

# RICOMPARE UNA VECCHIA PATOLOGIA: L'EPATITE INFETTIVA DEL CANE

MARCO CAMPOLO, MICHELE CAMERO, COSTANTINA DESARIO, DOMINGA RICCI,  
FRANCESCO CIRONE, ANTONELLA TINELLI, NICOLA DECARO

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

## Riassunto

Viene descritto un grave episodio di epatite infettiva in un canile-rifugio della provincia di Bari.

Mediante test PCR, dagli organi di quattro soggetti morti è stato evidenziato l'acido nucleico dell'adenovirus del cane tipo 1 (CAAdV-1) e del parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) e su cellule renali di cane è stato isolato CAAdV-1.

## Summary

*A severe outbreak of infectious canine hepatitis in a kennel in the province of Bari is reported.*

*By PCR, nucleic acids of canine adenovirus type 1 (CAAdV-1) and canine parvovirus type 2 (CPV-2) were detected in the organs of four dogs. A CAAdV-1 strain was isolated in canine kidney cells.*

## INTRODUZIONE

L'epatite infettiva del cane (ICH) o malattia di Rubarth (Rubarth, 1947) è causata dall'adenovirus del cane tipo 1 (CAAdV-1) che è antigenicamente correlato all'adenovirus del cane tipo 2 (CAAdV-2) responsabile di infezioni respiratorie.

Il periodo d'incubazione è relativamente breve (2-4 giorni) e la malattia è caratterizzata da febbre talvolta superiore ai 40°C, anoressia, abbattimento, vomito e diarrea, dolorabilità addominale, tosse e dispnea. Può essere presente un quadro di diatesi emorragica (Appel, 1987; Green, 1990). I cani possono presentare congiuntivite, fotofobia e opacità corneale transitoria (occhio blu) quale espressione di uveite anteriore ed edema corneale (Appel, 1987; Green, 1990; Carmichael, 1964, 1965). La malattia ha generalmente decorso subclinico nei cani di età superiore ad un anno (Rubarth, 1947; Appel, 1987). Nei cuccioli di età inferiore alle due settimane e privi di immunità colostrale è stata osservata elevata morbilità e mortalità (Cabasso, 1962; Wright e Cornwell, 1968).

La sintomatologia grave persiste per 5-7 giorni, e talvolta si può avere la completa guarigione anche se l'escrezione virale con le urine può prolungarsi per diversi mesi (Poppensiek e Baker, 1951).

Nei cani deceduti in seguito a malattia con decorso acuto grave si osserva la presenza di petecchie ed ecchimosi cutanee ed edema gelatinoso nel connettivo sottocutaneo.

Il fegato appare giallo scuro con necrosi centrolobulare; la cistifellea può essere aumentata di volume ed edematosa. La milza è ingrandita e può presentare infarti emorragici. I linfonodi sono ingranditi e fortemente emorragici.

L'epatite infettiva del cane era una patologia molto diffusa in Inghilterra, Danimarca, Norvegia, Italia e Francia, oltre che in Australia e nel Nord America. Indagini sierologiche condotte in varie parti del mondo prima dell'utilizzazione del vaccino, evidenziavano sieroprevalenze per CAAdV-1 fra il 30 e il 60% dei cani esaminati (Rubarth, 1947; Brunner et al., 1951; Cabasso, 1953; Sasaki et al., 1956).

Sono stati segnalati focolai di infezione da CAAdV-1 sia in Italia (Buonavoglia et al., 1993; Voigt et al., 1996; Decaro et al., 2001; Pratelli et al., 2001; Decaro et al., 2004) che all'estero (Stokey et al., 1972; Ducatelle et al., 1982; Kobayashi et al., 1993; Mochizuki et al., 2001), associati anche ad altri patogeni (canine distemper virus, canine coronavirus, *Bordetella bronchiseptica*).

Nella presente nota si descrive un grave episodio di infezione mista sostenuta dal virus dell'epatite infettiva e dal parvovirus del cane tipo 2 in un canile della provincia di Bari.

## MATERIALI E METODI

### Casi clinici

L'indagine è stata effettuata in un canile-rifugio della provincia di Bari, dove erano presenti ca 250 cani sistemati in box da 15 animali ciascuno.

Le condizioni generali dell'allevamento erano soddisfacenti e tutti i soggetti erano sottoposti a regolare profilassi vaccinale nei confronti delle più importanti patologie infettive.

Nel mese di novembre 2004, 4 soggetti di età compresa fra 3 e 9 mesi (303/04 A e B, 308/04, 311/04) hanno manifestato, a distanza di 2-3 giorni l'uno dall'altro, febbre, abbattimento e diarrea emorragica. I 4 soggetti, secondo quanto riferito dai proprietari, sono deceduti dopo 48-72 ore dalla comparsa dei primi sintomi.

All'esame anatomopatologico tutti i soggetti presentavano grave enterite emorragica (Fig. 1), linfonodi meseraici ingrossati ed emorragici (Fig. 2) e cistifellea notevolmente aumentata di volume (Fig. 3). Sul parenchima polmonare erano presenti focolai di polmonite (Fig. 4). Nel cane 308/04 la milza presentava estesi fenomeni degenerativi e focolai emorragici subcapsulari (Fig. 5). Lo stesso soggetto presentava la tipica lesione oculare (occhio blu).

Per le indagini di laboratorio, da tutti i soggetti sono stati prelevati campioni di feci, milza, fegato, rene, polmone, linfonodo e cervello, per la ricerca dei più importanti patogeni virali del cane: canino parvovirus tipo 2 (CPV-2), CAdV, canino coronavirus (CCoV) e canino distemper virus (CDV).

## Prove virologiche

### Canino parvovirus tipo-2 (CPV-2)

Il test di emoagglutinazione (EA) per la ricerca di CPV-2, è stato allestito in piastre a 96 pozzetti con fondo a V, utilizzando il surnatante di ciascun omogenato di feci e una sospensione di globuli rossi di suino allo 0,8% contenente

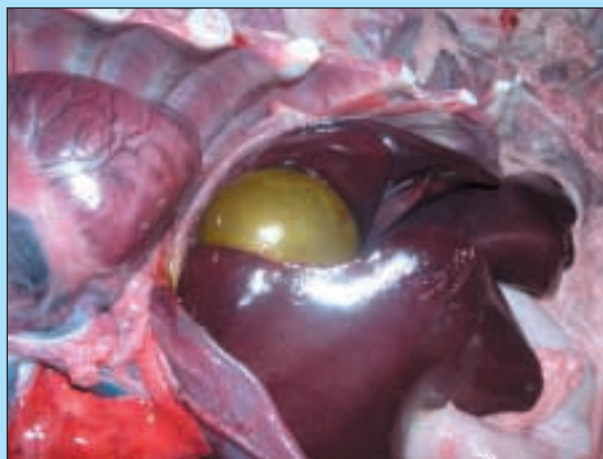


FIGURA 3 - Cistifellea aumentata di volume.



FIGURA 1 - Enterite emorragica.

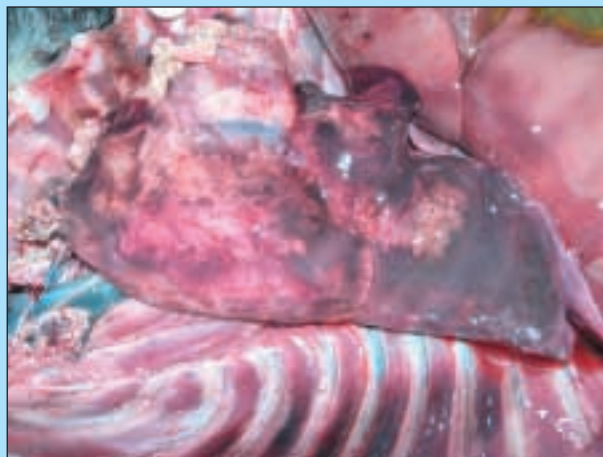


FIGURA 4 - Polmonite.

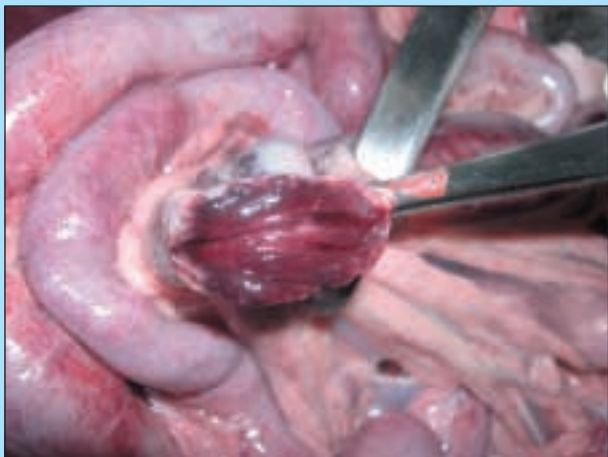


FIGURA 2 - Linfadenite emorragica.



FIGURA 5 - Splenomegalia con ematomi sottocapsulari.

l'1% di siero fetale bovino (SFB). Dopo due ore d'incubazione a +4°C è stata effettuata la lettura dei risultati.

La tipizzazione antigenica del virus (CPV-2, CPV-2a, CPV-2b) è stata realizzata mediante il test di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) utilizzando un panel di 4 anticorpi monoclonali (MoAbs) (A4E3, B4A2, C1D1, B4E1).

Per le prove di PCR da ciascun surnatante (200 µl) il DNA virale è stato estratto mediante bollitura per 10 minuti, al fine di inattivare gli inibitori della DNA polimerasi eventualmente presenti nelle feci (Schunck et al., 1995). Eventuali residui di inibitori sono stati ridotti a concentrazioni trascurabili diluendo gli estratti 1:10 in acqua bidistillata sterile. La PCR è stata eseguita su tutti i campioni di feci utilizzando la coppia di primers 555Hfor (CAGGAAGATATCCAGAAGGA) 555Hrev (GGTGC-TAGTTGATATGTAATAACA) (Buonavoglia et al., 2001) in grado di amplificare un frammento di 583 bp del gene della proteina capsidica VP1 di CPV-2. Un'aliquota di 8 µl dell'amplificato è stata quindi sottoposta a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% a 50V per 120 minuti e visualizzata al transilluminatore previa colorazione con etidio bromuro.

I ceppi tipizzati come CPV-2b con i MoAbs sono stati sottoposti a screening genetico mediante tecnica Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), secondo quanto descritto in precedenza (Buonavoglia et al., 2001; Martella et al., 2004). Gli amplificati ottenuti con la coppia di primers 555Hfor/555Hrev sono stati sottoposti a digestione con l'enzima di restrizione *MboII*, che riconosce selettivamente la sequenza GAAGA (nucleotidi 4062-4066 del gene VP1) presente nella mutante CPV Glu-426. La mix di digestione (40 µl) era costituita da 5 U di enzima, 20 µl di prodotto PCR, buffer *MboII*-specifico 1x, 15 µl di H<sub>2</sub>O. Dopo incubazione a 37°C per 2 ore, il prodotto della digestione enzimatica è stato sottoposto ad elettroforesi in gel di agarosio al 2.5% e visualizzato al transilluminatore previa colorazione con etidio bromuro. Gli amplificati tagliati dall'enzima generano due frammenti di 500 e 80 bp. Questa condizione si osserva solo nei ceppi Glu-426 che hanno, nel tratto di genoma amplificato, il sito di taglio per l'enzima (Buonavoglia et al., 2001; Martella et al., 2004).

#### Canine coronavirus (CCoV)

Per la ricerca di CCoV, i surnatanti dei tamponi rettali sono stati sottoposti ad estrazione con l'*Rneasy Total RNA kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germania). La RT-PCR è stata eseguita utilizzando la coppia di primers CCV1 e CCV2 come descritto da Pratelli et al. (1999). La coppia di primers è in grado di amplificare un frammento del gene M di CCoV pari a 409 bp. Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica e visualizzati al transilluminatore dopo colorazione con etidio bromuro.

#### Canine adenovirus (CAV)

Dal surnatante dei tamponi rettali e da ciascun campione di milza, fegato, rene, polmone e linfonodo è stata effettuata l'estrazione del DNA virale utilizzando il kit *Dneasy Tissue Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germania) e la PCR per CAV-1 e CAV-2 è stata eseguita utilizzando i primers HA1 (CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC) e HA2 (CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT) che amplificano un frammento del gene E3 di 508 bp e 1030 bp di

lunghezza, rispettivamente per CAV-1 e CAV-2 (Hu et al., 2001). La lettura della reazione è stata effettuata al transilluminatore dopo corsa elettroforetica e colorazione in etidio bromuro.

Un'aliquota di ciascun campione è stata trattata con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomycina, 10 µg/ml anfotericina B) per 30 minuti a 37°C ed inoculato su monostrati parzialmente confluenti di cellule renali di cane Madin Darby Canine Kidney (MDCK), sviluppate in piastre a 24 pozzetti con vetrino, utilizzando 4 pozzetti per campione. A diversi intervalli di tempo, è stato eseguito il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) per CAV.

#### Canine distemper virus (CDV)

Sui campioni di cervello, milza e polmone è stata eseguita l'estrazione dell'RNA genomico con l'*Rneasy Total RNA kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germania). L'RT-PCR è stata eseguita utilizzando la coppia di primers P2 (TA-TAAGTTCTGGTCAGACCTAGGGTG) e P7 (TT-GATCTGCCGGCAAAGTAAGCTCTG) che amplificano un segmento del gene che codifica per la proteina NP di CDV pari a 478 bp (Shin et al., 1995). Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% e visualizzati al transilluminatore previa colorazione in etidio bromuro.

## RISULTATI

Il test di EA eseguito sui tamponi rettali dei 4 cani ha fornito esito positivo per CPV-2 con titoli emoagglutinanti compresi fra 1:128 e 1:1024. La positività in tutti i soggetti è stata confermata dal test PCR. Con gli anticorpi monoclonali i virus sono stati identificati come CPV-2b e mediante analisi con enzimi di restrizione (*MboII*) come variante Glu 426 (CPV-2c).

La PCR per la ricerca di CCoV eseguita dai tamponi rettali ha fornito esito negativo.

La PCR per CAV eseguita sugli organi ha fornito esito positivo per CAV-1 in tutti i soggetti (Fig. 6).

Le cellule inoculate con i campioni di polmone, milza e linfonodo hanno evidenziato al 2° passaggio un effetto citopatico caratteristico degli adenovirus (arrotondamento cellulare e formazione dei tipici "clumps" con successiva lisi del monostrato cellulare) (Fig. 7). La PCR eseguita sul criolisato delle cellule con effetto citopatico ha confermato la presenza di CAV-1.

La PCR per CDV su cervello, polmoni e milza dei cani ha dato esito negativo.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'epatite infettiva del cane è una patologia ormai scomparsa grazie, soprattutto, all'impiego sistematico di vaccini con elevata attività protettiva in grado di bloccare la circolazione del virus.

I rari episodi osservati negli ultimi anni (Kobayashi et al., 1993; Decaro et al., 2001; Pratelli et al., 2001; Decaro et al., 2004) sono stati caratterizzati dalla contemporanea presenza di altri patogeni.

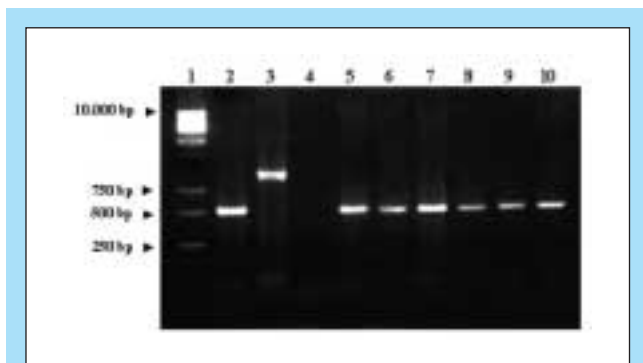


FIGURA 6 - PCR per CADV-1 e CADV-2 sugli organi del cucciolo 303/04A.

Linea 1: marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas GMBH, Germania); linea 2: controllo positivo CADV-1 (508 bp); linea 3: controllo positivo CADV-2 (1030 bp); linea 4: controllo negativo; linee 5-10: tamponi rettale, fegato, milza, rene, polmoni, linfonodo del cane 303/04A.

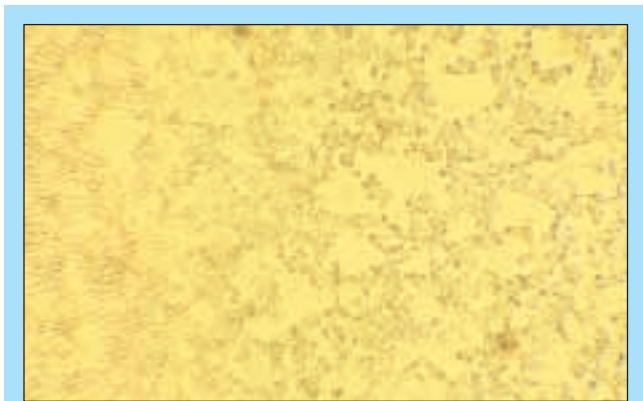


FIGURA 7 - Monostrato di cellule MDCK con effetto citopatico da CADV-1.

Anche nel focolaio descritto nella presente nota, oltre a CADV-1 è stata ritrovata la variante CPV-2c. Questa duplice infezione se da un lato può spiegare il decorso iperacuto della malattia osservato in tutti e quattro i soggetti esaminati, dall'altro assume particolare significato in quanto CPV-2 è stato ritrovato in soggetti (n 3) di 8-9 mesi di età. È ampiamente noto che CPV-2 è un patogeno importante solo nel cucciolo fino a 3-4 mesi di età. In cani di età superiore l'infezione da CPV-2 è rara o, comunque, generalmente decorre in forma sub-clinica. Negli ultimi tempi, tuttavia, sono state osservate infezioni da CPV-2 con evoluzione grave (anche mortale) in cani di 7-8 mesi di età regolarmente vaccinati; a ciò va aggiunto che, in tutti i casi osservati, è stata sempre isolata la variante 426-Glu (CPV-2c), mettendo ulteriormente in discussione la reale capacità protettiva dei vaccini nei confronti delle varianti circolanti e, in particolare, della variante 2c. È tuttavia molto probabile che nel focolaio descritto nella presente nota il decorso particolarmente grave della malattia sia da attribuire ad una azione sinergica dei due virus isolati (CADV-1 e CPV-2).

Un'altra importante considerazione riguarda la circolazione, seppur rara, di CADV-1 nella popolazione canina dell'Italia. È questo un dato epidemiologico molto importante che deve allertare i medici veterinari sia per quanto riguarda gli aspetti clinico-diagnostici ma anche per gli aspetti legati alla profilassi vaccinale di questa grave malattia.

## Parole chiave

Cane, adenovirus canino tipo 1, parvovirus canino.

## Key words

Dog, canine adenovirus type 1, canine parvovirus.

## Bibliografia

- Rubarth S: An acute virus disease with liver lesions in dogs (hepatitis contagiosa canis). A pathologic-anatomical and etiologic investigation. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 24 (Suppl. 69): 1-222, 1947.
- Appel MJ: Canine Adenovirus Type 1 (Infectious Canine Hepatitis Virus). In: Virus Infections of Vertebrates, series ed., Vol I. Virus infections of Carnivores. Ed by MC Horzinek, Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands, 1987, pp 29-43.
- Green CE: Infectious Canine Hepatitis. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Ed by WB Saunders, Philadelphia, PA, 1990, pp 242-251.
- Carmichael LE: The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis. I. Pathology and virological observations. Pathol. Vet. 1: 73-95, 1964.
- Carmichael LE: The pathogenesis of ocular lesions of infectious canine hepatitis. II. Experimental ocular hypersensitivity produced by the virus. Pathol. Vet. 2: 344-359, 1965.
- Cabasso VJ: Infectious canine hepatitis virus. Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 498-514, 1962.
- Wright NG, Cornwell HJC: Virus induced neonatal disease in puppies. J. Small. Anim. Pract. 9: 449-452, 1968.
- Poppensiek GC, Baker JA: Persistence of virus in urine as factor in spread of infectious hepatitis in dogs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77: 279-281, 1951.
- Brunner KT, Scheitlin M, Stunzi H: Zum serologischen Nachweis der Hepatitis Contagiosa Canis. Schweiz Arch. Tierheilk 93: 443-458, 1951.
- Cabasso VJ: Canine viruses. II. Infectious hepatitis and rabies control. Southwest. Vet. 6: 137-141, 1953.
- Sasaki N, Nakai M, Iwamoto I, et al: Studies on infectious hepatitis of dog. II. The distribution of the disease in Japan, and its immunization. Jpn. J. Vet. Sci. 18: 113-118, 1956.
- Buonavoglia D, Ferrara G, Marsilio F, et al: Tipizzazione di una stipite di adenovirus. Analisi mediante le endonucleasi di restrizione di un ceppo virale isolato da un cane. Obiettivi e documenti veterinari 10: 39-41, 1993.
- Voigt V, Ferrara G, Corrente M, et al: Isolamento di canine adenovirus tipo 1 da un cucciolo con sintomi clinici di epatite infettiva. Atti della società italiana delle scienze veterinarie. Volume L, Perugia, 1996, pp 331-332.
- Decaro N, Elia G, Cirone F, et al: Infezioni miste nel cane. Obiettivi e Documenti Veterinari 1: 51-54, 2001.
- Pratelli A, Martella V, Elia G, et al: Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. J. Vet. Med. B 48: 385-392, 2001.
- Decaro N, Camero M, Greco G, et al: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel New Microbiol. 27: 177-182, 2004.
- Stokey JL, VanZwieten MJ, Witney GD: Dual viral infections in two dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 161 (10): 1117-1121, 1972.
- Ducatelle R, Maenhout D, Coussement W, Hoorens J: Dual adenovirus and distemper virus pneumonia in a dog. Vet. Q. 4 (2): 84-88, 1982.
- Kobayashi Y, Ochiai K, Itakura C: Dual infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in a dog. J. Vet. Med. Sci. 55 (4): 699-701, 1993.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T: Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan. J. Vet. Med. Sci. 63 (5): 573-575, 2001.
- Schunck B, Kraft W, Truyen U: A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. J. Virol. Methods 55 (3): 427-433, 1995.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al: Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J. Gen. Virol. 82 (12): 3021-3025, 2001.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, et al: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. J. Clin. Microbiol. 42 (3): 1333-1336, 2004.
- Pratelli A, Tempesta M, Greco G, et al: Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. J. Virol. Methods 80 (1): 11-15, 1999.
- 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.
- Shin YS, 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.