forme essudative.

L'esame anatomico-patologico ha consentito di identificare lesioni patognomiche e di giungere con relativa sicurezza alla diagnosi di FIP in 37 dei 38 casi esaminati. L'unico caso che ha richiesto l'esame istopatologico per confermare la diagnosi era relativo ad una forma non effusiva caratterizzata esclusivamente da noduli confluenti renali di aspetto tale da non poter escludere altre forme granulomatose (es. TBC o leucosi). Per quanto riguarda i gatti colpiti da altre patologie, senza entrare nel dettaglio delle lesioni riscontrate, va sottolineato che in 9 casi (20,4%) le caratteristiche dell'essudato e la presenza di lesioni focali non consentivano di escludere a priori, senza esame istologico, la FIP. L'istologia ha invece permesso di risolvere i dubbi diagnostici in tutti i casi di FIP, raggiungendo valori di sensibilità e di VPN del 100% e di specificità e VPP superiori al 97%, mentre l'analisi immunocitochimica pur mostrando elevata specificità (100%) e un alto VPP (100%) ha consentito di evidenziare il virus della FIP solo nell'84% dei casi.

DISCUSSIONE

I dati raccolti nel presente lavoro hanno permesso di confermare i dati epidemiologici segnalati in letteratura.^{1,3,4,5,6,7} e di sottolineare l'importanza di affrontare globalmente i vari dati anamnestico-laboratoristici per giungere ad una diagnosi conclusiva di FIP¹: sotto questo punto di vista i reperti di laboratorio che danno migliori garanzie di diagnosi, in termini di sensibilità e specificità sono rappresentati dal riscontro di eosinopenia, linfopenia, iperglobulinemia in particolare della serie α_2 e γ . Tali parametri sono anche quelli caratterizzati dai migliori valori predittivi positivi e negativi. L'analisi del versamento resta uno dei test più attendibili nelle forme effusive, a patto di considerare globalmente l'aspetto citologico, il contenuto proteico ed eventualmente ricercando il virus mediante immunofluorescenza diretta, che, nonostante la presenza di un caso, peraltro dubbio, di falsa positività, fornisce risultati diagnostici molto affidabili. Nonostante l'ampia gamma di test utilizzati, il mezzo diagnostico più efficace rimane l'esame anatomico-istopatologico mentre la ricerca del virus mediante immunocitochimica può essere considerata utile più a fini di studio della patogenesi che non per la diagnosi, anche alla luce della notevole variabilità di distribuzione del virus tra diverse lesioni dello stesso soggetto.¹⁶

BIBLIOGRAFIA

1. Pedersen NC: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Feline Practice* 23: 7-20, 1995.

2. Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K., Fudge A, Barker J: An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Rec* 42: 368-377, 1981.
3. Horzinek MC, Osterheus ADME: Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. *Am J Vet Res.* 40:1487-92, 1979
4. Pedersen NC: *Feline Husbandry*, American Veterinary Publications (Mosby), Goleta, CA, 1991, pp 393-446.
5. Kass P, Dent T.: The epidemiology of FIP in catteries. *Fel Pract* 23: 27-32, 1995.
6. Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC: Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *JAVMA.* 210:1313-1318, 1997.
7. Poland AM, Vennema H Foley JE, Pedersen NC: Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Micro* 34:3180-3184, 1996
8. Doherty MJ: Ocular manifestation of feline infectious peritonitis. *J.A.V.M.A.* 159: 417-424, 1971.
9. Kline KL, Joseph RJ, Averill DR: Feline infectious peritonitis with neurologic involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J.A.A.H.A.* 30: 111-118, 1994
10. Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA: An appraisal of the value of laboratory tests in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *JAAHA* 30:345-350, 1994.
11. Barlough JE, Stoddart CA: Feline Infectious Peritonitis. *Vet Rep.* 1, 13-17, 1990
12. Herrewegh A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJM, Groot RJ: Polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of naturally occurring feline coronavirus infections. *Feline Practice* 23: 56-60, 1995.
13. Shelley SM, Scarlett-Kranz J, Blue JT: Protein electrophoresis on effusion from cats as a diagnostic test for feline infectious peritonitis. *JAAHA* 24:495-498, 1987.
14. Paltrinieri S., Cammarata Parodi M., Cammarata G.: In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J. Vet. Diagn. Invest.* In press 1999
15. Jain NC: *Essentials of Veterinary Hematology.*, Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
16. Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M: Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 49:177-182, 1995.
17. Gerstman BB, Capucci DT: Evaluating the reliability of diagnostic test results. *JAVMA* 188:248-251, 1986