

DIAGNOSI DI LABORATORIO DI CIMURRO DEL CANE MEDIANTE LA RICERCA DELLE IgM SPECIFICHE

FULVIO MARSILIO, PIETRO-GIORGIO TISCAR, O. PALUCCI, ANTONIO GATTI

*Istituto di Malattie Infettive degli Animali "M. Compagnucci"
Facoltà di Medicina Veterinaria
Località Piano d'Accio - Teramo*

RINA DI GIROLAMO

*Ambulatorio Veterinario "C. D'Antonio"
Via Gorizia, 50 - Alba Adriatica (TE)*

Riassunto

La diagnosi clinica del cimurro del cane spesso presenta delle difficoltà soprattutto nelle forme atipiche ed il ricorso al laboratorio diventa indispensabile. A tale proposito è stato allestito un test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca delle IgM anti-CDV nei sieri di cani e per valutare il potenziale diagnostico sono stati esaminati n° 20 sieri di animali vaccinati e n° 84 sieri di animali clinicamente sospetti infetti. I nostri dati confermano che le IgM compaiono nel siero dei cani sia infetti che vaccinati ma che in questi ultimi compaiono solo dopo la prima vaccinazione in assoluto e per un periodo di circa due mesi. Inoltre, i risultati sottolineano la capacità del test di diagnosticare un'infezione da virus del cimurro tramite il prelievo di un unico campione di sangue. La ricerca delle IgM è una valida e semplice alternativa per la diagnosi delle infezioni da virus del cimurro soprattutto nelle popolazioni di cani dove viene comunemente praticata la vaccinazione.

Summary

The clinical diagnosis of canine distemper is not easy mainly in the atypical forms and then it is necessary to appeal to the laboratory. An indirect immunofluorescent assay for the detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog serum is described. The diagnostic potential of this technique was evaluated by analyzing the sera from no. 20 vaccinated and no. 84 suspected infected dogs. Our data confirm the IgM presence in the sera of the infected and vaccinated dogs but in the latter the IgMs appear after the first vaccination only. Furthermore the results highlight the ability of the test to diagnose the disease by a single serum specimen only. The IgM test is an useful method for diagnosing canine distemper virus infections in a dog population where vaccination is commonly practiced.

INTRODUZIONE

Le infezioni virali del sistema nervoso centrale dei mammiferi costituiscono un gruppo di patologie di notevole importanza. Nel cane sono state descritte diverse encefalomeningiti sostenute da virus come la rabbia, la malattia di Aujeszky, il cimurro, l'herpesvirus, l'epatite infettiva del cane e le infezioni da virus parainfluenzale, bunyavirus, flavivirus e togavirus. Fra queste l'infezione sostenuta dal virus del cimurro (CDV) riveste un ruolo importante poiché è considerata una delle malattie infettive più temute ed attuali della specie canina.

L'infezione da CDV induce una risposta anticorpale specifica che spesso non può essere utilizzata per la diagnosi, in quanto la ricerca degli anticorpi tramite test quali la sieroneutralizzazione non è in grado di distinguere gli anticorpi da infezione da quelli vaccinali. Ne consegue la necessità di ricorrere a tecniche particolari quali la reazione a catena della polimerasi¹ o il prelievo del liquido cefalo-rachidiano², che sicuramente permettono una diagnosi precisa, ma che possono essere eseguite solo in laboratori specializzati.

La ricerca degli anticorpi della classe M è ampiamente utilizzata in campo umano per la diagnosi delle infezioni sostenute dal virus del morbillo³ che, come è noto, è un vi-

rus strettamente correlato a CDV. Recentemente è stata proposta la ricerca delle IgM sieriche come una valida alternativa per la diagnosi in vita del cimurro⁴.

Scopo del presente lavoro è quello di riportare i dati di una ricerca condotta al fine di valutare la produzione di IgM in cani vaccinati e clinicamente sospetti di infezione da cimurro.

MATERIALI E METODI

Materiali

- a) *Cellule*: è stata utilizzata la linea cellulare Vero (cellule renali di scimmia) fatta sviluppare in terreno DMEM (Minimum Essential Medium modificato da Dulbecco) arricchito del 10% di siero fetale bovino. La linea cellulare Vero rappresenta la linea di elezione per la crescita dei ceppi vaccinali di CDV.
- b) *Virus*: è stato utilizzato lo stipite vaccinale di CDV ceppo Onderstepoort. Questo virus ha la capacità di crescere con facilità su cellule Vero dove determina la comparsa di grossi sincizi a distanza di 24-36 ore dall'infezione.
- c) *Sieri*: sono stati raccolti n° 20 emosieri di cani sottoposti a vaccinazione per CDV e n° 84 emosieri di cani sospetti infetti. Per quanto riguarda questi ultimi n° 25 provenivano da cani regolarmente sottoposti a vaccinazione, n° 7 da cani mai vaccinati e n° 52 da soggetti in cui l'epoca esatta dell'intervento vaccinale non era certa. Per cani "regolarmente vaccinati" s'intendono tutti quei soggetti sottoposti all'intervento immunizzante per CDV sempre dal medesimo medico veterinario. La raccolta dei sieri è stata eseguita presso gli ambulatori veterinari delle provincie di Teramo, Pescara, L'Aquila, Ancona e Bologna.

Da n° 5 cani deceduti, sono stati prelevati il cervello ed il cervelletto per l'esecuzione della prova di immunofluorescenza indiretta (IFI) su strisci di materiale cerebrale al fine di individuare la presenza di antigene CDV.

Tutti i sieri raccolti sono stati conservati fino al momento della prova a -20°C, mentre i campioni di materiale cerebrale sono stati conservati a -80°C.

Metodi

a) Allestimento della prova di IFI per la ricerca delle IgM

Sono state utilizzate cellule Vero infette con CDV fatte sviluppare su vetrini multispot a 16 pozzetti del commercio (TC Chamber Slide, Nunclon). Si tratta di vetrini per colture cellulari, sormontati da una serie di cellette in materiale plastico che una volta staccate lasciano sulla superficie del vetrino 16 pozzetti separati uno dall'altro, di guisa che ogni pozzetto può essere utilizzato per una singola diluizione di siero. La miscela cellule-virus atta per l'inoculazione su vetrino, veniva preparata rispettando per ogni lotto di allestimento una proporzione costante (quantità di cellule inoculate: 2×10^4 cellule/pozzetto - virus: molteplicità d'infezione 0,05). I vetrini venivano quindi posti in incubatore a 37°C per 24 ore. Trascorso tale tempo, venivano osservati al microscopio ottico per l'evidenziazione dei

sincizi ed infine fissati in acetone freddo e conservati a -20°C fino all'esecuzione del test. La prova di IFI su vetrino per la ricerca delle IgM veniva eseguita sia per valutare l'efficienza del lotto dei vetrini allestiti, sia per valutare la presenza delle IgM (e di IgG) nel siero di animali sospetti. La presenza delle IgM (e delle IgG) veniva svelata mediante l'uso di anti-IgM (e di anti-IgG) coniugate con isotiocianato di fluoresceina (Kirkegaard and Perry Lab.). In ogni prova sono stati allestiti i controlli utilizzando un siero negativo ed un siero positivo per IgM e IgG nei confronti di CDV. Per il limite minimo di positività è stato considerato il valore di 1:10.

b) Schema per la raccolta dei sieri dei cani sottoposti a vaccinazione

Per valutare la cinetica di produzione delle IgM nei cani vaccinati sono stati seguiti n° 20 cuccioli di cane dell'età compresa tra i 70 e i 90 gg. e di razza e sesso diversi per un periodo di circa 15 mesi, secondo lo schema seguente:

- giorno -10: prelievo di sangue per valutare l'eventuale presenza di anticorpi materni;
- giorno 0: in caso di sieronegatività esecuzione della vaccinazione tramite prodotto a virus attenuato;
- giorno 1, 3, 5, 7, 14 post-vaccinazione (p.v.): prelievo di sangue e raccolta del siero;
- giorno 21 p.v.: 2° intervento vaccinale
- giorno 28 p.v.: prelievo di sangue.

Successivamente, i prelievi sono stati eseguiti a scadenza mensile.

A distanza di un anno i cani sono stati rivaccinati con l'identico prodotto utilizzato in precedenza e quindi sottoposti a distanza di una settimana e poi mensilmente per tre mesi al prelievo di sangue.

c) Raccolta dei sieri di animali sospetti di infezione

Da n° 84 animali sono stati raccolti gli emosieri al fine di valutare la presenza di IgM e di IgG. Il sospetto clinico della malattia veniva avanzato ogni qualvolta il veterinario visitava un animale colpito da una sintomatologia riferibile ad infezione cimurrosa. Le manifestazioni cliniche più comunemente osservate sono state raggruppate in tre categorie:

- forma catarrale: caratterizzata da congiuntivite e da sintomi respiratori e gastro-intestinali;
- forma nervosa: caratterizzata da mioclonie, atassia, ecc.
- forma mista: in cui è stato possibile riconoscere entrambe le forme.

Il campione di sangue veniva prelevato, sierato e quindi portato in laboratorio per l'esecuzione della prova di IFI come descritto in precedenza.

d) Prova di IFI su strisci di materiale cerebrale

Dopo scongelamento, alcuni frammenti prelevati dalla sostanza bianca di cervello e cervelletto venivano compressi, strisciati e fissati sulla superficie di un vetrino portaoggetti preventivamente pulito con soluzione alcool-acetone (1:1). Per la prova è stato utilizzato un anticorpo monoclonale (gentilmente fornito dal dr. Orvell, Karolinska Institute, Stoccolma, Svezia) rivolto verso la proteina NP di CDV. La presenza di una fluorescenza giallo-verde granulare e diffusa a livello citoplasmatico veniva considerata come reazione positiva.

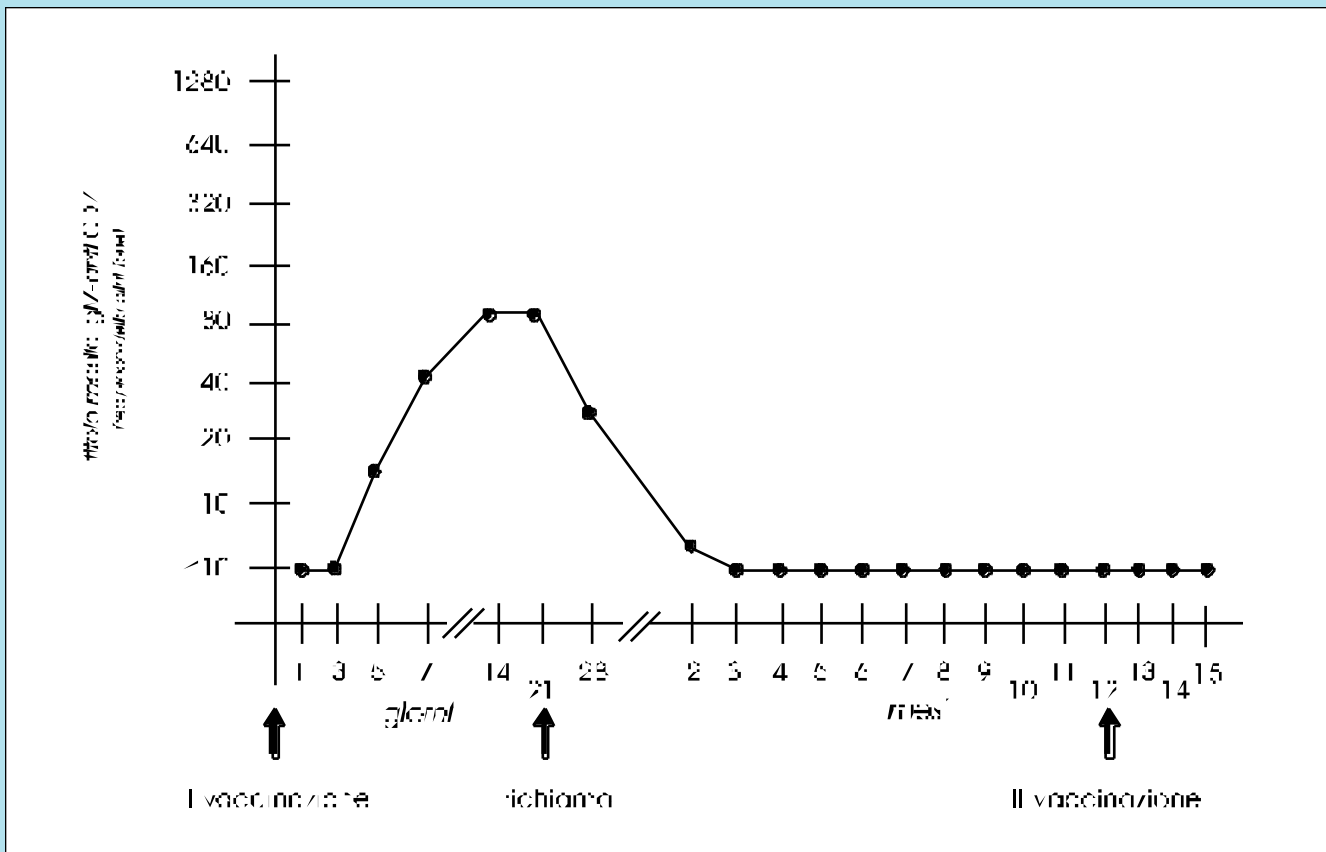


GRAFICO 1 - Presenza delle IgM-anti CDV nel siero di cani vaccinati.

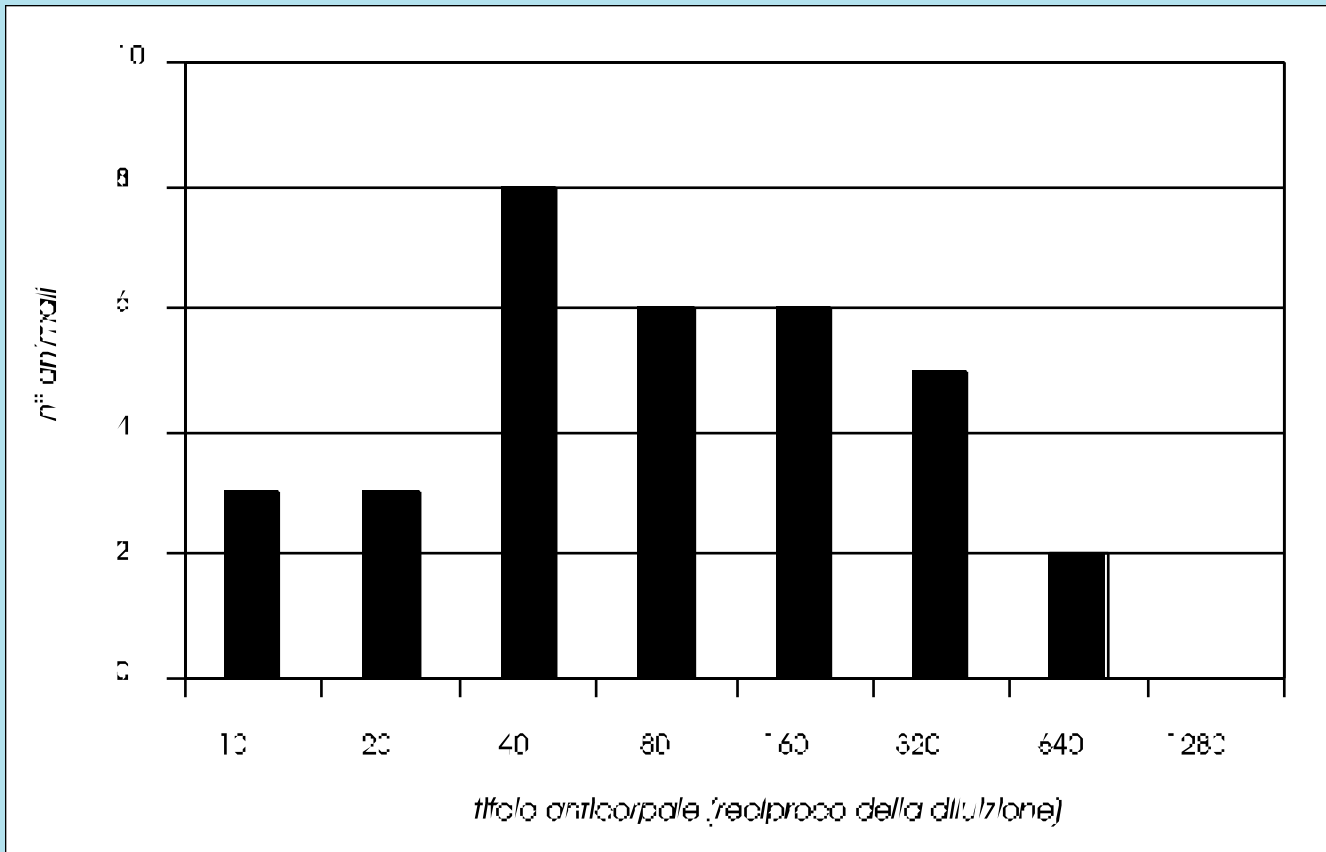


GRAFICO 2 - Cani IgM-positivi raggruppati a seconda del titolo anticorpale.

RISULTATI

I risultati delle prove eseguite in IFI per la valutazione delle IgM negli animali sottoposti a vaccinazione sono riportati nel Grafico 1. Come si può osservare le IgM sono comparse nel siero al 5° giorno p.v. e sono aumentate fino al 14° giorno per rimanere stabili per una settimana e regredire lentamente fino a scomparire in maniera definitiva intorno al 2° mese p.v. La rivaccinazione eseguita a distanza di un anno dalla prima, non ha determinato una nuova comparsa di IgM.

Dei n° 84 sieri esaminati e provenienti da cani clinicamente sospetti infetti, n° 33 sono risultati positivi al test. Per quanto riguarda la distribuzione degli animali rispetto al titolo di IgM riscontrate, è possibile osservare che la maggior parte degli animali positivi si ritrova compresa tra le diluizioni 1:40 e 1:320 (Grafico 2).

Dai n° 5 soggetti su cui è stato possibile eseguire la ricerca dell'antigene CDV in strisci di cervello e cervelletto, si è riscontrata la positività in tre animali (Tab. 1). Si è voluto, inoltre, osservare se ci fosse corrispondenza fra pre-

senza di CDV a livello cerebrale e presenza di IgM e di IgG sieriche. Come si può notare i tre animali positivi sono risultati anche positivi per la ricerca delle IgM e di questi due animali si sono mostrati negativi al test per la ricerca delle IgG.

La distribuzione degli animali positivi rispetto all'età, è stata riassunta nella Tabella 2. La maggior parte dei soggetti con IgM circolanti è compresa nella classe di età inferiore ai 6 mesi (66% del campione esaminato).

Come già accennato, le manifestazioni cliniche più comunemente osservate sono state raggruppate in tre categorie: forma catarrale, nervosa, mista. Dalla Tabella 3 si può osservare come la maggior parte dei casi diagnosticati appartenesse alla forma mista, cioè a quei casi caratterizzati dalla presenza di più sintomi.

I risultati ottenuti, suddividendo il campione a seconda dell'avvenuta vaccinazione per CDV (Tab. 4), mettono in luce che il 56% degli animali regolarmente vaccinati, ha manifestato la tipica sintomatologia del cimurro. Da sottolineare che di questi animali, due non possedevano IgG anti-CDV.

Tabella 1
Risultati dell'IFI sul materiale cerebrale di cani deceduti per sospetta infezione cimurrosa

N° soggetto	IFI	IgM sieriche	IgG sieriche
34/95	+	+	+
52/95	+	+	-
112/96/A	-	-	-
112/96/B	-	-	-
40/97	+	+	-

Tabella 2
Suddivisione del campione dei cani sospetti di infezione cimurrosa ed IgM-positivi a seconda dell'età

Età animali (mesi)	N° totale	N° positivi IgM	% di positività
< 6	21	14	66
≥ 6 ≤ 12	8	2	25
≥ 13	55	17	31

Tabella 3
Suddivisione del campione di cani sospetti di infezione cimurrosa ed IgM-positivi a seconda delle forme cliniche

Forma clinica	N° totale	N° positivi IgM	% di positività
Catarrale	36	11	30
Nervosa	16	6	37
Mista	32	16	50

Tabella 4
Suddivisione del campione di cani sospetti di infezione cimurrosa ed IgM-positivi nei confronti della vaccinazione per CDV

Cani	N° campioni	N° positivi IgM	% positività
Regolarmente vaccinati	25	14	56
Non vaccinati	7	4	57
Anamnesi incerta	52	15	29

Tabella 5
La diagnosi di laboratorio in vita del cimurro del cane

TECNICA	VANTAGGI	SVANTAGGI
Isolamento di CDV	La presenza di virus è indice di infezione	Molto difficoltosa, praticamente impossibile
Ricerca di CDV nelle cellule epiteliali tramite IFI	Facile esecuzione	Si negativizza qualche giorno dopo l'inizio della sintomatologia
Sieroneutralizzazione sul siero	Facile esecuzione	Necessario il doppio prelievo a distanza di 21 gg.
Reazione a catena della polimerasi	Specificità e sensibilità	Eseguibile solo in laboratori specializzati
Sieroneutralizzazione sul liquido cefalo-rachidiano	Gli Ac sono presenti solo in seguito alla presenza di CDV patogeno	Il prelievo di liquido cefalo-rachidiano è difficoltoso
Ricerca delle IgM tramite IFI (o ELISA)	Facile esecuzione	Solo se il test è eseguito entro due mesi dalla prima vaccinazione in assoluto verso CDV, le IgM potrebbero essere confuse con quelle vaccinali

CONCLUSIONI

In mancanza di un test diagnostico facilmente eseguibile ed affidabile (Tab. 5), si è pensato di allestirne uno che, sfruttando l'IFI, fosse in grado di mettere in evidenza le IgM, indicative di una replicazione recente o in corso di CDV⁴.

Al fine di valutare l'effettiva praticità di questo test, è stata dapprima studiata la cinetica di produzione anticorpale delle IgM sieriche in cani vaccinati. Tale approccio si è reso indispensabile per valutare la possibilità di non confondere le IgM dei cani infetti con quelle dei cani vaccinati. I risultati ottenuti ci hanno permesso di osservare che in seguito alla vaccinazione con un prodotto attenuato, le IgM vengono prodotte solo in seguito al primo intervento in assoluto e per un periodo di tempo di circa due mesi per poi scomparire definitivamente anche dopo successive vaccinazioni. Questa situazione è sovrapponibile a quella che generalmente si osserva nell'uomo. Infatti, lo studio della risposta anticorpale di bambini alla vaccinazione nei confronti del virus del morbillo, ha posto in evidenza che i soggetti sottoposti a due interventi immunizzanti consecutivi producono IgM solo in seguito alla prima vaccinazione⁵. La ricerca delle IgM nei sieri di cani clinicamente sospetti di infezione cimurrosa ha fornito dei risultati molto interessanti. Infatti, anche se sono stati esaminati solo n° 5 campioni di materiale cerebrale, i tre positivi alla ricerca dell'antigene CDV, sono risultati anche positivi alle IgM sieriche. Per quanto riguarda la classe di età, gli animali inferiori ai 6 mesi hanno dimostrato la più alta positività al test e ciò in accordo con la caratteristica tendenza delle infezioni da morbillivirus di essere particolarmente presenti nei soggetti giovani di una popolazione parzialmente immunizzata^{6,7}.

Nei confronti del tipo di sintomatologia osservata, la più alta percentuale di animali positivi al test IgM è stata registrata in quelli colpiti dalla cosiddetta forma "mista". Tale situazione è abbastanza tipica, in quanto i cani che manifestano soltanto la forma catarrale o la forma nervosa non necessariamente risultano colpiti da CDV, ma da altre patologie anche di origine non strettamente infettiva. Invece, in presenza di un cane che manifesta una pluralità di sintomi (in accordo con la multisistemicità del cimurro), la possibilità che si tratti di un'infezione da CDV è molto elevata.

Purtroppo, non è stato possibile seguire per periodi di tempo lunghi i cani infetti al fine di valutare il periodo di presenza delle IgM anti-CDV nel siero. Questo problema ha trovato origine soprattutto nella difficoltà che i proprietari manifestavano nel continuare a seguire il proprio cane al quale era stato diagnosticato il cimurro. Ad ogni modo, sembrerebbe che le IgM siano evidenziabili nel siero dell'animale convalescente per un periodo di circa tre mesi².

Per quanto riguarda i casi di cimurro descritti in cani adulti con pregresse vaccinazioni annuali, si deve purtroppo rilevare che in alcuni casi si tratta di animali sprovvisti totalmente di anticorpi. Tale situazione, peraltro già descritta precedentemente in un'altra nostra ricerca⁸, meriterebbe un ulteriore approfondimento, anche se una delle ipotesi da noi proposte potrebbe trarre origine nell'uso di un prodotto mal conservato. Vale la pena sottolineare che anche nell'uomo la possibilità di riscontrare bambini sprovvisti di anticorpi in seguito alla vaccinazione per il morbillo è abbastanza frequente⁹ e che anche in questo caso il problema può essere causato da un prodotto vaccinale non opportunamente mantenuto nella catena del freddo¹⁰.

In umana la dimostrazione di anticorpi della classe M specifici per il virus del morbillo, è il sistema di diagnosi di laboratorio accettato per questa infezione¹¹ ed al giorno d'oggi sono numerosi i kit disponibili in commercio¹².

In conclusione, la ricerca delle IgM nei sieri di cani clinicamente sospetti d'infezione da CDV permette tramite un singolo campione di siero di convalidare la diagnosi clinica anche all'interno delle popolazioni canine dove comunemente viene praticata la vaccinazione.

Abbreviazioni

CDV: Canine Distemper Virus; D-MEM: Mimimun Essential Medium Dulbecco; IFI: immunofluorescenza indiretta; p.v.: post-vaccinazione.

Parole chiave

Cane, cimurro, diagnosi, IgM.

Key words

Dog, distemper, diagnosis, IgM.

Key words

Dog, distemper, diagnosis, IgM.

Bibliografia

1. Shin Y.-S., Mori T., Okita M., Gemma T., Kai C., Mikami T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, 57: 439, 1995.
2. Appel M. Canine distemper virus. In: Appel M.J. (Ed.), *Virus infections of carnivores*, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 133, 1987.
3. Oshitani H., Suzuki H., Mpabalwani M., Mizuta K., Kasolo F.C., Luo N.P., Numazaki Y. Laboratory diagnosis of acute measles infections in hospitalized children in Zambia. *Trop. Med. Int. Hlt.*, 2: 612, 1997.
4. Blixenkron-Moller M., Pedersen I.R., Appel M.J., Griot C. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3: 39, 1991.
5. Erdman D.D., Health J.L., Watson J.C., Markowitz L.E., Bellini W.J. Immunoglobulin M antibody response to measles virus following primary and secondary vaccination and natural virus infection. *J. Med. Virol.*, 41: 44, 1993.
6. Black F.L. Measles active and passive immunity in worldwide perspective. *Progr. Med. Virol.*, 36: 1, 1989.
7. Gorham J.R. The epizootiology of distemper. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 149: 610, 1996.
8. Marsilio F., Tiscari P.G., Palucci O., Gatti A. Valutazione dell'immunità umorale di cani vaccinati per Canine Distemper Virus (CDV). *Atti S.I.S.Vet.*, 50: 303, 1996.
9. Cutts F.T., Smith P.G., Colombo S., Mann G., Ascherio A., Soares A.C. Field evaluation of measles vaccine efficacy in Mozambique. *Am. J. Epidemiol.*, 131: 349, 1990.
10. Adu F.D., Akinwolere O.A., Tomori O., Uche L.N. Low seroconversion rates to measles vaccine among children in Nigeria. *Bull. WHO*, 70: 457, 1992.
11. Lievens A.W., Brunell P.A. Specific immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for confirming the diagnosis of measles. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 391, 1986.
12. Helfand R.F., Kebede S., Alexander J.P.Jr., Alemu W., Heath J.L., Gary H.E.Jr., Anderson L.J., Beyene H., Bellini W.J. Comparative detection of measles-specific IgM in oral fluid and serum from children by an antibody capture IgM EIA. *J. Infect. Dis.*, 173: 1470, 1996.