

CIMURRO DEL CANE: VALUTAZIONE DEI TITOLI ANTICORPALI IN SOGGETTI CON DIVERSA ANAMNESI CLINICA E VACCINALE

**ALESSANDRA SCAGLIARINI, FEDERICA BALDUCCI, ANTONIETTA DI FRANCESCO,
FABIO OSTANELLO, SANTINO PROSPERI, LUIGI MORGANTI**

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)

Riassunto

Sono stati esaminati 134 sieri di cane mediante le tecniche di sieroneutralizzazione (SN), immunofluorescenza indiretta (IFI) per IgM e IgG ed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-kit), al fine di valutare la risposta anticorpale nei confronti del virus del cimurro, in animali con diversa anamnesi clinica e vaccinale. I risultati delle diverse prove sierologiche sono stati messi a confronto per valutare il loro grado di correlazione.

Summary

134 sera, collected from dogs with different clinical and vaccination history, were tested by viral neutralisation (VN), an indirect immunofluorescence (IFI) to detect specific antibodies (IgM and IgG), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-kit) for Canine Distemper Virus. The results of the different serological tests were compared to evaluate their correlation.

INTRODUZIONE

Il cimurro è una malattia infettiva, sistemica, contagiosa, a decorso acuto e subacuto che provoca un alto tasso di letalità nel cane e in altre specie. La malattia è presente in forma endemica in molte aree del mondo ad eccezione di alcune regioni aride del continente africano, in considerazione dell'estrema sensibilità del virus alle alte temperature e alla luce solare (Appel, 1987). Il cimurro è caratterizzato clinicamente da manifestazioni a carico dell'apparato respiratorio, gastroenterico e del sistema nervoso. L'infezione, conosciuta da due secoli, è sostenuta dal Canine Distemper Virus (CDV), appartenente alla famiglia *Paramixoviridae* genere *Morbillivirus*, strettamente correlato antigenicamente con altri virus appartenenti allo stesso genere, quali il virus della Peste bovina (RPV), del Morbillo (MV) e il virus del Cimurro delle Foche (PDV) (Rima e coll., 1995). L'infezione raggiunge livelli di prevalenza estremamente elevati nelle popolazioni canine. La

vaccinazione con virus vivo attenuato, adottata dagli anni '50, ha contribuito a ridurre notevolmente l'incidenza della malattia nel cane (Appel, 1987); tuttavia, tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90, sono state osservate, anche in cani regolarmente vaccinati, epidemie che hanno coinvolto Finlandia (Ek-Kommonen e coll., 1997), Danimarca (Blinxenkrone-Moller e coll., 1993), Francia, Belgio ed Olanda (Adelus-Neveu e coll., 1991).

Numerosi focolai sono stati segnalati anche in Italia (Sagazio e coll., 1998).

Nel presente lavoro sono stati saggiati, con differenti metodiche sierologiche, 134 sieri di cani con diversa anamnesi clinica e vaccinale. I titoli anticorpali ottenuti sono stati messi a confronto allo scopo di evidenziare eventuali differenze tra le diverse categorie di animali considerate, con particolare riferimento al titolo delle immunoglobuline di classe M, come possibile discriminante di sieropositività da infezione rispetto a quella da vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Campioni esaminati

Sono stati esaminati 134 sieri di cane, prelevati dal febbraio 1997 al giugno 1998, appartenenti ad animali di razze diverse, 56 dei quali di età inferiore ad 1 anno. Tutti i soggetti provenivano dalla Regione Emilia-Romagna, ma con diversa distribuzione: 48 (35,8%) da allevamenti, 25 (18,6%) da canili (e di questi 21 dal solo canile di Imola, BO), 10 (7,5%) da negozi di animali e 51 (38,1%) da privati.

Dei 134 soggetti esaminati, 54 (31 dei quali cuccioli) presentavano, al momento del prelievo, segni clinici riferibili a cimurro. I restanti 80 animali sono stati presi in considerazione, sia pure in assenza di sintomatologia, in quanto potevano essere venuti in contatto con i soggetti sintomatici esaminati o nell'ambito di un controllo di routine del loro stato immunitario post-vaccinale.

Relativamente al profilo vaccinale, l'anamnesi riferiva che 99 cani erano stati regolarmente vaccinati con vaccini a diverso numero di valenze, 27 non erano mai stati vaccinati e 8 avevano una anamnesi vaccinale ignota.

Metodiche diagnostiche

Sieroneutralizzazione (SN)

La prova di SN è stata eseguita in micrometodo, secondo la tecnica di Appel e Robson (1973) modificata, utilizzando come substrato cellulare la linea VERO e come antigene il ceppo Onderstepoort (CDV-Ond), alla concentrazione d'uso di 100 TCID₅₀/50 µl.

I sieri in esame, preventivamente deplementati a 56°C per 30 minuti, sono stati diluiti per raddoppio a partire dalla diluizione di 1:10 e 50 µl di ciascuna diluizione sono stati incubati a 37°C per 1 ora con 50 µl di sospensione virale. Terminata l'incubazione, in tutti i pozzetti sono stati dispensati 100 µl di cellule VERO (indice di replicazione 5×) in Eagle MEM addizionato con 10% di siero fetale bovino. In ogni piastra sono stati allestiti 8 pozzetti di controllo cellule e 8 pozzetti di controllo virus. La lettura è stata effettuata dopo 72 ore di incubazione a 37°C, considerando come titolo neutralizzante per ciascun siero la più alta diluizione in grado di inibire per almeno l'80% l'effetto citopatico specificatamente indotto dal virus.

Come soglia di positività è stata considerata la diluizione di 1:20.

Immunofluorescenza indiretta (IFI)

La reazione è stata eseguita secondo la tecnica di Ortega-Rodriguez e coll. (1989), modificata. Per l'esecuzione della prova sono stati allestiti vetrini a 16 pozzetti (Nunc, DK), dispensando in ciascun pozzetto 100 µl di cellule VERO infettate con una sospensione virale di 10³ TCID₅₀/ml di CDV-Ond. I vetrini sono stati incubati a 35°C in atmosfera al 5% di CO₂; una volta raggiunto il 50% di effetto citopatico, l'eccesso cellulare è stato rimosso dai vetrini per rovesciamento ed i monostrati infetti so-

no stati fissati in acetone freddo all'80% per 30 minuti. Dopo fissazione i vetrini sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

I sieri in esame sono stati diluiti per raddoppio, a partire dalla diluizione di 1:10, in Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2 ed ogni campione saggiato è stato testato in doppio, per la ricerca di anticorpi anti-CDV sia della classe IgM sia della classe IgG. Come anticorpi anti-immunoglobuline di cane sono stati utilizzati anticorpi di capra rispettivamente anti-IgM ed anti-IgG, coniugati con isotiocianato di fluoresceina (KPL, UK). La lettura è stata eseguita con microscopio a fluorescenza Leitz Diaplan, obiettivo 40×.

La soglia di positività è stata fissata alla diluizione di 1:20 per la ricerca di IgM e di 1:80 per la ricerca di IgG.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

È stato utilizzato un kit del commercio (Immunocomb Biogal, Agrolabo To), atto all'evidenziazione di IgG anti-CDV. La lettura è stata eseguita su scala colorimetrica, confrontando la reazione sviluppata dai sieri in esame con quella del siero positivo di controllo. Il dato colorimetrico è stato convertito in titolo IFI, considerando come titolo soglia la diluizione di 1:80, secondo le indicazioni del produttore.

Analisi statistica

Sono stati valutati: la proporzione di soggetti con sintomatologia riferibile a cimurro in funzione della profilassi vaccinale; i titoli anticorpali IgM ed IgG in funzione del numero di valenze del vaccino utilizzato; i titoli IgM ed IgG in animali con e senza sintomi, in funzione dell'intervallo di tempo tra vaccinazione e prelievo (entro 90 giorni e oltre 90 giorni). Per il confronto delle proporzioni è stato utilizzato il test chi-quadrato. Per il confronto dei titoli anticorpali dei soggetti sieropositivi è stata valutata preliminarmente la normalità della distribuzione campionaria mediante il test di Kolmogorov-Smirnov per la bontà dell'adattamento; poiché la distribuzione campionaria dei titoli sierologici e dei logaritmi dei reciproci è risultata significativamente differente da una distribuzione gaussiana ($p < 0,01$), per le successive analisi statistiche sono stati impiegati i seguenti test non parametrici: analisi della varianza non parametrica secondo Kruskal-Wallis e la U di Mann-Whitney. Sono stati inoltre valutati i valori di correlazione dei test SN, IFI per IgG e ELISA mediante il coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman. In considerazione della scarsa numerosità della distribuzione campionaria e dell'utilizzo di tecniche non parametriche, è stato scelto un livello di significatività (α) pari a 0,01.

RISULTATI

I principali quadri clinici evidenziati, singoli o associati, distinti per classi di età, sono riportati in Tabella 1. Segni clinici erano presenti in 21 (21,2%) dei 99 soggetti vaccinati e in 14 (51,9%) dei 27 cani nei quali la vaccinazione non era stata eseguita (chi-quadrato = 9,93; $p = 0,002$). In

Tabella 1
Segni clinici evidenziati nei soggetti esaminati, divisi per classi di età

	Segni clinici					Totale
	nervosi	respiratori	oculari	gastro-enterici	cutanei	
CUCCIOLI	13	17	3	11	3	47
ADULTI	16	17	-	-	-	33
TOTALE	29	34	3	11	3	80

Tabella 2
Categorie di soggetti considerate

Categoria	Vaccinati	Prelievo ^a	Sintomi	Contatti a rischio ^b	Percentuale positivi oltre soglia e media geometrica dei titoli							
					SN		IFI M		IFI G		ELISA	
					%	media	%	media	%	media	%	media
1 (n=14)	No		Si	-	76,9	130	92,3	130	69,2	422	69,2	219
2 (n= 8)	No		No	No	28,6	20	75,0	24	0,0	20	0,0	40
3 (n= 5)	No		No	Si	80,0	70	100	92	60,0	160	60,0	139
4 (n=16)	Si	0-90	Si	-	83,3	75	87,5	88	56,3	135	57,1	198
5 (n=29)	Si	0-90	No	No	76,9	149	65,5	26	55,2	101	61,5	111
6 (n= 9)	Si	0-90	No	Si	87,5	160	100	160	77,8	187	77,8	137
7 (n= 5)	Si	>90	Si	-	100	254	100	279	100	485	100	422
8 (n=26)	Si	>90	No	No	86,4	129	84,6	35	57,7	257	53,8	115
9 (n=14)	Si	>90	No	Si	100	356	100	98	100	609	100	707

^a: distanza in giorni tra vaccinazione e prelievo

^b: (-) dato non conosciuto

nessun soggetto adulto è stato rilevato interessamento cutaneo o gastroenterico.

La valutazione comparativa dei risultati è stata effettuata in funzione delle categorie di soggetti descritte in Tabella 2, nella quale vengono riportate anche le percentuali di soggetti che presentavano titoli anticorpali maggiori o uguali alla soglia di positività fissata per ciascun test e la media geometrica dei titoli riscontrati.

Il confronto dei titoli anticorpali rilevati dai test SN, IFI per IgM e IgG e ELISA non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative tra soggetti non vaccinati (cat. 1, 2, 3), soggetti vaccinati da meno di 90 giorni (cat. 4, 5, 6) e soggetti vaccinati da oltre 90 giorni (cat. 7, 8, 9) (rispettivamente: chi-quadrato = 7,788 p = 0,020; chi-quadrato = 1,262 p = 0,532; chi-quadrato = 2,189 p = 0,335; chi-quadrato = 3,561 p = 0,169).

Relativamente agli aspetti clinici, non sono state rilevate differenze statisticamente significative dei titoli anticorpali ai test SN, IFI per IgM e IgG e ELISA tra i soggetti con sintomatologia non vaccinati (cat. 1) o vaccinati da meno di 90 giorni (cat. 4) o oltre 90 giorni (cat. 7) (rispettivamente: chi-quadrato = 3,636 p = 0,162; chi-quadrato = 4,249 p = 0,120; chi-quadrato = 3,663 p = 0,160; chi-quadrato = 0,786 p = 0,675). Anche dal confronto tra soggetti senza sintomatologia e senza possibili contatti infettanti, classificati in funzione dell'avvenuta o mancata vaccinazione e/o della distanza intercorrente dall'ultimo trattamento immu-

nizzante (gruppi 2, 5, 8), non sono emerse differenze statisticamente significative nei titoli anticorpali ai test SN e IFI per IgM e IgG e ELISA (rispettivamente: chi-quadrato = 7,844 p = 0,020; chi-quadrato = 1,648 p = 0,439; chi-quadrato = 7,776 p = 0,02; chi-quadrato = 1,477 p = 0,478).

Analogamente, quando tale confronto è stato eseguito tra soggetti senza sintomatologia, ma con possibili contatti infettanti, classificati in funzione dell'avvenuta (cat. 6, 9) o mancata vaccinazione (cat. 3) e/o della distanza dall'ultimo intervento vaccinale, non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i titoli anticorpali ai test SN e IFI per IgM e per IgG (rispettivamente: chi-quadrato = 4,910 p = 0,086; chi-quadrato = 3,371 p = 0,185; chi-quadrato = 6,461 p = 0,040), mentre i titoli ELISA risultano statisticamente diversi tra i 3 gruppi (chi-quadrato = 14,045 p = 0,001), con un valore più elevato nella categoria 9.

Il confronto dei titoli anticorpali IgM tra i soggetti classificati in funzione della sintomatologia e dell'eventuale contatto con soggetti infetti, ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i soggetti con sintomatologia rispetto ai soggetti senza sintomatologia e senza possibili contatti infettanti (rispettivamente: U = 303 p = 0,000), con titoli sierologici più elevati nella prima categoria.

Viceversa, mettendo a confronto i titoli IgM dei soggetti sintomatici e dei soggetti senza segni clinici ma con contatti infettanti, non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa (U = 388; p = 0,379).

È stata inoltre rilevata una differenza statisticamente significativa dei titoli anticorpali IgM tra i soggetti asintomatici senza contatti a rischio e i soggetti asintomatici ma con contatti a rischio ($U = 185,5$; $p = 0,00$), con un titolo anticorpale più elevato in quest'ultima categoria.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata tra i titoli anticorpali ai test SN e IFI per IgM e IgG e ELISA in funzione del tipo di vaccino utilizzato

(sino a 3 valenze antigeniche, più di 3 valenze) (rispettivamente: $U = 600$ $p = 0,347$; $U = 877,5$ $p = 0,579$; $U = 815,5$ $p = 0,229$; $U = 697$ $p = 0,246$).

Il grado di correlazione tra i risultati ELISA vs SN, ELISA vs IFI per IgG e SN vs IFI per IgG (Figg. 1, 2, 3) sono tutti altamente significativi (rispettivamente: $\rho = 0,790$ $p = 0,000$; $\rho = 0,790$ $p = 0,000$; $\rho = 0,671$ $p = 0,000$).

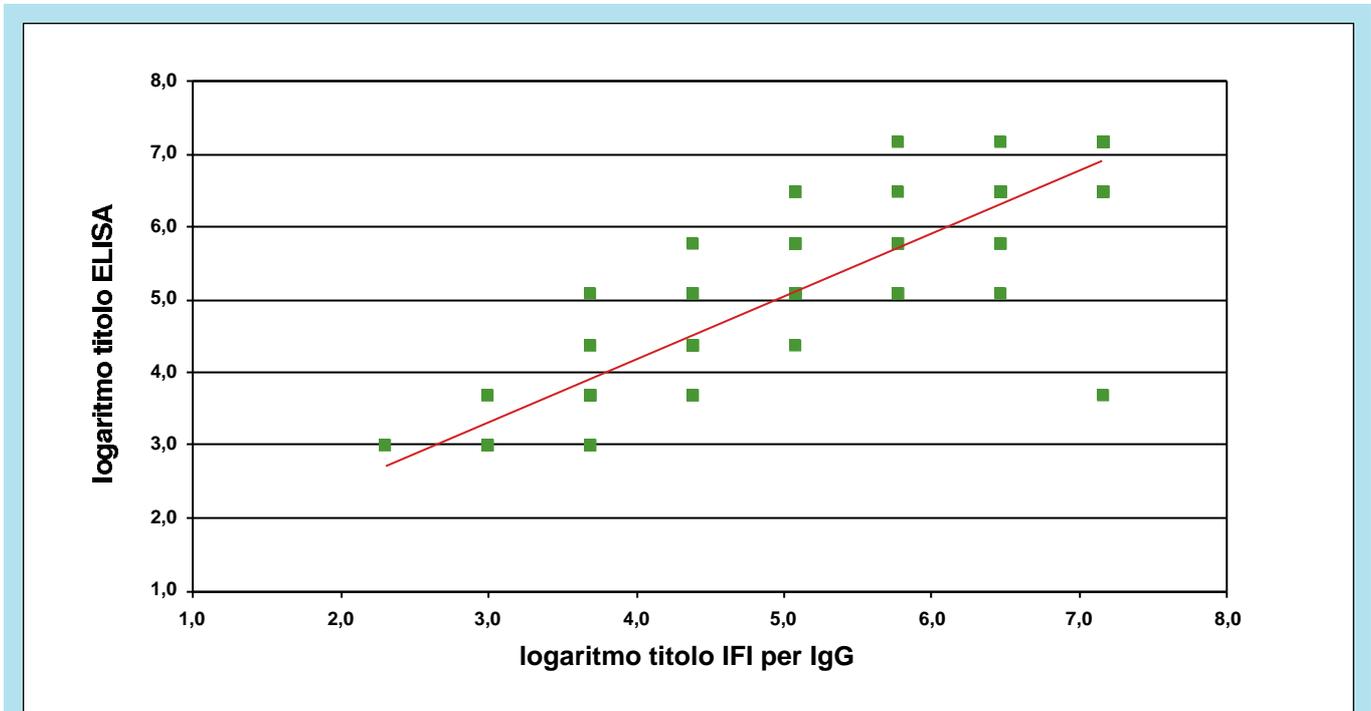


FIGURA 1 - Correlazione titoli anticorpali IFI per IgG vs ELISA ($\rho = 0,891$; $p = 0,000$).

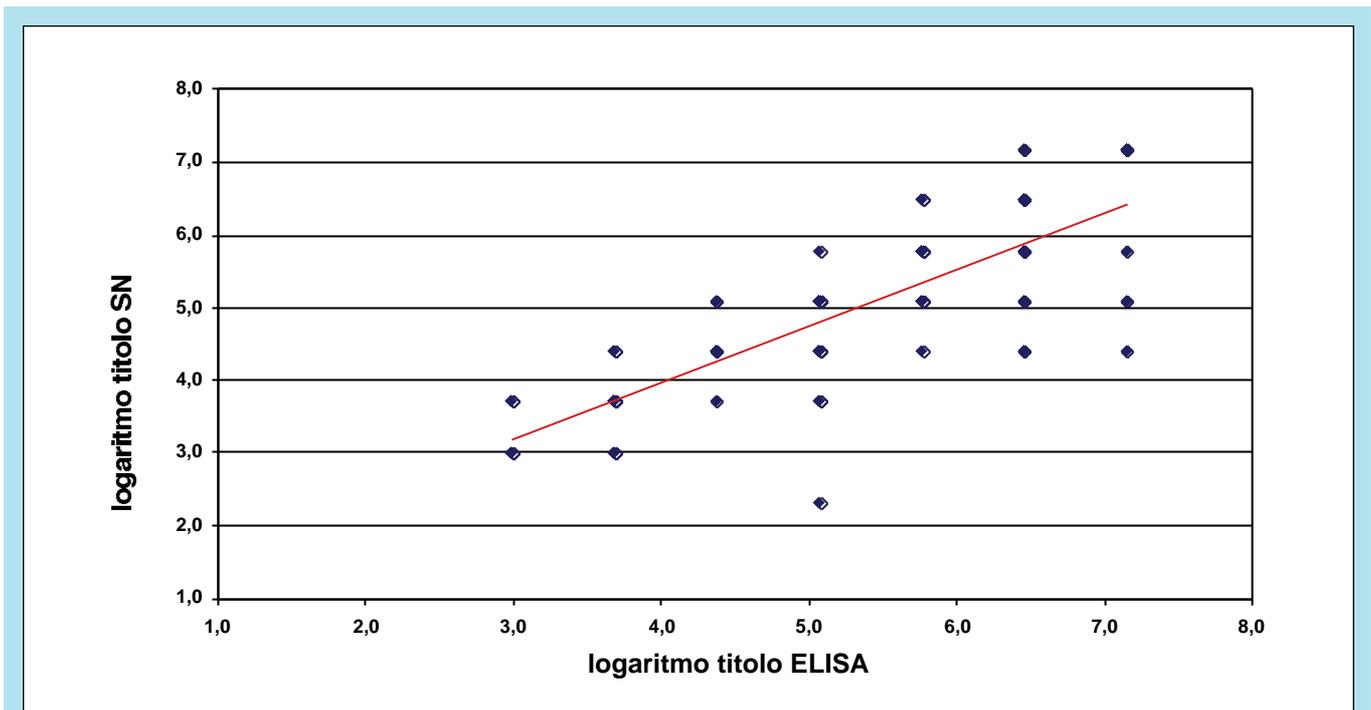


FIGURA 2 - Correlazione titoli anticorpali ELISA vs SN ($\rho = 0,790$; $p = 0,000$).

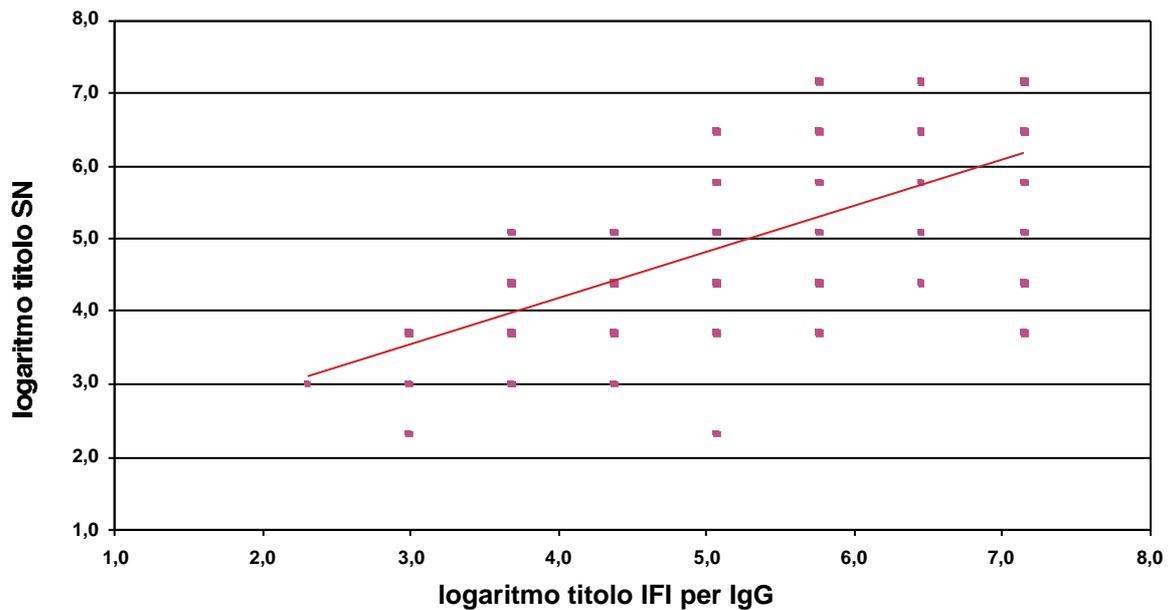


FIGURA 3 - Correlazione dei titoli anticorpali IFI per IgG vs SN ($\rho = 0,671$; $p = 0,000$).

DISCUSSIONE

La tecnica più affidabile per la diagnosi di cimurro è certamente l'isolamento virale, ma tale metodica è difficilmente attuabile in quanto sfavorevolmente condizionata da diversi fattori, quali le difficoltà di adattamento del virus selvaggio alle colture cellulari, l'estrema labilità del virus e la necessità nella maggior parte dei casi di utilizzare animali recettivi.

Recentemente, tecniche di Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sono state messe a punto dimostrando elevata sensibilità e specificità, ma il loro utilizzo a fini diagnostici è limitato ad alcuni laboratori specializzati (Gemma e coll., 1996).

Per tali ragioni nella diagnostica routinaria si ricorre a metodiche sierologiche quali sieroneutralizzazione, immunofluorescenza ed ELISA.

I valori di elevata correlazione tra le tecniche SN, IFI per IgG ed ELISA, rilevati nel presente lavoro, suggeriscono la possibilità di un loro uguale utilizzo per quanto riguarda l'evidenziazione della reattività anticorpale nei confronti del CDV. In particolare, il test ELISA da noi utilizzato, ha evidenziato buona correlazione con le altre prove sierologiche, come riscontrato anche da altri Autori (Waner e coll., 1998) e facilità di impiego che ne consente l'uso in ambito ambulatoriale. L'utilizzo di tale test è particolarmente indicato per una valutazione dello stato immunitario, sia nei cuccioli in data antecedente alla prima vaccinazione, al fine di valutare eventuali code dell'immunità materna, sia negli adulti come monitoraggio della risposta anticorpale post-vaccinale.

La valutazione del titolo IgM ha dimostrato, attraverso i confronti tra le categorie esaminate, la possibile evoluzione in forma subclinica dell'infezione, in quanto sono stati rilevati titoli anticorpali sovrapponibili nei soggetti sinto-

matici e nei soggetti asintomatici che all'anamnesi denunciavano contatti potenzialmente infettanti. In entrambe le categorie i titoli IgM si sono dimostrati nettamente più elevati rispetto a quanto rilevato per i soggetti asintomatici non a contatto con fonti d'infezione.

La presenza di soggetti sintomatici e con titoli anticorpali al di sotto della soglia di positività in SN, IFI per IgG ed ELISA, anche se regolarmente vaccinati, ripropone il problema della mancata immunizzazione post-vaccinale (Povey, 1986; Blixenkrone-Moller e coll., 1993; Marsilio e coll., 1996; Ek-Kommonen e coll., 1997; Sagazio e coll., 1998). Diverse sono le ipotesi finora avanzate per giustificare la mancata induzione immunitaria da parte dei vaccini: a) residui dell'immunità materna, che possono interferire con una vaccinazione troppo precoce; b) cattiva conservazione del vaccino; c) immunodepressione dei soggetti (stress, malnutrizione, parassitosi, trattamenti con cortisonici); d) associazione nel vaccino con un antigene immunodepressore quale il parvovirus (CPV).

Per quanto concerne i casi da noi esaminati, le valenze vaccinali non sono risultate determinanti ai fini della risposta anticorpale. La mancata reattività post-vaccinale, evidenziata in una parte di soggetti, può essere attribuita, sulla base dei dati anamnestici, ad inadeguata conservazione del vaccino o ad interventi vaccinali troppo precoci.

Ringraziamenti

Si ringrazia il dott. Fulvio Marsilio (Istituto di Malattie Infettive degli Animali "M. Compagnucci" - Università degli Studi di Teramo) per avere cortesemente fornito il ceppo CDV-Onderstepoort.

Parole chiave

Cimurro, diagnosi sierologica, vaccinazione.

Key words

Canine distemper, serology, vaccination.

Bibliografia

1. Adelus-Neveu F., Saint-Gerand A.L., Fayet G. (1991) - Il cimurro: lezione di un'epizootia. *Obiettivi & Documenti Veterinari*, 12: 17-21.
2. Appel M.J.G., Robson D.S. (1973) - A Microneutralisation Test for Canine Distemper Virus. *American Journal of Veterinary Research*, 34 (11): 1459-1463.
3. Appel M.J.G. Canine distemper virus. In: *Virus infections of Carnivores*. Ed. Elsevier, 1987, cap.13: 133-159.
4. Blinxenkrone-Moller M., Svansson V., Have P., Orvell C., Appel M.J.G., Pedersen I.R., Dietz H.H., Henriksen P. (1993) - Studies on manifestations of canine distemper virus infection in a urban dog population. *Veterinary Microbiology*, 37: 163-173.
5. Ek-Kommonen C., Sihoven L., Pekkanen K., Ricala U., Nutio L. (1997) - Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record*, 141: 380-383.
6. Gemma T., Iwatsuchi K., Shin Y.S., Yoshida E., Kai C., Mikami T. (1996) - Serological analysis of canine distemper virus using immunocapture ELISA. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(8): 791-794.
7. Marsilio F., Tiscar P.G., Palucci O., Gatti A. (1996) - Valutazione dell'immunità umorale di cani vaccinati per canine distemper virus (CDV). *Atti SISVet*: 303-304.
8. Ortega Rodriguez C., Garcia Sanchez J., Girones Punet O., Alonso Martinze J.L., Muzquiz Moracho J.L., Simón Valencia M.C. (1989) - Asportación al estudio del diagnóstico del moquillo canino en perros infectados de forma natural. *Med. Vet.*, 6 (12): 715-721.
9. Povey R.C. (1986) - Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. *Canadian Veterinary Journal*, 27: 321-323.
10. Rima B.K., Wisaupt R.G.A., Welsh M.J., Earle J.A.P. (1995) - The evolution of morbilliviruses: a comparison of nucleocapsid gene sequences including a porpoise morbillivirus. *Veterinary Microbiology*, 44: 127-134.
11. Sagazio P., Cavalli A., Buonavoglia D., Cirone F., Pratelli A., Buonavoglia C. (1998) - Correlazione tra vaccinazioni e titoli anticorpali nei confronti del virus del cimurro e dell'adenovirus del cane tipo 2 in cani adulti e in cuccioli. *Veterinaria*, 12: 23-25.
12. Waner T., Naveh A., Schwarz Ben Meir N., Babichev Z., Carmichael L.E. (1998) - Assessment of immunization response to canine distemper virus vaccination in puppies using clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *The Veterinary Journal*, 155: 171-175.