

IL CORONAVIRUS DEL CANE: UN “VECCHIO” VIRUS PER UNA “NUOVA” MALATTIA

NICOLA DECARO¹, VITO MARTELLA¹, MARCO CAMPOLO¹, COSTANTINA DESARIO¹,
GABRIELLA ELIA¹, FRANCESCO CIRONE¹, VALENTINA ELENA ZAPPULLI²,
MARIA TEMPESTA¹, MASSIMO CASTAGNARO², CANIO BUONAVOGLIA¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

²Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova

Riassunto

Gli autori descrivono un grave focolaio di infezione sistemica, ad esito letale, sostenuta da una variante pantropica del coronavirus del cane (CCoV) in cuccioli di 6-8 settimane di età. I cuccioli hanno presentato grave sintomatologia gastroenterica, con generalizzazione dell'infezione e marcata linfopenia. Uno stipo CCoV tipo II è stato isolato dagli organi degli animali deceduti, che hanno fornito esito negativo per gli altri agenti patogeni del cane. Per questa nuova forma di infezione da CCoV viene proposta la denominazione di “sindrome acuta linfopenica e gastroenterica del cane” (*CALG syndrome*).

Summary

An outbreak of systemic, fatal infection by a pantropic variant of canine coronavirus (CCoV) in 6-8-week-old pups is reported. The affected pups displayed severe gastroenteritis, systemic clinical signs and leukopenia. A CCoV type II strain was isolated from the parenchymatous organs of the dead pups, whereas laboratory investigations failed to detect other pathogens of dogs. We propose to designate the new CCoV-induced disease as “canine acute lymphopenic gastroenteric (CALG) syndrome”.

INTRODUZIONE

Il coronavirus del cane (CCoV) è un virus della famiglia Coronaviridae, genere *Coronavirus*, che comprende tre gruppi antigenici principali, ai quali dovrebbe aggiungersi un quarto gruppo costituito dal coronavirus della SARS (SARS-CoV)¹⁴ e dai coronavirus SARS-correlati⁹. CCoV appartiene al gruppo antigenico I insieme ai coronavirus felini (FCoV) tipo I e tipo II, al virus della gastroenterite trasmissibile del suino (TGEV), al coronavirus respiratorio del suino (PRCoV), al virus della diarrea epidemica del suino (PEDV) ed al coronavirus umano 229E (HCoV-229E)⁶.

Attualmente sono noti due distinti genotipi di CCoV, classificati in base alle correlazioni genetiche con i coronavirus felini: CCoV tipo I è geneticamente correlato a FCoV tipo I, mentre CCoV tipo II (quello conosciuto da più tempo) è correlato a FCoV tipo II.

CCoV causa blande infezioni autolimitanti della mucosa intestinale, con sviluppo di sintomatologia gastroenterica caratterizzata da anoressia, diarrea di tipo mucoide e, talvolta, vomito¹⁸. Infezioni ad esito letale sono state descritte solo a seguito di infezioni miste, sostenute da CCoV ed altri patogeni, in particolare i virus. Infezioni sistemiche non sono mai state associate ad infezione da CCoV, sebbene il virus sia stato saltuariamente isolato da alcuni tessuti di cuccioli infettati sperimentalmente¹⁸.

Nella presente nota si riportano l'isolamento e la caratterizzazione di una variante pantropica di CCoV responsabile di una grave malattia sistemica ad esito letale in cuccioli di 6-8 settimane. Si precisa che tale nota costituisce una integrazione del lavoro¹ pubblicato sulla rivista “*Emerging Infectious Diseases*” dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta, USA.

MATERIALI E METODI

In maggio 2005, sette cuccioli di un *pet-shop* della Puglia sono morti a seguito di una malattia sistemica con segni clinici molto gravi. Le manifestazioni cliniche hanno riguardato dapprima tre pinscher nani di 45 giorni ed un cocker spaniel di 53 giorni ed erano rappresentate da letargia, febbre (39.5-40°C), disoressia, vomito incoercibile, diarrea emorragica. Tutti i cuccioli hanno presentato grave leucopenia, con particolare interessamento della componente linfocitaria. La morte è sopraggiunta due-tre giorni dopo l'insorgenza della sintomatologia ed è stata preceduta da manifestazioni neurologiche, quali atassia e convulsioni. Successivamente, sintomi analoghi sono stati osservati in altri due pinscher nani ed in un pechinese di 56 giorni, i quali dopo la morte sono stati portati presso i nostri laboratori per gli accertamenti del caso.

All'esame anatomico-patologico, lesioni di notevole gravità sono state evidenziate nei polmoni, fegato, milza e reni. I polmoni erano interessati da focolai di broncopolmonite nei lobi caudali e craniali (Foto 1, 2), mentre ampie

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 23/1/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 20/5/2006”.

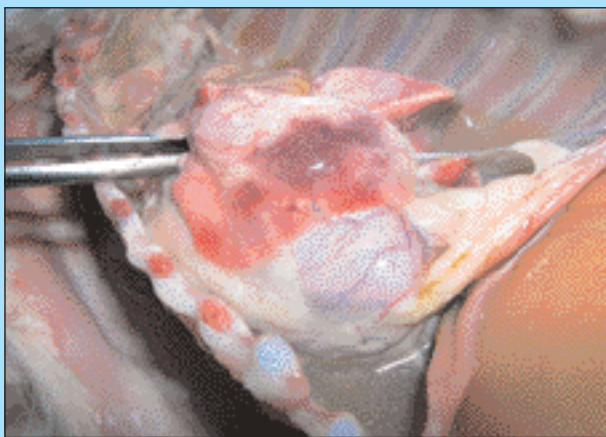


FOTO 1 - Pinscher nano, cavità toracica: focolai di polmonite con versamento pleurico.

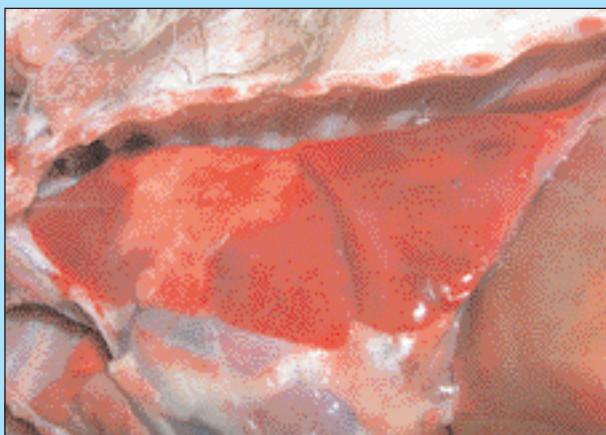


FOTO 2 - Pechinese, polmoni: estese aree di polmonite nei lobi craniali e caudali.



FOTO 3 - Pinscher nano, fegato: steatonecrosi ed emorragie.

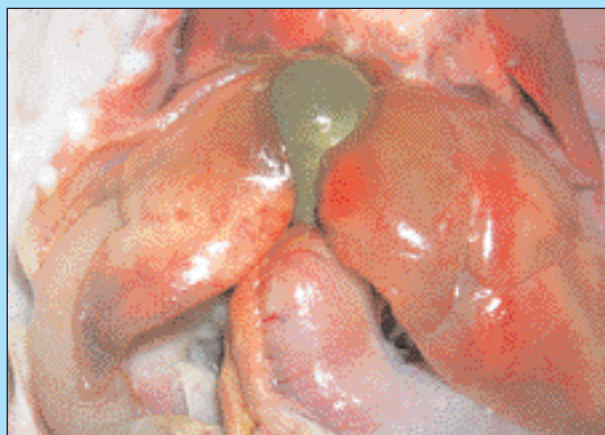


FOTO 4 - Pechinese, fegato: aree di degenerazione ed emorragie diffuse.

aree di degenerazione sono state evidenziate nel fegato (Foto 3, 4) e nella milza (Foto 5). Aree infartuali erano presenti nel parenchima renale (Foto 6). Nei linfonodi erano presenti numerose emorragie (Foto 7).

Campioni di cervello, polmoni, fegato, milza, reni, linfonodi mesenterici ed intestino sono stati analizzati per la ricerca dei più comuni agenti patogeni del cane, quali *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Leptospira interrogans*⁸, reovirus^{2,13}, rotavirus⁷, calicivirus^{10,15}, parvovirus del cane³, adenovirus del cane¹¹, virus del cimurro¹⁷, herpesvirus del cane¹⁶, coronavirus del cane⁵. L'RNA virale è stato estratto da tutti i campioni d'organo mediante kit commerciale (QIAamp® RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germania), seguendo le istruzioni della casa produttrice, ed è stato utilizzato in test real-time RT-PCR specifici per la ricerca dell'acido nucleico di CCoV tipo I e CCoV tipo II⁴.

Il contenuto intestinale ed i campioni d'organo dei cuccioli deceduti sono stati omogenati in terreno minimo essenziale di Dulbecco (D-MEM), trattati con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomicina, 10 µg/ml anfotericina), centrifugati a 4000 x g per 20 min a +4°C.

I surnatanti sono stati utilizzati per inoculare cellule di fibroma di cane A-72, sviluppate in D-MEM con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino (SFB). Le cellule inoculate sono state osservate quotidianamente per l'eventuale com-

parsa di effetto citopatico (ecp) e, dopo 5 giorni di incubazione a 37°C in atmosfera modificata contenente il 5% di CO₂, sono state sottoposte a 3 cicli di congelamento e scongelamento ed i criolisati sono stati utilizzati per inoculare nuovi monostrati cellulari. Dopo tre passaggi seriali, le cellule inoculate sono state testate in immunofluorescenza indiretta (IFI) per CCoV, utilizzando un anticorpo monoclonale (MAb) (gentilmente fornito da G. Chappuis, Merial, Francia) ed un siero di capra anti-IgG di topo coniugato con isotiocianato di fluoresceina (Sigma-Aldrich, Milano).

L'immunoistochimica sulle sezioni d'organo ottenute è stata effettuata utilizzando lo stesso MAb del test IFI ed un siero di capra anti-IgG di topo coniugato con perossidasi (Sigma-Aldrich).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le prove di identificazione diretta non hanno evidenziato la presenza dei più comuni agenti patogeni del cane nell'intestino e negli organi interni dei cuccioli morti.

Le metodiche real-time RT-PCR genotipo-specifiche eseguite sul contenuto intestinale hanno evidenziato l'acido nucleico di entrambi i genotipi CCoV. Inaspettatamente, l'RNA di CCoV tipo II è stato anche identificato negli organi di

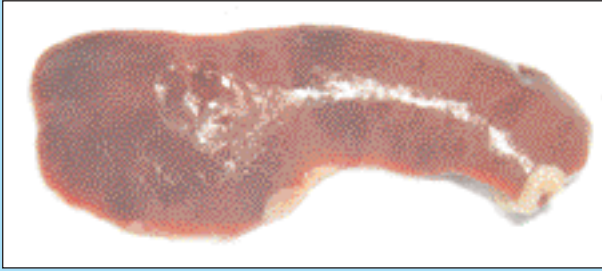


FOTO 5 - Pechinese, milza: splenomegalia ed aree di degenerazione con ematomi sottocapsulari.

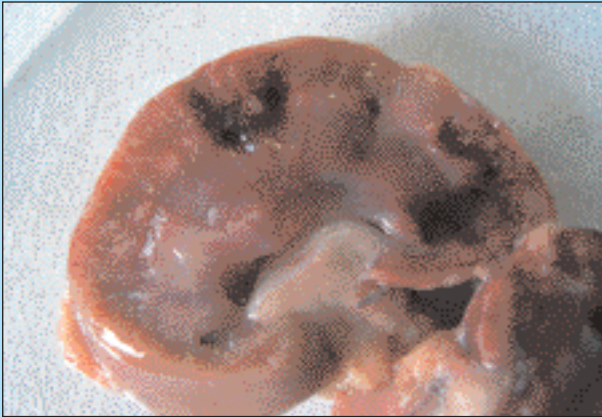


FOTO 6 - Pechinese, rene: soffiusioni emorragiche ed aree infartuali.



FOTO 7 - Pinscher nano, linfonodo mesenterico: linfadenite emorragica.

tutti i cuccioli morti, tra cui polmoni (titolo mediano di 1.08×10^6 copie di RNA/ μ l di templato), milza (4.46×10^6 copie di RNA/ μ l di templato), fegato (9.02×10^4 copie di RNA/ μ l di templato), reni (7.54×10^4 copie di RNA/ μ l di templato) e cervello (5.23×10^3 copie di RNA/ μ l di templato).

Le cellule A-72 inoculate con gli omogenati d'organo hanno mostrato il caratteristico effetto citopatico causato da CCoV già al primo passaggio. L'isolamento di uno stipe CCoV tipo II (denominato CB/05) è stato confermato sia dal test IFI, che dalla real-time PCR genotipo-specifica effettuata sul criolisato delle colture infette. Il virus è stato isolato da tutti gli organi inoculati ad eccezione del cervello, probabilmente a causa dei bassi titoli virali osservati in real-time PCR.

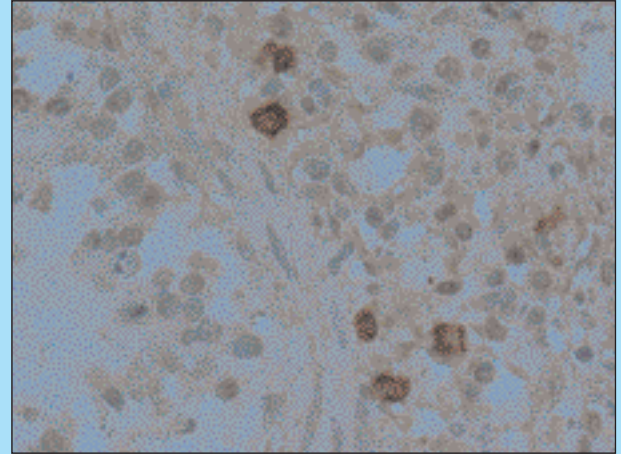


FOTO 8 - Immunoistochimica su sezione di polmone con anticorpi monoclonali per CCoV: la colorazione marrone indica la presenza degli antigeni virali.

Mediante immunoistochimica, è stato possibile evidenziare gli antigeni di CCoV in tutti gli organi esaminati e, in particolare, nei polmoni (Foto 8).

Il grave episodio di malattia descritto nella presente nota merita di essere valutato con estrema attenzione per una serie di ragioni. Ancora una volta la biologia dei coronavirus incuriosisce e stupisce gli addetti ai lavori per gli improvvisi e imprevedibili cambiamenti comportamentali.

Il TGEV del suino, perdendo 200 aminoacidi della glicoproteina S, non è più in grado di replicare nell'intestino, ma determina una patologia respiratoria e viene pertanto rietichettato come PRCoV¹².

I coronavirus felini, a spiccato tropismo enterico, se subiscono mutazioni della glicoproteina S e delezioni in altri geni (3c e 7b), acquisiscono la capacità di infettare i macrofagi e di causare la grave forma clinica nota come peritonite infettiva felina¹⁹.

Il virus della SARS dell'uomo, derivato dal virus dello zibetto, sembra che abbia acquisito il potere patogeno per l'uomo dopo aver perso "solo" 29 nucleotidi⁹.

Anche il coronavirus del cane ha attuato la sua rivoluzione pato-biologica: da virus spiccatamente enterico e scarsamente, o per niente, virulento si è trasformato in un virus con capacità di diffusione in tutti i distretti dell'organismo e con caratteri di elevata patogenicità.

L'altro aspetto che merita di essere sottolineato è rappresentato dal fatto che ci troviamo di fronte ad una "nuova" malattia del cane, potenzialmente letale, i cui aspetti clinici e diagnostici devono essere rapidamente acquisiti dai veterinari. In effetti, l'evoluzione clinica dell'infezione sostenuta dalla variante pantropica di CCoV risulta essere molto grave e, per alcuni versi, può essere confusa con l'infezione da parvovirus: il vomito, la diarrea emorragica, la leucopenia/linfopenia sono comuni ad entrambe le malattie. Le lesioni anatomico-patologiche (la necrosi epatica, le emorragie linfonodali e spleniche, l'enterite e la polmonite) sono invece molto simili a quelle riscontrabili in soggetti deceduti per infezione da adenovirus del cane tipo 1 (epatite infettiva).

I gravi sintomi clinici gastroenterici, le estese lesioni in tutti gli organi, la marcata leucopenia e le caratteristiche del patogeno responsabile conferiscono alla patologia osservata una così specifica peculiarità, da poter proporre di

etichettarla come "canine acute lymphopenic gastroenteric (CALG) syndrome".

Ricerche future dovranno chiarire i meccanismi molecolari responsabili del cambiamento del tropismo tissutale del virus e, parallelamente, gli aspetti patogenetici e immunologici di questa infezione.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa collaborazione i liberi professionisti dott. Vincenzo Salamina e dott.ssa Ortensia Capurso. Il presente lavoro è stato in parte realizzato con i fondi PRIN 2005 del MIUR, progetto "Il coronavirus del cane: aspetti molecolari e patogenetici".

Parole chiave

Cane, coronavirus pantropico, mortalità.

Key words

Dog, pantropic coronavirus, mortality.

Bibliografia

1. Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, et al.: A pantropic variant of canine coronavirus is highly pathogenic for dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 492-494, 2006.
2. Decaro N, Campolo M, Desario C, et al.: Virological and molecular characterization of a Mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet. Microbiol.* 109: 19-27, 2005.
3. Decaro N, Elia G, Martella V, et al.: A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105: 19-28, 2005.
4. Decaro N, Martella V, Ricci D, et al.: Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *J. Virol. Methods* 130: 72-78, 2005.
5. Decaro N, Pratelli A, Campolo M, et al.: Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J. Virol. Methods* 119: 145-150, 2004.
6. Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, et al.: Coronaviridae. In: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eds. MHV van Regenmortel, CM Fauquet, et al. Academic Press, New York, 2000, pp 835-849.
7. Gouvea V, Santos N, Timenetsky M do C: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1338-1340, 1994.
8. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, et al.: Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1691-1700, 1993.
9. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al.: Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302: 276-278, 2003.
10. Hashimoto M, Roerink F, Tohya Y, et al.: Genetic analysis of the RNA polymerase gene of caliciviruses from dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 603-608, 1999.
11. Hu RL, Huang G, Qiu W, et al.: Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commun.* 25: 77-84, 2001.
12. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M: Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet. Res.* 24: 125-150, 1993.
13. Leary PL, Erker JC, Chalmers ML, et al.: Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the 13-encoding L1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1368-1375, 2002.
14. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al.: The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Scienceexpress*, May: 1-5, 2003.
15. Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, Buonavoglia C: Nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.* 105: 1-7, 2005.
16. Schulze C, Baumgartner W: Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. *Vet. Pathol.* 35: 209-217, 1998.
17. Shin Y-S, Mori T, Okita M, et al.: Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 439-445, 1995.
18. Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, et al.: Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.* 51: 11-18, 1991.
19. Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC: Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243:150-157, 1998.

PERCHÉ SCEGLIERE VET-MED-LAB?



**...TANTI
ARGOMENTI
PARLANO A
NOSTRO FAVORE!**

Qualità comprovata:
Accreditato secondo la DIN EN
ISO/EN 17025.

Competenza:
Tutte le sezioni sono guidate da
medici veterinari specializzati.

Esperienza:
Presenti da più di 10 anni in Germania,
siamo ora leader in Europa.

Consulenza:
Il nostro servizio di consulenza è lieto
di aiutarvi in ogni vostro dubbio.

LABORATORIO PER MEDICI VETERINARI

Vet-Med-Lab

Vet-Med-Lab
Divisione di IDEXX Laboratories Italia s.r.l.
Piazza S. Pio X, 2/1 - 31030 Cassier (TV)
Tel: 0422-670651 - Fax: 0422-670580
caka@vetmedlab.com - www.vetmedlab.com