

Circolazione del coronavirus pantropico del cane in Italia

RIASSUNTO

Si riportano i risultati di un'indagine epidemiologica per coronavirus del cane (CCoV) pantropico in Italia. Sono stati analizzati campioni prelevati da 69 cuccioli di cane deceduti a seguito di sintomatologia acuta, di tipo sistemico, 7 dei quali hanno presentato positività per CCoV negli organi interni. Degli stipiti CCoV identificati negli organi, 6 sono stati caratterizzati come CCoV-IIa (potenzialmente pantropici) ed uno come CCoV-IIb (stipiti ricombinati con coronavirus del suino). La distribuzione dell'RNA virale negli organi è stata varia, con titoli generalmente bassi, e nessuno stipite pantropico è stato isolato su cellule. L'analisi di sequenza della estremità 5' del gene della proteina degli spikes ha dimostrato l'assenza di specifici marker genetici comuni a tutti i virus e l'esistenza di un'elevata correlazione genetica e filogenetica tra gli stipiti identificati nel presente studio ed i virus pantropici di riferimento (due italiani ed uno greco). I risultati dimostrano che CCoV pantropico circola in Italia e dovrebbe essere considerato in sede di diagnosi differenziale fra le patologie infettive acute a carattere sistemico.

INTRODUZIONE

I coronavirus (ordine *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*) sono virus di grandi dimensioni, con genoma ad RNA monocatenario a polarità positiva, generalmente associati a blande infezioni respiratorie o intestinali nei mammiferi e nei volatili¹. Attualmente la famiglia *Coronaviridae* è suddivisa in due sottofamiglie, *Coronavirinae* e *Torovirinae*, la prima delle quali comprende tre distinti generi, *Alpha-*, *Beta-* e *Gammacoronavirus*, corrispondenti ai vecchi gruppi antigenici². Il coronavirus del cane (CCoV) appartiene al genere *Alphacoronavirus* ed è stato incluso in un'unica specie virale, *Alphacoronavirus-1*, insieme al coronavirus del gatto (FCoV tipo I e tipo II) e ad alcuni coronavirus dei suini, quali il virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV) ed il coronavirus respiratorio del suino (PRCoV). I due terzi della porzione 5' dell'RNA genomico sono costituiti da due ORF parzialmente sovrapposte (ORF1a e ORF1b) che codificano per proteine non strutturali, tra le quali la RNA-polimerasi virale, mentre l'ultima parte del genoma codifica per proteine strutturali e non strutturali. Le proteine strutturali sono: la proteina degli spikes (S), la proteina transmembranaria (M), la piccola proteina di membrana (E), la proteina del nucleocapside (N). Sono inoltre noti diversi geni accessori (in numero e posizione variabili) che codificano per proteine non strutturali, la cui funzione è ancora sconosciuta¹.

Come altri coronavirus, CCoV è andato incontro a rapida evoluzione genetica e, negli ultimi anni, sono stati segnalati stipiti particolarmente patogeni o divergenti dal punto di vista genetico³. Attualmente sono noti due distinti genotipi del virus, CCoV tipo I (CCoV-I) e CCoV tipo II (CCoV-II), quest'ultimo conosciuto da più tempo⁴. Un'ulteriore conferma della spinta evolutiva dei coronavirus mediante ricombinazione genetica è stata offerta dall'identificazione di stipiti CCoV-II ricombinanti con TGEV a livello della estremità 5' del gene degli spikes. L'identificazione degli stipiti TGEV-like nel cane ha permesso la suddivisione del genotipo II in due sottotipi, CCoV-IIa e CCoV-IIb, i quali includono rispettivamente stipiti classici e stipiti TGEV-like⁵.

Sono stati messi a punto test molecolari per la identificazione dei due genotipi CCoV, i quali, frequentemente, sono ritrovati associati in cani con diarrea^{4,6}. CCoV-I non è stato adattato alla crescita in vitro e si differenzia dal genotipo II non solo per la maggiore correlazione con FCoV tipo I, ma anche per la presenza di un gene accessorio, denominato ORF3, tra le ORF 2 e 3a⁷.

CCoV causa blande infezioni autolimitanti della mucosa intestinale, con sviluppo di sintomatologia gastroenterica caratterizzata da anoressia, diarrea di tipo mucoide e, talvolta, vomito. Infezioni sistemiche non so-

**Nicola Decaro, Viviana Mari,
Rossana Sciarretta, Gabriella Elia,
Maria Stella Lucente, Eleonora Lorusso,
Vito Martella, Canio Buonavoglia**

Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia,
Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, Valenzano (BA)

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 18/04/2012 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 18/06/2012”.

no mai state associate ad infezione da CCoV, sebbene il virus sia stato saltuariamente isolato da alcuni tessuti di cuccioli infettati sperimentalmente⁸. Nel 2005 è stata segnalata una variante altamente patogena di CCoV, responsabile di una grave malattia sistemica ad esito letale in cuccioli di 6-8 settimane⁹. Dagli organi interni di questi cuccioli è stato isolato uno stipite CCoV-II (CB/05). L'analisi di sequenza della porzione 3' del genoma virale ha dimostrato un'elevata correlazione genetica con i classici stipiti CCoV-II a livello delle proteine strutturali, mentre la proteina non strutturale 3b è risultata eccezionalmente corta a causa della presenza di una delezione di 38 nucleotidi nel corrispondente gene accessorio¹⁰. Ulteriori focolai di infezione sono stati recentemente segnalati in Belgio, Francia¹¹, Grecia¹² ed Italia¹³. Nel presente studio si riportano i risultati della sorveglianza epidemiologica per CCoV pantropico in Italia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra il 2009 ed il 2011 sono stati esaminati 69 cuccioli di cane deceduti a seguito di sintomatologia sistemica caratterizzata da febbre, abbattimento, anoressia, enterite, sintomi respiratori e/o turbe nervose. I cuccioli provenivano da canili, allevamenti, cliniche veterinarie private o universitarie di diverse regioni italiane, anche se la maggior parte di queste erano strutture situate in Puglia (Tabella 1). Dalle carcasse sono stati prelevati i seguenti campioni: tamponi rettali e/o intestino, polmoni, fegato, reni, milza, linfonodi, tonsille, timo ed altri tessuti. Quando possibile, è stata inviata ai nostri laboratori l'intera carcassa in condizioni di refrigerazione o congelamento. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, sono stati inviati frammenti di vari organi prelevati in maniera non omogenea.

TABELLA 1 Attività di campionamento per CCoV pantropico in Italia e stipiti identificati		
Regione	Numero di cani	Stipiti di CCoV pantropico
Puglia	37	4
Lazio	8	1
Piemonte	4	1
Campania	4	0
Abruzzo	5	0
Lombardia	5	0
Sicilia	6	0
Totale	69	6

Estrazione RNA

I campioni sono stati omogeneizzati (10% p/v) in terreno minimo essenziale di Dulbecco (DMEM) e successivamente centrifugati a 2.500 x g per 10 min. Centoquaranta microlitri del supernatante sono stati poi utilizzati per l'estrazione dell'RNA con il kit commerciale QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN S.p.A., Milano, Italia), seguendo il protocollo di estrazione. Gli estratti RNA sono stati incubati a -70°C fino al loro uso.

Identificazione, quantificazione e caratterizzazione molecolare di CCoV

Tutti gli estratti RNA sono stati sottoposti ad una real-time RT-PCR basata sulla chimica TaqMan per la rapida identificazione e quantificazione dell'RNA di CCoV¹⁴. Per la real-time RT-PCR è stato utilizzato il kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix (Invitrogen srl, Milano, Italia) e 50 µl della seguente mix: 25 µl di master mix, 300 nM di ciascun primer, 200 nM di sonda CCoV-Pb (Tabella 2) e 10 µl di estratto RNA.

Diluizioni in scala logaritmica dell'RNA standard, rappresentato da trascritti in vitro del gene M di CCoV, sono state analizzate simultaneamente per ottenere una curva standard utile per la quantificazione assoluta¹⁴. Il protocollo termico era rappresentato da incubazione con UDG a 50°C per 2 min, attivazione della Platinum Taq DNA polimerase a 95°C per 2 min, seguita da 45 cicli di denaturazione a 95°C per 15 sec, appaiamento a 48°C per 30 sec ed estensione a 60°C per 30 sec.

I campioni positivi sono stati caratterizzati per mezzo di due test genotipo-specifici⁶ utilizzando Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen srl) e oligonucleotidi specifici per CCoV-I e CCoV-II (Tabella 2). Il protocollo termico era analogo a quello descritto per l'analisi di CCoV, ad eccezione che per le temperature di annealing (53°C e 48°C per CCoV-I e CCoV-II, rispettivamente).

La sottotipizzazione di CCoV è stata realizzata mediante due test di RT-PCR convenzionale¹⁵ utilizzando il kit SuperScript One-Step™ RT-PCR for Long Templates (Invitrogen srl), secondo il protocollo indicato dalla casa produttrice. I primer sottotipo-specifici utilizzati sono elencati in Tabella 2. Il file termico è stato il seguente: trascrizione inversa a 50 °C per 30 min, inattivazione della Superscript II RT a 94 °C per 2 min, 40 cicli a 94 °C per 30 sec, 55 °C per 30 sec, 68 °C per 30 sec, con una estensione finale a 68 °C per 10 min. I prodotti di RT-PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5% e visualizzazione ai raggi UV dopo colorazione con etidio bromuro.

L'eventuale presenza di delezioni nei geni accessori 3abc è stata ricercata mediante un protocollo di RT-PCR che utilizza i primer VNVF/VNVR che si legano a ponte tra le ORF 3a e 3c (Tabella 2).

Analisi di sequenza e filogenesi

Per valutare le correlazioni genetiche esistenti tra gli stipti di CCoV pantropico identificati nel corso del presente studio e stipti di riferimento, la regione 5' del gene S è stata amplificata utilizzando la coppia di primer 20179/S2¹⁰. I prodotti di RT-PCR ottenuti sono stati inviati per il sequenziamento alla ditta BaseClear B.V. (Leiden, Paesi Bassi). Le sequenze sono state editate a mano ed analizzate usando il software BioEdit¹⁶ e gli strumenti di analisi del NCBI (<http://www.ncbi.ac.uk>) e dell'EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

L'analisi filogenetica è stata condotta con il software Mega4.1 beta¹⁷. Gli alberi filogenetici basati su un frammento di 1478 nucleotidi dell'estremità 5' del gene S sono stati ottenuti usando il metodo della parsimonia, fornendo un supporto statistico mediante bootstrap 1000. Il coronavirus respiratorio del cane (CRCoV, genere *Betacoronavirus*) 240/05¹⁸ è stato usato come outgroup.

Isolamento virale

I campioni d'organo (o i tamponi rettali degli animali risultati positivi per CCoV negli organi interni) con titoli di RNA di CCoV superiori a 10⁴ copie per µl di templatato sono stati omogenizzati in terreno D-MEM, trattati con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomina, 10 µg/ml amfotericina) e 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 comparsa 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 criolisi 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).

Ricerca di altri patogeni

Sugli acidi nucleici (RNA o DNA) estratti con kit commerciali è stata effettuata la ricerca per altri agenti virali del cane, quali herpesvirus del cane tipo 1¹⁹, canine minute virus²⁰, reovirus²¹, rotavirus²², calicivirus²³, parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2)^{24,25}, adenovirus del cane tipo 1 e tipo 2²⁶, virus del cimurro²⁷ e CRCoV²⁸.

RISULTATI

Identificazione di stipti CCoV pantropici

L'RNA di CCoV è stato identificato in 12 campioni (17,39%) di intestino e/o tamponi rettali dei 69 analizzati, mentre in 7 animali (10,14%) la presenza del virus è stata dimostrata anche in uno o più tessuti extra-intestinali. Tre di questi cuccioli erano stati recentemente importati dall'Est Europa.

I 7 stipti identificati negli organi sono stati caratterizzati come CCoV-II mediante test di real-time RT-PCR genotipo-specifiche⁶. Invece, le prove di RT-PCR sottotipo-specifiche hanno caratterizzato uno stipte come CCoV-IIb (TGEV-like) ed i restanti 6 come CCoV-IIa⁵. A tale sottotipo appar-

TABELLA 2
Oligonucleotidi utilizzati per la identificazione e caratterizzazione degli stipti CCoV

Test	Primer/sonda	Riferimento	Sequenza (5'-3')	Polarità	Posizione	Dimensioni amplificato	Specificità
Real-time RT-PCR	CCoV-F CCoV-R CCoV-Pb	(6)	CGTTAGTGCACTTGAAGAAGCT	+	478-499 ^a	111 bp	CCoV-I
			ACCAGCCATTTAAATCCTTCA	-	567-588 ^a		
			FAM-CCTCTTGAAGGTACACCA-TAMRA	+	508-526 ^a		
Real-time RT-PCR	CCoV-F CCoV-R CCoV-Pb	(6)	TAGTGCACTTGAAGAAGCT	+	6878-6897 ^b	105 bp	CCoV-II
			AGCAATTTGAACCCCTTC	-	6966-6982 ^b		
			FAM-CCTCTTGAAGGTGTGCC-TAMRA	+	6906-6922 ^b		
RT-PCR	20179 INS-R-dg 174-268	(15)	GGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAG	+	320-345 ^b	758 bp	CCoV-I/II
			GCTGTAACATAKTCRTATTCCAC	-	12531-12556 ^c	(CCoV-IIa)	
			CAACATGTAACCTTTGTCTGTGATCTGC	-	1054-1077 ^b 13002-13029 ^c	499 bp (CCoV-IIb)	
RT-PCR	VNVF VNVR	Questo studio	ACTTGTGTGTATAGGTTTTGGTGA	+	5157-5180 ^b	530 bp	CCoV-I/II
			TAAGTGTCATTGATACAATCTTAAACA	-	5660-5686 ^b	(virus non deleti)	

^a La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza dello stipte CCoV-I 259/01 (numero di accesso GenBank AF502583).

^b La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza dello stipte CCoV-IIa Insavc-I (numero di accesso GenBank D13096).

^c La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza dello stipte CCoV-IIb 174/06 (numero di accesso GenBank EU856362). FAM, 6-carbossifluoresceina; TAMRA, 6-carbossitetrametilrodamina.

TABELLA 3

Dati anamnestici dei cuccioli positivi per CCoV pantropico e risultati delle indagini molecolari e virologiche

Numero di protocollo	Provenienza	Razza	Età	Sintomi	Lesioni anatomo-patologiche	Presenza di CCoV-II in organi interni	Isolamento culturale di CCoV ^a	Altri patogeni	Note
98/09-A	Allevamento, Puglia	Barboncino nano	2,5 mesi	Febbre (40,4°C), abbattimento, anoressia, diarrea emorragica, sintomi respiratori	Enterite emorragica, linfadenomegalia, splenomegalia, polmonite	Positivo	Negativo	CPV-2a	Importato da Romania
98/09-B	Allevamento, Puglia	Barboncino nano	2,5 mesi	Febbre (40,1°C), abbattimento, anoressia, diarrea	Enterite emorragica, linfadenomegalia, splenomegalia, degenerazione epatica e renale	Positivo	Non effettuato	CPV-2a	Importato da Romania
69/10	Allevamento, Puglia	Labrador retriever	2 mesi	Abbattimento, anoressia, disidratazione, diarrea, sintomi respiratori	Enterite emorragica, linfadenomegalia, splenomegalia, polmonite, laringotracheite	Positivo	Non effettuato	CPV-2c, CRCoV	Nessuna
109/10	Clinica veterinaria, Piemonte	Meticcio	2,5 mesi	Febbre (39,8°C), abbattimento, vomito, diarrea, sintomi respiratori	Enterite, aumento di volume ed aree di necrosi in linfonodi e milza, polmonite	Positivo	Negativo	CPV-2c	Nessuna
120/10	Clinica veterinaria, Lazio	Carlino	3,5 mesi	Abbattimento, anoressia, vomito, diarrea con tracce di sangue, segni neurologici	Enterite, linfadenomegalia, splenomegalia, necrosi epatica, polmonite, congestione delle meningi	Positivo	Negativo	CPV-2a	Importato da Ungheria
185/11	Pet shop, Puglia	Chihuahua	2 mesi	Abbattimento, anoressia, vomito, diarrea, sintomi respiratori	Enterite, linfadenomegalia, necrosi epatica, polmonite	Positivo	Non effettuato	Nessuno	Nessuna

^a Le prove di isolamento sono state effettuate solo sui campioni con titolo di RNA virale superiore a 10^4 copie μL^{-1} di template, calcolato mediante real-time RT-PCR.

tengono gli altri stipiti pantropici dei quali sono disponibili i dati di sequenza^{10,12,13}. La sintomatologia clinica e le lesioni anatomo-patologiche osservate in tali soggetti sono riportati nella Tabella 3. Le Fi-

gure 1-4 riportano le lesioni anatomo-patologiche osservate in alcuni cuccioli positivi per CCoV pantropico. I titoli di RNA virale nei tessuti extra-intestinali erano compresi tra $1,25 \times 10^1$ (fegato del cucciolo 120/10) e $7,01 \times 10^4$ (milza del cucciolo 109/10) μL^{-1} di estratto RNA (Tabella 4).

Le prove di isolamento su cellule, effettuate partendo dai campioni d'organo risultati positivi per CCoV-IIa e contenenti elevati titoli virali, non hanno avuto successo, considerando sia la mancata comparsa di ECP specifico nei monostrati inoculati, sia la negatività del test IFI con anticorpi specifici.

Caratterizzazione genetica degli stipiti di CCoV pantropico

Nessuno degli stipiti CCoV-IIa identificati negli organi (pantropici) ha presentato delezioni a livello del gruppo di geni accessori 3abc, contrariamente a quanto riportato per gli stipiti italiani CB/05¹⁰ e 450/07¹³, ma analogamente al virus greco NA/09¹². L'analisi di sequenza della regione 5' del gene S ha dimostrato che gli stipiti CCoV pantropici non possiedono chiari ed univoci marker di patogenicità, come invece era stato inizialmente



FIGURA 1 - Cucciolo 98/09-A. Necrosi epatica con emorragie.

ipotizzato¹⁰. La stessa mutazione D125N, inizialmente identificata come possibile marker degli stipiti pantropici¹⁰, è stata riscontrata in 3 dei 6 stipiti identificati nel presente studio ed in 5 dei 9 stipiti pantropici di cui sono attualmente note le sequenze.

Tutti gli stipiti pantropici di questo studio sono risultati essere strettamente correlati tra di loro e con gli stipiti italiani CB/05 e 450/07, nonché con quello greco NA/09 (Tabella 5). Le percentuali di identità nucleotidica tra gli stipiti identificati nel corso del presente studio erano comprese tra il 94,7% ed il 99,7%, mentre le identità nei confronti del virus prototipo CB/05 variavano dal 95,8% (stipite 109/10) al 98,8% (stipite 98/09-A) e quelle nei confronti dello stipite greco NA/09 variavano dal 96,2% (109/10) al 99,1% (185/11).

Mediante analisi filogenetica, tutti gli stipiti pantropici identificati nell'ambito del presente studio sono stati inclusi in un unico cluster monofiletico all'interno dei virus di sottotipo IIa, insieme ai prototipi italiani e greco (Fig. 5).

Identificazione di altri patogeni virali del cane

Le analisi molecolari condotte sui tamponi rettali e sui campioni d'organo dei cuccioli infetti da CCoV pantropico hanno evidenziato la simultanea presenza di altri patogeni di natura virale in tutti gli animali ad eccezione di uno (cucciolo 185/11). In particolare, nelle carcasse di 5 cuccioli sono stati identificati stipiti CPV-2a o CPV-2c, mentre, nei polmoni di un soggetto (69/10) era presente come terzo patogeno anche CRCoV (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Stipiti CCoV virulenti sono stati descritti ripetutamente negli ultimi decenni^{2,3}, anche se solo nel 2006 è stato riportato per la prima volta un focolaio di infezione sistemica, ad esito letale, causato da uno stipite CCoV, il quale è stato denominato pantropico⁹. Ulteriori focolai di malattia sono stati segnalati in Francia, Belgio¹¹, Grecia¹² ed Italia¹³. L'indagine oggetto del presente studio ha permesso di accertare la presenza di possibili stipiti CCoV pantropici in 6 su 69 cuccioli, che, prima di morire, avevano presentato sintomi sistemici. Tuttavia, l'identificazione in 5 di questi soggetti delle varianti antigeniche di CPV-2, nonché la contemporanea presenza in un cucciolo di uno stipite CRCoV, non permette di attribuire il decesso degli animali alla infezione da CCoV pantropico. Del resto, gli studi più recenti hanno dimostrato che CCoV pantropico, generalmente, non causa la morte degli animali infetti e può anche determinare infezioni a decorso subclinico, ma è, comunque, in grado di indurre un quadro generalizzato di leucopenia, con diminuzione persistente di tutte le



FIGURA 2 - Cucciolo 98/09-B. Grave necrosi epatica.



FIGURA 3 - Cucciolo 98/09-B. Emorragie e necrosi in sede renale.

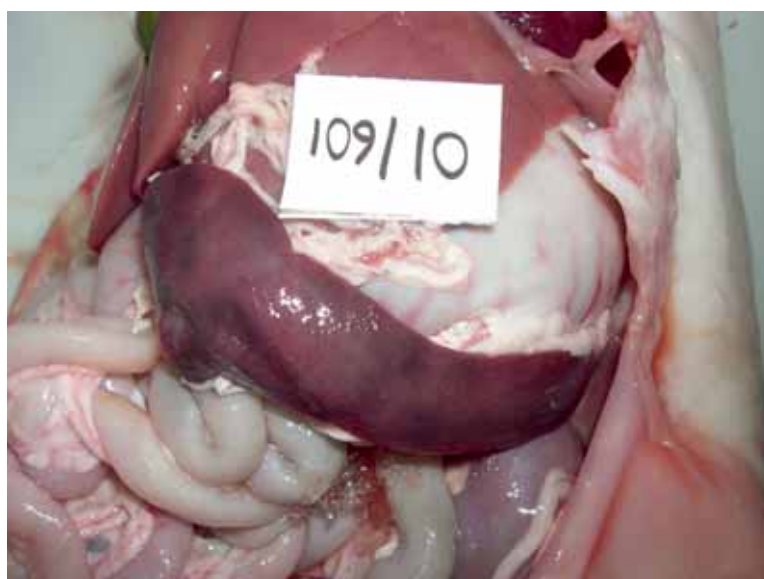


FIGURA 4 - Cucciolo 109/10. Splenomegalia con ematomi sottocapsulari.

TABELLA 4
Copie di RNA di CCoV-II μL^{-1} di templato nei campioni dei cuccioli positivi per CCoV pantropico

Campioni	N. Prot.					
	98/09-A	98/09-B	69/10	109/10	120/10	185/11
Tampone rettale	$5,70 \times 10^6$	$2,13 \times 10^4$	Non testato	Non testato	$7,43 \times 10^6$	$6,45 \times 10^3$
Polmoni	Negativo	Negativo	$9,88 \times 10^2$	$5,03 \times 10^2$	$1,57 \times 10^4$	Negativo
Rene	Non testato	Non testato	$1,85 \times 10^2$	$7,01 \times 10^4$	$2,53 \times 10^1$	$2,66 \times 10^1$
Milza	$4,43 \times 10^1$	$3,02 \times 10^1$	$4,16 \times 10^2$	$3,75 \times 10^2$	$1,09 \times 10^2$	$3,04 \times 10^1$
Fegato	Negativo	$2,98 \times 10^1$	Negativo	Non testato	$1,25 \times 10^1$	$3,45 \times 10^3$
Pancreas	Non testato	Non testato	$2,47 \times 10^2$	Non testato	Non testato	Non testato
Intestino tenue	Non testato	Non testato	$3,69 \times 10^3$	Non testato	Non testato	Non testato
Linfonodo mesenterico	Non testato	Non testato	$2,09 \times 10^1$	Non testato	$9,47 \times 10^3$	$1,08 \times 10^5$
Tonsille	Non testato	Non testato	$4,01 \times 10^2$	Non testato	$4,80 \times 10^2$	Non testato
Timo	Non testato	Non testato	$1,16 \times 10^2$	Non testato	$4,13 \times 10^3$	Non testato
Vescica	Non testato	Non testato	$2,57 \times 10^4$	Non testato	$7,70 \times 10^2$	Non testato
Cuore	Non testato	Non testato	$6,55 \times 10^1$	Non testato	$4,13 \times 10^2$	Non testato
Cervello	Non testato	Non testato	Non testato	Non testato	$5,26 \times 10^1$	Non testato

TABELLA 5
Identità nucleotidica degli stipiti di CCoV pantropico (in grassetto) rispetto a coronavirus canini e felini di referenza

Numero GenBank	Virus	CB/05	450/07	NA/09	98/09-A	98/09-B	69/10	109/10	120/10	185/11	INSAVC	BGF10	341/05	174/06	430/07	119/08	23/03	Black	79-1146
DQ112226	CCoVIIa-CB/05	ID	99,5	97,2	98,8	98,5	97,6	95,8	96,5	97,6	85,1	84,6	65	63,2	63,8	64,6	44,3	43	90,4
GU146061	CCoVIIa-450/07	99,5	ID	97,2	98,9	98,7	97,7	95,9	96,5	97,7	85,1	84,7	65,1	63,4	63,9	64,8	44,5	43	90,4
JF682842	CCoV-IIa-NA/09	97,2	97,2	ID	97,6	97,4	97,1	96,2	97,9	99,1	84,9	84,3	64,4	63	63,4	64,1	44,5	42,9	89,8
JQ929041	98/09-A	98,8	98,9	97,6	ID	99,7	98,2	95,6	97	98,2	85,1	84,7	65,1	63,4	63,9	64,8	44,3	43	90,3
JQ929042	98/09-B	98,5	98,7	97,4	99,7	ID	97,9	95,3	96,8	98	84,9	84,5	64,8	63,2	63,7	64,5	44,1	42,9	90,1
JQ929043	69/10	97,6	97,7	97,1	98,2	97,9	ID	94,7	96,4	97,6	84,3	84	64,3	62,6	63	64	44	42,9	89,4
JQ929044	109/10	95,8	95,9	96,2	95,6	95,3	94,7	ID	95,6	96,5	84,7	84,7	64,4	62,8	63,1	64,2	44	41,8	89,9
JQ929045	120/10	96,5	96,5	97,9	97	96,8	96,4	95,6	ID	98,5	84,3	83,7	64,8	63	63,4	64,4	44,3	42,2	89,5
JQ929046	185/11	97,6	97,7	99,1	98,2	98	97,6	96,5	98,5	ID	84,9	84,5	64,6	62,9	63,4	64,2	44,7	42,7	90,1
D13096	CCoVIIa-INSAVC	85,1	85,1	84,9	85,1	84,9	84,3	84,7	84,3	84,9	ID	92	62,3	62,1	62,3	62,1	43,8	41,9	85,2
AY342160	CCoVIIa-BGF10	84,6	84,7	84,3	84,7	84,5	84	84,7	83,7	84,5	92	ID	61,9	61,1	61,5	61,6	43,3	42,2	84,4
EU856361	CCoVIIb-341/05	65	65,1	64,4	65,1	64,8	64,3	64,4	64,8	64,6	62,3	61,9	ID	89,3	90,2	98,9	41,9	40,7	63,1
EU856362	CCoVIIb-174/06	63,2	63,4	63	63,4	63,2	62,6	62,8	63	62,9	62,1	61,1	89,3	ID	96,5	89,5	42,9	40,3	62,4
EU924790	CCoVIIb-430/07	63,8	63,9	63,4	63,9	63,7	63	63,1	63,4	63,4	62,3	61,5	90,2	96,5	ID	90,5	42,6	40,3	62,5
EU924791	CCoVIIb-119/08	64,6	64,8	64,1	64,8	64,5	64	64,2	64,4	64,2	62,1	61,6	98,9	89,5	90,5	ID	41,8	40,8	62,8
AY307021	CCoVI-23/03	44,3	44,5	44,5	44,3	44,1	44	44	44,3	44,7	43,8	43,3	41,9	42,9	42,6	41,8	ID	63,2	42,7
EU186072	FCoVI-Black	43	43	42,9	43	42,9	42,9	41,8	42,2	42,7	41,9	42,2	40,7	40,3	40,3	40,8	63,2	ID	41,8
NC_007025	FCoVII-79-1146	90,4	90,4	89,8	90,3	90,1	89,4	89,9	89,5	90,1	85,2	84,4	63,1	62,4	62,5	62,8	42,7	41,8	ID

sottopopolazioni leucocitarie, in particolare dei linfociti T CD4²⁹.

La leucopenia potrebbe così favorire l'insorgenza o l'aggravarsi di altre patologie a carattere infettivo, con conseguente aumento della mortalità. Per questo motivo, l'infezione da CCoV pantropico

potrebbe passare inosservata e non essere correttamente diagnosticata, a meno che (come nei casi riportati nel presente articolo) non subentrino altri agenti patogeni, il cui decorso può essere irrimediabilmente aggravato dalla linfopenia preesistente indotta da CCoV pantropico.

Relativamente agli animali risultati positivi per CCoV pantropico, non erano disponibili i dati ematologici, o perché si trattava di animali ospitati presso canili e/o rifugi o perché i veterinari curanti non avevano effettuato esami specifici.

Le indagini molecolari hanno dimostrato che gli stipti italiani identificati negli scorsi anni, strettamente correlati dal punto di vista genetico, presentavano delezioni a livello dei geni gruppo specifici 3abc^{10,13}. Questo dato non è stato confermato né per lo stipte greco NA/09¹² né per i più recenti virus pantropici identificati nel presente studio, i quali non hanno neppure evidenziato marker genetici univoci. Tuttavia, alcuni di essi hanno mostrato la mutazione D125N, inizialmente segnalata come possibile marker dell'attitudine pantropica¹⁰.

Al momento non esistono test diagnostici in grado di differenziare gli stipti CCoV-IIa enterici dai pantropici, poiché questi sono strettamente correlati dal punto di vista genetico ed antigenico. L'unica possibilità di identificazione per gli stipti pantropici è legata al ritrovamento del virus nei tessuti extra-intestinali. Pur considerando la disomogeneità del campionamento (non tutti i tessuti di tutti i cani sono stati adeguatamente prelevati), va evidenziato che nella maggior parte degli organi positivi sono stati riscontrati titoli virali bassi, mentre alcuni tessuti (soprattutto non linfoidi) sono risultati del tutto negativi per CCoV. Questo dato potrebbe essere correlato ad un'infezione da CCoV in via di risoluzione, che, tuttavia, avrebbe creato le condizioni per un decorso clinico grave dell'infezione da CPV-2.

Un altro elemento da considerare è il mancato isolamento del virus nelle colture cellulari inoculate. L'isolamento è stato tentato solo da quei campioni con titoli virali superiori a 10^4 copie di RNA virale μL^{-1} di templato, poiché, in base alla nostra esperienza, non si riesce ad isolare il virus da campioni con titoli virali più bassi. Risultati negativi sono stati ottenuti anche da campioni con titoli virali elevati: in molti casi, tuttavia, i campioni erano pervenuti in non perfette condizioni di conservazione.

In conclusione, appare opportuno sensibilizzare i veterinari in merito alla circolazione di stipti di CCoV pantropico responsabili di quadri di leucopenia/linfopenia e sintomatologia sistemica, che, in alcune condizioni, possono anche determinare la morte degli animali infetti.

CCoV pantropico andrebbe pertanto inserito nell'algoritmo diagnostico dei patogeni associati a sintomatologia sistemica, insieme a CPV-2, virus del cimurro e virus dell'epatite infettiva. Questa informazione faciliterebbe anche la sorveglianza epidemiologica nei canili e negli allevamenti, ampliando di conseguenza le conoscenze sull'epidemiologia e sulla patogenesi di questo patogeno emergente del cane.

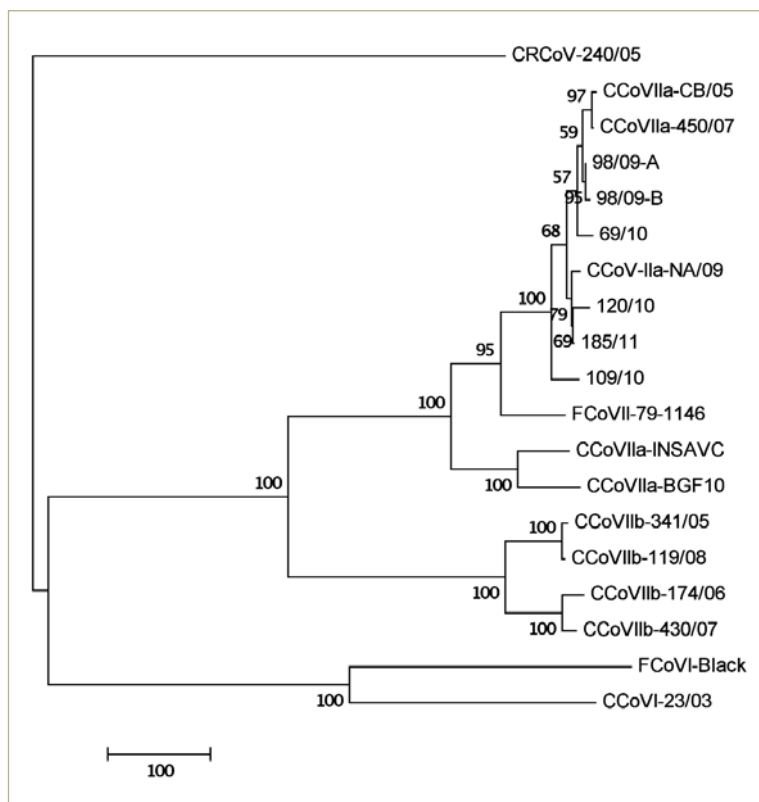


FIGURA 5 - Albero filogenetico ottenuto col metodo della massima parsimonia sull'estremità 5' (1478 nucleotidi) del gene S di stipti *Alphacoronavirus-1*. Per la costruzione dell'albero filogenetico sono state utilizzate le sequenze degli alphacoronavirus elencati nella Tabella 5. Lo stipte di coronavirus respiratorio del cane 240/05 (Decaro et al., 2007a, numero di accesso GenBank EU999954) è stato inserito come outgroup. Per ogni ceppo sono indicati i numeri di accesso in GenBank. La barra rappresenta il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche per sito; i valori di bootstrap sono stati calcolati e sono indicati in corrispondenza di ciascun nodo.

RINGRAZIAMENTI

L'attività di ricerca è stata supportata dalla Pfizer Animal Health (Kalamazoo, USA) e dal MIUR, progetto PRIN 2008 "Evoluzione genetica e patogenetica dei coronavirus: il modello coronavirus del cane". Si ringraziano Donato Narcisi, Arturo Gentile e Carlo Armenise per la preziosa collaborazione tecnica.

Parole chiave

Cane; coronavirus pantropico; sorveglianza epidemiologica.

Italian surveillance for pantropic canine coronavirus

Summary

The results of an epidemiological survey for pantropic canine coronavirus (CCoV) in Italy are reported. Samples collected from 69 pups dead as a consequence of acute, systemic disease were analysed and 7 dogs tested positive for CCoV in

their internal organs. Six CCoV strains were characterised as CCoV-IIa (potentially pantropic CCoVs), whereas the remaining strain was sub-typed as CCoV-IIb (recombinant strains with swine coronavirus). Viral RNA distribution in internal organs was variable, with titres generally low, and no pantropic strain was isolated on cell cultures. Sequence analysis of the 5' end of the spike protein gene showed the absence of specific genetic markers and the existence of high ge-

netic and phylogenetic relatedness of the strains detected in the survey and prototype Italian and Greek viruses. The results of this survey demonstrate that pantropic CCoV is circulating in Italy, so that the virus should be enclosed in the diagnostic algorithm of the acute, systemic infectious diseases of the dog.

Key words

Dog; pantropic coronavirus; epidemiological surveillance.

BIBLIOGRAFIA

- 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. New York, Academic Press, 2000, pp 835-849.
- Decaro N, Buonavoglia C: Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim. Pract.* 38: 799-814, 2011.
- Decaro N, Buonavoglia C: An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol* 132: 221-234, 2008.
- Pratelli A, Decaro N, Tinelli A, et al: Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in fecal samples of dogs with diarrhea. *J Clin Microbiol* 42: 1797-1799, 2004.
- Decaro N, Mari V, Campolo M, et al: Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *J Virol* 83: 1532-1537, 2009.
- 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.
- Lorusso A, Decaro N, Schellen P, et al: Gain, preservation and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol* 82: 10312-10317, 2008.
- Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, et al: Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res Vet Sci* 51: 11-18, 1991.
- 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.
- Decaro N, Martella V, Elia G, et al: Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Res* 125: 54-60, 2007.
- Zicola A, Jolly S, Mathijs E, et al: Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J Small Anim Pract* doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01178.x, 2012.
- Ntafis V, Xylouri E, Mari V, et al: Molecular characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs. *Arch Virol* 157: 171-175, 2012.
- Decaro N, Mari V, von Reitzenstein M, et al: A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. *Vet Microbiol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.039>.
- 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.
- Decaro N, Mari V, Elia G, et al: Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg Infect Dis* 16: 41-47, 2010.
- Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98, 1999.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, et al: MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9: 299-306, 2008.
- Lorusso A, Desario C, Mari V, et al: Molecular characterization of a canine respiratory coronavirus strain detected in Italy. *Virus Res* 141: 96-100, 2009.
- Decaro N, Amorisco F, Desario C, et al: Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *J Virol Methods* 169: 176-180, 2010.
- Decaro N, Altamura M, Pratelli A, et al: Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection. *New Microbiol* 25: 291-298, 2002.
- Leary PL, Erker JC, Chalmers ML, et al: Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the 3'-encoding L1 gene. *J Clin Microbiol* 40: 1368-1375, 2002.
- Gouvea V, Santos N, Timenetsky M, et al: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 1338-1340, 1994.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83: 145-154, 1999.
- 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.
- Decaro N, Elia G, Martella V, et al: Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods* 133: 92-99, 2006.
- 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 (1): 77-84, 2001.
- Elia G, Decaro N, Martella V, et al: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 136: 171-176, 2006.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, et al: Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods* 151: 167-171, 2008.
- Marinaro M, Mari V, Bellacicco AL, et al: Prolonged depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs. *Virus Res* 152: 73-78, 2010.