

IMPIEGO DELLA REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) PER LA DIAGNOSI DI CIMURRO NEL CANE

F. CIRONE, M.S. LUCENTE, M. CAMPOLO, M. CAMERO, G. ELIA, V. MARTELLA,
N. DECARO, C. BUONAVOGLIA

Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali - Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari
Strada per Casamassima Km 3 - 70010 Valenzano (BA)

Riassunto

Vengono riportati i risultati degli esami diagnostici per il virus del cimurro (CDV) in campioni biologici prelevati da 17 cani. Sono stati utilizzati tamponi oculari e sangue intero di cani con sintomi clinici ($n = 9$) e cervello e milza di cani morti con sintomi neurologici ($n = 8$). Mediante RT-PCR tutti gli animali sono risultati positivi per CDV; mediante il test di immunofluorescenza con anticorpi monoclonali, sono risultati positivi tutti i soggetti morti e 5 su 9 soggetti vivi.

Summary

Results of canine distemper virus (CDV) diagnostic examination in 17 biological samples from dogs are reported. The samples included ocular swabs and whole blood samples collected from sick dogs ($n = 9$) and brain and spleen samples collected from dogs that died with neurological signs ($n = 8$). All animals resulted CDV positive by RT-PCR assays. An immunofluorescence assay using monoclonal antibodies detected CDV antigen in samples from all dead animals and from 5 out of 9 sick animals.

INTRODUZIONE

Il cimurro è una malattia infettiva del cane, ad esito spesso letale, caratterizzata da interessamento degli apparati gastro-enterico, respiratorio, nervoso, tegumentario (Foto 1, 2, 3). Oltre che nel cane, il cimurro è descritto anche nei carnivori selvatici (Montali et al., 1983; Zhang et al., 1983).

Il virus responsabile, canino distemper virus (CDV), appartiene alla famiglia *Paramixoviridae*, genere *Morbillivirus*, che comprende anche il virus della peste bovina (RV), il virus della peste dei piccoli ruminanti (PPRV), il virus del morbillo (MV), il virus del cimurro delle foche (*phocid distemper virus*) (PDV), ed alcuni virus dei cetacei, quali *dolphin morbillivirus* (DMV) e *porpoise morbillivirus* (PMV) (Barret et al., 1993; Taubenberger et al., 2000).

Il nucleocapside, a simmetria elicoidale, contiene RNA monocatenario non segmentato. Il virione è provvisto di envelope, dal quale si dipartono la proteina H, necessaria per il legame con i recettori della cellula e per la induzione degli anticorpi neutralizzanti, e la proteina F, responsabile della fusione del virione con le membrane cellulari (Lamb et al., 2000). Le altre proteine virali sono la M o di matrice, responsabile dell'ancoraggio dell'envelope al nucleocapside, la nucleoproteina (NP), associata al genoma virale, e due proteine non strutturali, la polimerasi L e la fosfoproteina P, che assumono un importante ruolo nella trascrizione

e replicazione del genoma virale (Lamb et al., 2000).

È riconosciuta l'esistenza di un solo sierotipo di CDV anche se sono noti numerosi biotipi, diversi sia per virulenza che per tropismo tissutale (Summers et al., 1984). I meccanismi patogenetici alla base delle manifestazioni cliniche e, in particolare, della neuropatologia sono tuttora poco conosciuti. La diagnosi di laboratorio può rappresentare un problema soprattutto se applicata su campioni biologici prelevati da animali ancora in vita. L'isolamento virale, seguito dal test di immunofluorescenza indiretta per l'identificazione degli antigeni virali nelle colture infette (Foto 4), risulta scarsamente attendibile. È ben noto, infatti, che CDV non è facilmente isolabile su colture cellulari (Barrett, 1999) e che, in presenza dei sintomi nervosi, il virus può non essere più presente nei distretti mucosali in quantità facilmente svelabile.

È quindi fondamentale avere a disposizione test diagnostici molto sensibili e specifici, quale la *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR), in modo da poter confermare il sospetto clinico di infezione da CDV (Frisk et al., 1999).

Nella presente nota vengono riportati i risultati degli esami diagnostici per CDV eseguiti con il test RT-PCR su campioni prelevati da cani con sintomi clinici riferibili a cimurro.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 17 cani con manifestazioni cliniche riferibili a cimurro, quali ipertermia, gastroenterite, bronchite, congiuntivite, sintomi nervosi, ecc.



FOTO 1 - Cucciolo con infezione da CDV: congiuntivite mucopurulenta.



FOTO 2 - Cucciolo con infezione da CDV: ipercheratosi del cuscinetto plantare.



FOTO 3 - Cucciolo con infezione da CDV: ipoplasia dello smalto.

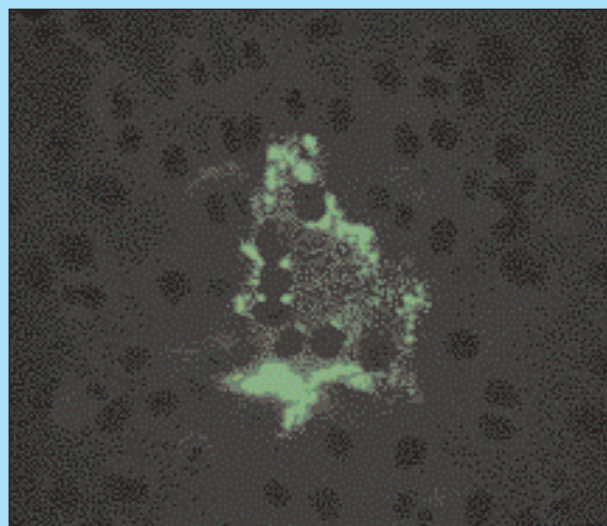


FOTO 4 - IFI. Cellule Vero infette con CDV: sincizio con fluorescenza citoplasmatica.

Come riportato nella Tabella 1, 13 soggetti erano cuccioli di 3-4 mesi di età e 4 erano adulti di età compresa tra 1 e 7 anni. Dei 13 cuccioli (di cui 3 importati da Paesi dell'Est Europa), 9 erano animali in vita con sintomi respiratori e/o neurologici e 4 erano deceduti presentando sintomatologia nervosa. I 4 cani adulti erano morti presentando solo sintomi neurologici. Dei 17 soggetti esaminati, solo 4 (2 cuccioli e 2 adulti) risultavano sicuramente vaccinati per CDV.

Per le prove virologiche, dagli animali in vita sono stati prelevati tamponi oculari e sangue intero, mentre dagli animali morti sono stati prelevati campioni di cervello e milza. I tamponi oculari ed il tessuto nervoso sono stati utilizzati per l'allestimento di strisci su vetrini da sottoporre a test di immunofluorescenza indiretta (IFI) e per le prove di RT-PCR. I campioni di sangue e di milza sono stati impiegati esclusivamente per le prove di RT-PCR.

Test IFI

Gli strisci dei tamponi oculari e del cervello sono stati fissati per 30 minuti in acetone a -20°C e poi sottoposti al test IFI utilizzando un anticorpo monoclonale per la NP di CDV, gentilmente fornito dal Dr Chappuis (Merial-Francia), e anti-IgG di topo marcate (SIGMA Aldrich).

Sono stati considerati positivi i campioni in cui era presente la tipica fluorescenza.

RT-PCR

L'estrazione dell'acido nucleico virale dai campioni è stata effettuata con i seguenti kit: *Viral RNA Mini Kit* (tamponi oculari), *RNA Blood Mini Kit* (sangue) e *Rneasy Mini Kit* (tessuti). I kit di estrazione sono commercializzati dalla ditta Qiagen GmbH, Hilden, Germania.

Gli estratti sono stati sottoposti a retrotrascrizione (RT) utilizzando il kit *GeneAmp RNA PCR* (Applied Biosystems, Applera Italia, Monza) e la coppia di primers p1/p2 (Tab. 2) (Frisk et al., 1999), in grado di amplificare un frammento del gene della NP di CDV di 287 bp. Le condizioni termiche utilizzate sono state: RT a 42°C per 30

Tabella 1
Cani sottoposti a test diagnostici per CDV

Animali	Età	Vivi	Morti	Sintomi generali	Sintomi nervosi
13	3-4 mesi	9	4	7	6
4	Adulti	0	4	0	4
17		9	8	7	10

Tabella 2
Primers utilizzati per la RT-PCR (Frisk et al., 1999)

Primer	Sequenza 5' 3'	Posizione	Amplificato
p1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	769-789	287 bp
p2	CAAGATAACCATGTACGGTGC	1055-1035	

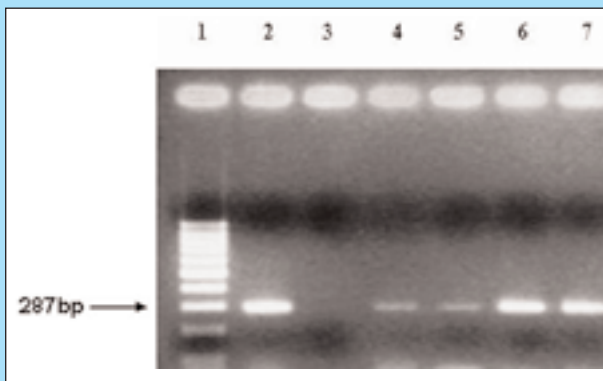


FOTO 5 - RT-PCR per CDV effettuata sui campioni di cani. Linea 1: marker GeneRuler 100 bp Ladder (MBI Fermentas GMBH, Germania); linea 2: controllo positivo (CDV ceppo Onderstepoort); linea 3: controllo negativo (milza di cane negativo per CDV); linea 4: tampone oculare; linea 5: sangue; linea 6: cervello; linea 7: milza.

min, inattivazione della *MuLV Reverse Transcriptase* a 99 °C per 5 min, attivazione dell'*Amplitaq Gold DNA Polymerase* a 94 °C per 10 min, 45 cicli di 94 °C per 1 min (denaturazione), 60 °C per 1 min (annealing), 72 °C per 1 min (polimerizzazione), seguiti da una estensione finale a 72 °C per 10 min. Aliquote (8 µl) dei prodotti RT-PCR sono state analizzate mediante corsa elettroforetica a 60 V per 90 min e visualizzate al transilluminatore UV dopo colorazione con etidio bromuro (Foto 5). Parallelamente ai campioni da testare, sono stati processati (dalla fase di estrazione alla visualizzazione al transilluminatore) un controllo positivo, rappresentato dallo stipite vaccinale Onderstepoort, ed un controllo negativo, costituito da un campione di milza di cane negativo per CDV.

RISULTATI

I risultati degli esami effettuati hanno confermato che tutti i 17 cani con sintomatologia riferibile a cimurro erano infetti da CDV; tuttavia, sono state evidenziate alcune differenze in base alle metodiche utilizzate e, soprattutto, alla tipologia dei campioni analizzati.

Tabella 3
Risultati dei test IFI e RT-PCR per CDV effettuati sugli animali vivi

Animale	IFI O*	RT-PCR	
		O*	S**
1	+	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	+	+	+
5	-	+	-
6	+	+	+
7	+	+	-
8	-	+	+
9	+	+	+

*: Tampone oculare; **: Sangue.

Tabella 4
Risultati dei test IFI e RT-PCR per CDV effettuati sui campioni d'organo degli animali morti

Animale	IFI O*	RT-PCR	
		O*	S**
1	+	+	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	-
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+

*: Cervello; **: Milza.

Le prove eseguite sugli animali vivi hanno evidenziato positività al test RT-PCR in tutti i soggetti (9/9) per i tamponi oculari, e in 7 su 9 soggetti per i campioni di sangue (Tab. 3). Il test IFI sugli strisci dei tamponi oculari è risultato positivo in 5 soggetti su 9. Le prove eseguite sugli animali morti hanno evidenziato positività al test RT-PCR in tutti gli animali (8/8) per i campioni di cervello e in 6 soggetti su 8 per i campioni di milza (Tab. 4). Il test IFI su strisci di cervello è risultato positivo in tutti i soggetti (8/8).

CONCLUSIONI

Il cimurro del cane, nonostante l'impiego di vaccini specifici, rappresenta ancora oggi una seria minaccia sanitaria per i cuccioli (Decaro et al., 2002, 2004). Sono molteplici le ragioni che possono spiegare questa particolare situazione anche se, la qualità dei vaccini, intesa non tanto sul prodotto all'origine ma, piuttosto, sul vaccino in fase di conservazione, è da considerare un fattore primario.

Molto spesso, infatti, la catena del freddo non viene mantenuta per una serie di ragioni e il ceppo vaccinale CDV, particolarmente termolabile, può subire una riduzione del titolo, pregiudicando una ottimale risposta immunitaria del cucciolo vaccinato (Greene e Appel, 1990; Sagazio et al., 1998).

Altro aspetto di notevole significato è rappresentato dalla spiccata circolazione di CDV nella popolazione canina italiana. Numerosi episodi di cimurro, anche nel presente studio, sono stati osservati o in cuccioli importati dai paesi dell'Est Europa o in soggetti epidemiologicamente collegati ai cuccioli importati (osservazioni personali). L'importanza di questa riemergente infezione nel cane richiede, pertanto, notevoli sforzi da parte dei veterinari, degli allevatori e dei ricercatori finalizzati ad ottimizzare la profilassi e, soprattutto, gli aspetti diagnostici. È necessario sensibilizzare tutti gli addetti ai lavori sul ruolo ancora fondamentale della profilassi vaccinale nei confronti di CDV e sulla opportunità di utilizzare test diagnostici, quali la RT-PCR, dotati di elevata specificità e sensibilità.

Parole Chiave

Cimurro, diagnosi, immunofluorescenza, RT-PCR.

Key words

Canine distemper virus, diagnosis, immunofluorescence, RT-PCR.

Bibliografia

1. Montali RJ, Bartz CR, Teare JA et al: Clinical trials with canine distemper vaccines in exotic carnivores. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183: 1163-1167, 1983.
2. Zhang ZX, Gao SL, Xu YY, Chin ZQ: Survey and control of panda distemper. Anim. Husb. Vet. Med. 15(4): 3-7, 1983.
3. Barret T, Visser IKG, Mamaev L et al: Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. Virology 193: 1010-1012, 1993.
4. Taubenberger JK, Tsai MM, Atkin TJ et al: Molecular genetic evidence of a novel morbillivirus in a long-finned pilot whale (Globicephalus melas). Em Inf Dis 6: 42-45, 2000.
5. Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D et al: Family Paramyxoviridae. In: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Ed. by MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, et al. Academic Press, New York, 2000, pp.549-561.
6. Summers B, A., Greisen HA, Appel MJ: Canine distemper encephalomyelitis: variation whit virus strain. J Comp Pathol. 94: 65-75, 1984.
7. Barret T: Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. Vet Microbiol 69: 3-13, 1999.
8. Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgartner 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 37: 3634-43, 1999.
9. Decaro N, Elia G, Cirone F, Tinelli A, Bozzo G, Narcisi D, Aliberti A: Infezioni miste nel cane. Su un episodio di epatite infettiva e cimurro in un canile. Obiettivi e Documenti Veterinari Anno XIII, n. 1, 51-54, 2002.
10. Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, Pratielli A, Buonavoglia C: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. New Microbiol 27, 177-182, 2004.
11. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper. In: Infectious diseases of the dog and cat. Ed. by CE Greene. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1990, pp 226-241.
12. Sagazio P, Cavalli A, Buonavoglia D, et al: 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, 1998.

l'otologico prima^{di} scelta

MARCHIO REGISTRATO

● **Potente azione
antimicotica e
battericida su
gram + e gram -**

● **Basso rischio
di resistenza
e non ototossico**

● **Attività acaricida**

● **Azione rapida:
remissione dei
sintomi in soli
7 giorni**



Via M. Buonarroti, 23
Cologno Monzese - MI

JANSSEN
Divisione della Janssen-Cilag SpA