

INDAGINI VIROLOGICHE E SIEROLOGICHE IN UN FOCOLAIO DI HERPESVIROSI CANINA

L. MASOERO, A. DONDO, P.L. ACUTIS*, S. DONDO*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Via Bologna 148, Torino

*Medico veterinario libero professionista

Riassunto

In seguito a casi di mortalità neonatale in un allevamento canino causata da *Herpesvirus canis*, è stata condotta, per un anno, una indagine sierologica sui cani dello stesso allevamento. Un analogo controllo è stato effettuato in un secondo allevamento, poiché si erano verificati dei precedenti contatti tra gli animali dei due canili. Sebbene non si siano manifestati ulteriori problemi di sopravvivenza nelle cucciolate durante il periodo di studio, è stato riscontrato un differente comportamento dell'immunità umorale nei due gruppi di animali. È pertanto ipotizzabile che il virus abbia continuato a circolare nel primo allevamento. Sulla base di questi risultati viene discussa l'importanza dell'adozione di misure profilattiche contro la diffusione di *Herpesvirus canis*.

Summary

Following cases of neonatal mortality in a dog breeding caused by *Herpesvirus canis*, a one year serological survey was carried out on dogs of the same breeding. Similar control was carried out on a second breeding because of previous interactions amongst the animals of the two kennels. Although no other problems of survival of puppies appeared during the study period, a different pattern of the humoral immunity was found in the two groups of animals, showing that in the first one the circulation of the virus didn't stop. On the basis of these results, the importance of prophylactic measures against spreading of *Herpesvirus canis* is discussed.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Herpesvirus canis* (CHV), descritta per la prima volta da Carmichael et al.³⁻⁴ nel 1965, è fonte di preoccupazione per gli allevatori, in quanto responsabile di aborti e mortalità di cuccioli al di sotto delle tre settimane di vita. Gli adulti presentano sintomatologia meno evidente, a decorso subclinico, con scolo oculare e nasale, congiuntivite, pustole e vescicole a carico dell'apparato genitale femminile a rapida risoluzione con possibili recidive ad ogni estro¹¹. La trasmissione di CHV ai cuccioli può avvenire in utero oppure durante il parto, in seguito a contatto con i secreti vagino-cervicali della madre, o, ancora, dopo la nascita, tramite contatto diretto o indiretto con i secreti di animali infetti. La gravità della malattia è correlata alla presenza di anticorpi materni nel colostro: cuccioli nati da madri con titolo anticorpale >1:4 sono resistenti all'infezione sperimentale con CHV⁵. Alti titoli anticorpali, tuttavia, pur proteggendo dalla forma letale della malat-

tia, non impediscono l'instaurarsi di una infezione latente o inapparente.

Pochi studi sono stati effettuati finora circa l'epidemiologia e la prevalenza di CHV nella popolazione canina: indagini sierologiche condotte in USA, Svizzera, Belgio e Italia² hanno rilevato basse percentuali di sieropositività (dall'1% al 6%); peraltro, positività anche del 100% sono state spesso riscontrate in allevamenti in cui la comparsa dell'infezione non è stata seguita da adeguate misure di profilassi.

Focolai di malattia sono stati descritti da Cravero et al.⁸ in Piemonte, confermando la presenza di CHV anche in questa regione.

Nell'Aprile del 1997 è pervenuto al nostro Istituto, da un allevamento, un cucciolo deceduto tre giorni dopo la nascita. Il soggetto apparteneva ad una cucciolata di 6 individui, 3 dei quali nati morti, ed aveva manifestato abbattimento, dispnea, dolorabilità generalizzata e anoressia. Quindici giorni dopo il caso citato, nello stesso allevamen-

to sono nati tre cuccioli, i quali, pur se sottoposti a trattamento antibiotico profilattico per 10 giorni, sono venuti a morte all'età di 18 giorni, in seguito a gravi disturbi respiratori.

Gli esami anatomopatologico, batteriologico e virologico hanno portato alla diagnosi di infezione da CHV. In seguito a tale risultato, esemplari dell'allevamento sono stati sottoposti a controlli sierologici, per un periodo di un anno, per valutare l'incidenza dell'infezione, il suo andamento nel tempo e la sua importanza ai fini delle capacità riproduttive degli animali. Inoltre, dato che alcuni soggetti avevano soggiornato per breve tempo in un altro allevamento della zona, anche i cani di quest'ultimo allevamento sono stati tenuti sotto controllo sierologico.

MATERIALI E METODI

Esame anatomopatologico

Sui quattro cuccioli è stato eseguito un esame necroscopico e sono stati prelevati asetticamente campioni di visceri, sui quali dopo esame anatomopatologico, si sono eseguiti esami batteriologici e virologici.

Esami batteriologici

Gli esami batteriologici sono stati effettuati utilizzando terreni solidi e liquidi (Agar sangue, MacConkey agar, Nutrient broth, Selenite e Rappaport broth) a partire da midollo osseo, milza e fegato.

Esami virologici

Sono stati eseguiti a partire da cervello e reni del primo cucciolo pervenuto all'Istituto e da cervello, polmoni, fegato, milza e reni dei successivi tre animali. Ogni organo è stato trattato singolarmente. I campioni sono stati omogenati, addizionati di terreno MEM Earle antibiotato e centrifugati a 2890g per 30 minuti a +4°C.

Il surnatante è stato diluito (1/10, 1/100) e successivamente inoculato su cellule renali di cane in linea continua (MDCK) in mitosi. Le colture sono state controllate giornalmente; in mancanza di effetto citopatico, ogni 72 ore sono stati effettuati successivi passaggi ciechi. Sono stati considerati negativi gli inoculi che non hanno provocato alcuna alterazione cellulare dopo tre passaggi. I campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad una prova di immunofluorescenza diretta con coniugato fluorescente anti-CHV (VMRD, Inc.).

Esami sierologici

Sono stati effettuati prelievi di sangue a 8 cani dell'allevamento, a 20 giorni di distanza dal primo caso di mortalità, per la ricerca di anticorpi neutralizzanti CHV. Su 4 di questi animali è stato eseguito un secondo prelievo, ad un intervallo di 3 settimane, al fine di verificare una eventuale sieroconversione. L'andamento complessivo dell'im-

munità anticorpale è stato quindi controllato effettuando prelievi ad altri 14 cani, a distanza di 60, 120 e 360 giorni dalla comparsa del focolaio.

Nel secondo allevamento sono stati sottoposti ad un primo prelievo n.° 38 cani ed i sieropositivi sono stati controllati con sei successivi prelievi nell'arco di 9 mesi. Dopo un anno sono stati sottoposti a prova anche i sieronegativi.

La metodica utilizzata per la ricerca degli anticorpi è stata la sieroneutralizzazione in micrometodo con semina in mitosi ed in presenza di complemento di cavia al 5%. Tutti i sieri sono stati diluiti in raddoppio a partire da 1:4 fino alla diluizione di 1:256. Il titolo di ogni siero è stato espresso come il reciproco della diluizione in grado di proteggere completamente, contro gli effetti citopatici, il 50% dei pozzetti inoculati con la dose virale challenge (100TCID₅₀/25 microlitri), calcolato con il metodo di Reed e Muench ed approssimato alla cifra intera.

RISULTATI

Alla necroscopia, le lesioni sono apparse simili in tutti i soggetti: congestione cerebrale, idrotorace, focolai di bronco-polmonite, splenomegalia, presenza di focolai necrotico-emorragici a livello della corticale renale. Alla sezione dei reni, le lesioni si presentavano a forma di cono, con apice rivolto verso la zona cortico-midollare.

Gli esami batteriologici non hanno evidenziato germi patogeni, mentre nelle colture cellulari inoculate per ricerche virologiche si è osservato effetto citopatico, caratterizzato da focolai di cellule arrotondate e rifrangenti le quali andavano progressivamente incontro a distacco, lasciando aree chiare delimitate da cellule in degenerazione. Tale CPE ha portato al sospetto di isolamento di *Herpesvirus canis*, che è stato confermato dalla positività alla immunofluorescenza diretta, oltre che dalla completa inattivazione del virus a 56°C per 5 minuti o trattamento con cloroformio.

CHV è stato isolato dai reni di tutti i 4 cuccioli, dai polmoni di 3 di essi e dal SNC di 1 solo soggetto. Si è sempre ottenuto esito negativo a partire dalle milze, mentre i fegati sono stati eliminati a causa del loro effetto tossico sulle cellule.

I risultati dell'indagine sierologica del primo allevamento sono riportati nella Tabella 1. Dei primi 8 cani sottoposti a prova, 6 sono risultati sieropositivi, compresi i genitori della prima cucciolata colpita (identificativi n° 6 e 7) e 1 dei due cuccioli sopravvissuti (n° 8). Nessuno di essi ha mostrato sieroconversione, presumibilmente perché i prelievi sono stati effettuati tardivamente rispetto al momento dell'infezione.

Il terzo prelievo, a distanza di 60 giorni dalla comparsa del focolaio, ha rivelato che 13 cani, su 14 provati, erano sieropositivi. Particolarmente interessanti sono stati i risultati del quarto prelievo, in quanto due soggetti negativi erano divenuti positivi (n° 1 e 3) ed altri 4 avevano presentato un rialzo del titolo anticorpale, superiore a quattro volte il titolo precedente (n° 2-10-13-15). A distanza di un anno è stata riscontrata ancora sieropositività in tutti gli individui, con la sola eccezione del n° 19, che è risultato negativo.

Tabella 1
Titolazione anticorpi neutralizzanti CHV

Identificativo animale	PRELIEVI				
	I°	II°	III°	IV°	V°
1	Negativo	Negativo	-	32	-
2	24	24	-	192	128
3	Negativo	Negativo	-	12	8
4	128	-	-	64	192
5	6	-	-	6	-
6	48	-	-	96	64
7	48	96	-	-	-
8	192	-	-	-	-
9	-	-	12	32	-
10	-	-	12	256	-
11	-	-	128	-	32
12	-	-	64	192	64
13	-	-	192	1024	256
14	-	-	8	16	8
15	-	-	24	192	48
16	-	-	128	-	-
17	-	-	16	12	-
18	-	-	32	-	128
19	-	-	4	-	Negativo
20	-	-	Negativo	-	-
21	-	-	256	-	-
22	-	-	48	-	-

- : non eseguito

Tabella 2
Titolazione anticorpi neutralizzanti CHV

Identificativo animale	PRELIEVI					
	I°	II°	III°	IV°	V°	VI°
1	64	8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	64	-	-	-	-	-
3	8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	8	-	8	6	6	Negativo
5	64	48	-	-	-	-
6	48	32	64	-	-	-
7	6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	6	4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

- : non eseguito

Nel secondo allevamento sono stati rilevati 8 animali sieropositivi su 38. Di questi, 4 si sono negativizzati dopo 2 mesi ed 1 dopo 9 mesi. 3 animali sono stati venduti durante il periodo di studio e quindi non sono stati controllati ulteriormente (Tab. 2).

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI

I risultati hanno evidenziato un'alta percentuale di positività sierologica nell'allevamento in cui si è manifestato il virus. Tale percentuale è aumentata nel corso del perio-

do di studio, in quanto 2 individui negativi si sono positivamente a distanza di 4 mesi dai casi di mortalità neonatale. È da sottolineare che, proprio nello stesso periodo, 4 soggetti positivi hanno mostrato sierconversione. I dati ottenuti hanno quindi posto in evidenza che il virus ha avuto una notevole diffusione nell'allevamento e che, in almeno un momento dell'anno, si sono verificati casi di nuova infezione o, eventualmente, di riattivazione di una infezione latente. La continua circolazione del virus spiegherebbe anche la presenza di alti titoli anticorpali ancora ad un anno di distanza dalla comparsa del focolaio, in contrasto con quanto riportato in letteratura, dove si riferisce che la

durata dell'immunità anticorpale da CHV sarebbe di pochi mesi¹.

La trasmissione di *Herpesvirus canis*, tra animali adulti, è poco conosciuta nei fattori che la determinerebbero. Nel caso studiato tuttavia possiamo supporre che un ruolo determinante nell'evoluzione dell'infezione virale sia da mettere in relazione al fatto che gli animali positivi non siano mai stati isolati e che nessuna precauzione sia stata messa in atto, da parte dell'allevatore, per evitare la diffusione del virus.

A conforto di questa ipotesi vi sono i risultati ottenuti nel secondo allevamento sottoposto a prova, dove, al contrario, i soggetti sieropositivi sono sempre stati prontamente isolati: in questo caso, infatti, durante il periodo di osservazione di un anno, si è constatata la negativizzazione dei soggetti positivi e l'assenza di nuovi casi di infezione.

Nonostante la persistenza del virus, nel primo allevamento, dopo i casi di malattia descritti, non sono più comparsi aborti o mortalità neonatale. Questo confermerebbe che gli anticorpi materni sono sufficienti a proteggere i cuccioli da forme letali di herpesvirus.

Tuttavia, la comparsa di CHV in un allevamento non è da sottovalutare da parte dell'allevatore e del medico veterinario. Misure profilattiche devono quindi essere adottate per evitare la diffusione del virus. I soggetti sieropositivi devono essere isolati e deve essere prevenuta qualsiasi possibilità di contagio per contatto indiretto. Gli stessi soggetti dovrebbero anche essere posti al riparo da fattori stressanti e controllati tramite indagini sierologiche. Infatti, la breve durata dell'immunità anticorpale da CHV fa sì che la sieropositività indichi infezione in atto o recente, mentre la negativizzazione sia indice dell'estinzione dell'infezione o di infezione latente. È necessario tenere ben presente che un animale sieropositivo può costituire una fonte di contagio nel momento in cui viene portato fuori dall'allevamento per esposizioni, vendita o per la riproduzione. In questi casi, l'infezione di animali sani può portare nuovamente alla perdita di cucciolate.

Allo stesso modo, si consiglia all'allevatore di sottoporre a prova sierologica i cani di nuova introduzione e quelli destinati all'accoppiamento. Per quanto riguarda le femmine gravide, nel caso di soggetti sieronegativi, dovrebbero essere isolate nel periodo di massima suscettibilità all'infezione, vale a dire da tre settimane prima a tre settimane dopo il parto, mentre nel caso di sieropositivi, oltre all'isolamento, particolare attenzione dovrebbe essere rivolta ad eliminare condizioni di stress. I fattori stressanti, infatti, potrebbero deprimere l'immunità anticorpale della madre e favorire l'infezione dei cuccioli.

Infine, non si dimentichi che, se pur non ampiamente dimostrato, CHV potrebbe dare luogo, come altri Herpes-

virus, ad infezione latente, suscettibile di riattivazione anche a distanza di lungo tempo: è questo un ulteriore motivo per cui è indispensabile che ogni focolaio di herpesvirus canina venga sempre prontamente controllato e limitato.

Parole chiave

Herpes canis, cane, serum.

Key words

Herpes canis, dog, serum.

Abbreviazioni

CHV: Canine Herpes virus

MDCK: Madin, Darby Canine Kidney

IFD: Immunofluorescenza diretta

Bibliografia

1. Anvik J.O.: Clinical considerations of canine herpesvirus infection. *Veterinary Medicine* 86 (4): 394-403, 1991.
2. Bonsembiante P., Renzi M., Cancellotti F.M., Guerriero M.V.: Canine herpesvirus epidemiological study. First results. *Atti XLV Convegno S.I.S.Vet.*: 1151-1155, 1991.
3. Carmichael L.E., Squire R.A., Krook L.: Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *Am. J. of Vet. Res.* 26: 803-814, 1965.
4. Carmichael L.E., Strandberg J.D., Barnes F.D.: Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 644-650, 1965.
5. Carmichael L.E.: Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *JAVMA* 156, 12: 1714-1725, 1970.
6. Cornwell H.J.C., Wright N.J., Campbell R.S.F., Roberts R.J., Reid A.: Neonatal disease in the dog associated with a herpes-like virus. *Vet. Rec.* 79: 661-662, 1966.
7. Cornwell H.J.C., Wright N.J.: Neonatal canine herpesvirus infection: a review of present knowledge. *Vet. Rec.* 84: 2-6, 1969.
8. Cravero G.C., Valenza F., Beccaria E., Ferrari A.: Contributo allo studio della infezione erpetica nel cucciolo: indagini virologiche e reperti anatomo-istopatologici. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 123: 363-372, 1981.
9. Delisle F.: L'herpès-virose canine. *Rec. Med. Vet.* 158: 669-676, 1982.
10. Engels M., Mayr-Bibrack B., Ruckstuhl B., Metzler A., Wyber R.: The sero-epizootiology of canine herpes virus infections in Switzerland and preliminary studies with a vaccine. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 4: 257-267, 1980.
11. Feldman E.C., Nelson R.W.: Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto. UTET 1992.
12. Fulton R.W., Ott R.L., Duenwald J.C., Gorham J.R.: Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of Eastern Washington. *Am. J. Vet. Res.* 35: 853-855, 1974.
13. Yanagisawa T., Azetaka M., Midoro K., Takahashi R., Fujiwara K., Sawa K.: Fatal herpesvirus infection in a litter of puppies. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49 (3): 519-522, 1987.