

Il cimurro del cane: aspetti diagnostici e scelta dei campioni in funzione della dinamica virologica e sierologica



Canine Distemper Virus (CDV) è l'agente eziologico del cimurro, una malattia infettiva dei carnivori caratterizzata da elevata contagiosità e letalità, soprattutto tra i giovani soggetti. L'imprevedibile evoluzione clinica dell'infezione rende alquanto ostica la diagnosi e, soprattutto, cruciale la scelta dei campioni più opportuni da inviare al laboratorio. D'altro canto, la spiccata contagiosità del virus richiede una tempestività negli accertamenti diagnostici e nel conseguente management del cane infetto. Partendo da due casi clinici estremamente diversi di infezione da CDV, questo studio si propone di valutare i campioni più idonei da inviare al laboratorio ai fini di una diagnosi tempestiva di cimurro.

Due cani con infezione naturale da CDV sono stati sottoposti a rilievi clinici, virologici e sierologici. Da ciascun soggetto sono stati prelevati, ogni 4 giorni circa, campioni di sangue, urine, tamponi congiuntivali, nasali e rettali al fine di valutare la cinetica dell'escrezione virale mediante real time-PCR. I campioni di siero sono stati raccolti ogni settimana per valutare i titoli anticorpali mediante sieroneutralizzazione ed ELISA.

Sia le urine che i tamponi rettali sono risultati positivi in entrambi i soggetti infetti in maniera pressoché costante durante l'intero periodo di osservazione, indipendentemente dall'evoluzione clinica dell'infezione. L'estrema sensibilità delle tecniche biomolecolari e l'affidabilità dei suddetti campioni, peraltro semplici da raccogliere, possono rendere rapida ed efficiente la diagnosi di CDV.

Gabriella Elia^a,
Med Vet

Michele Camero^a,
Med Vet

Giulia Dowgier^a,
Med Vet

Mariangela
La Volpe^b,
Med Chir

Vittorio Larocca^a,
Med Vet

Michele Losurdo^a,
Med Vet

Mariastella
Lucente^a,
Med Vet

Nicola Decaro^a,
Med Vet

Canio
Buonavoglia^a,
Med Vet

INTRODUZIONE

Il cimurro è una malattia infettiva dei carnivori domestici e selvatici, sostenuta da Canine Distemper Virus (CDV), classificato nel genere Morbillivirus della famiglia delle Paramixoviridae.

L'infezione è caratterizzata da elevata contagiosità e mortalità soprattutto tra i giovani soggetti. Il virus è presente nelle secrezioni respiratorie, nelle urine e nelle feci degli animali infetti e può essere trasmesso mediante ae-

Lo studio riporta i dati virologici e sierologici di due cani con quadri clinici assai diversi di cimurro.

rosol ad animali recettivi a contatto. Sebbene possibile, la trasmissione indiretta assume un significato epidemiologico meno rilevante a causa della labilità del virus nell'ambiente. Questo in parte giustifica una maggiore

^a Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Bari, Valenzano (Bari), Italy

^b Lega Nazionale per la Difesa del Cane - Sezione di Molfetta (BA)

* Corresponding Author (gabriella.elia@uniba.it)

Ricevuto: 12/11/2015 - Accettato: 24/03/2016

prevalenza dell'infezione in condizioni di sovraffollamento che generalmente caratterizzano i canili, rifugi e negozi di animali.

Il periodo di incubazione del cimurro è generalmente di 1-2 settimane. Dopo l'infezione per via inalatoria mediante aerosol infetti, il virus presenta uno spiccato linfotropismo e l'invasione degli organi linfoidi corrisponde al primo picco febbrile e al rilievo di linfopenia. Intorno al 7°-9° giorno p.i. si assiste ad una seconda fase viremica, in cui CDV inizia la colonizzazione di tutte le strutture epiteliali e in seguito del sistema nervoso centrale¹. Questo stadio corrisponde all'inizio dell'escrezione virale e l'esito dell'infezione e la severità dei sintomi variano sensibilmente in base al ceppo virale in causa, all'età dell'animale e al suo stato immunitario^{2,3}. Questo giustifica una variabilità clinica dell'infezione che può risultare asintomatica o caratterizzata da una diversa combinazione di sintomi a carico dell'apparato respiratorio, gastroenterico, nervoso e tegumentario⁴. La sintomatologia nervosa può caratterizzare anche la forma cronica di cimurro, presentandosi a distanza di tempo dalle altre manifestazioni cliniche o come unica manifestazione dell'infezione¹. L'imprevedibile evoluzione di un'infezione da CDV, che include anche una viremia di durata variabile, rende alquanto ostica la diagnosi e, soprattutto, cruciale la scelta dei campioni più opportuni da inviare al laboratorio. D'altro canto, la spiccata contagiosità del virus richiede una tempestività negli accertamenti diagnostici e nel conseguente management del cane infetto.

La real time-PCR per CDV è stata impiegata per la valutazione della carica virale presente nei campioni biologici regolarmente raccolti da entrambi i cani.

Lo sviluppo delle metodiche biomolecolari ha sicuramente reso più agevole la diagnosi di CDV e molti studi sono stati condotti per valutare la presenza/persistenza del virus nelle diverse matrici biologiche. Tuttavia, nella maggior parte dei casi si trattava di infezioni sperimentali o, nel caso di infezioni naturali, il campionamento era stato limitato ad alcuni campioni biologici e ad un periodo limitato dell'infezione.

Nella presente nota sono riportati i risultati virologici e sierologici relativi a due cani con infezione naturale da CDV e con una evoluzione clinica diversa.

MATERIALI E METODI

Animali e raccolta dei campioni

I due cani oggetto dello studio, 359/13 e 360/13, indicati rispettivamente con A e B, sono stati ricoverati presso l'Unità di isolamento dell'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Bari, per sospetto di cimurro. I

due soggetti provenivano da un canile di Molfetta, in provincia di Bari, dove era stato segnalato un focolaio di cimurro e dove non si effettuava la profilassi vaccinale.

Quando l'infezione da CDV è stata confermata, i proprietari degli animali hanno autorizzato una terapia di supporto. Quest'ultima, come l'inclusione dei dati raccolti da entrambi gli animali nel presente studio, sono stati contestualmente autorizzati dal Comitato Etico del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Bari.

Gli animali sono stati sottoposti a visite costanti e a terapia di supporto durante tutto il decorso.

Il soggetto A, cucciolo di 3 mesi di età, presentava sintomi respiratori, quali scolo nasale, oculare e tosse, ma era in condizioni generali abbastanza buone e con l'appetito conservato. Dopo qualche giorno dal ricovero, il soggetto manifestava ipertermia (39.5-40°C), anoressia, vomito e diarrea emorragica, con risoluzione degli stessi nell'arco di 3 settimane. L'esame delle feci evidenziava una infestazione da coccidi che veniva trattata con antiparassitari fino alla negativizzazione dell'esame coprologico. Rimaneva costante il rilievo nel cucciolo di abbattimento del sensorio e lieve ipertermia (39.2°C). Un mese dopo il ricovero, il soggetto sviluppava una sintomatologia neurologica progressiva, con atassia, incoordinazione motoria, dismetria e ipermetria, paresi e paralisi, cui seguiva il decesso dopo 9 giorni dall'inizio dei sintomi neurologici.

Il soggetto B, di circa 8 mesi di età, al momento del ricovero presentava lievi sintomi generali di malattia con letargia, febbre, scolo nasale e congiuntivale e ipercheratosi del tartufo (Fig. 1). Quest'ultimo segno clinico lasciava presupporre un'infezione da CDV alquanto retrodatata. Nell'arco di una settimana dal ricovero, si registrava una completa remissione dei sintomi e il soggetto veniva dimesso dopo circa 6 settimane dal ricovero, in condizioni generali abbastanza buone, a parte un evidente dimagrimento. Durante il periodo di osservazione, da ogni soggetto sono stati prelevati, ogni 4 giorni circa, campioni di sangue, urine, tamponi congiuntivali (TC), nasali (TN) e rettali (TR), al fine di valutare la cinetica dell'escrezione virale. I campioni di siero sono stati raccolti ogni settimana per valutare i titoli anticorpali mediante sieroneutralizzazione (VN) ed ELISA.

Preparazione dei campioni

I campioni biologici raccolti dai due soggetti in esame sono stati processati per l'estrazione dell'RNA e DNA mediante il kit QIAamp cadior pathogen mini kit (Qiagen S.p.A., Milano), secondo le istruzioni del manuale.

Real time-PCR per CDV

Per la diagnosi di CDV, i campioni dei due cani raccolti al momento del ricovero sono stati processati in real time-PCR⁵. La stessa metodica è stata poi utilizzata per valu-



Figura 1 - Ipercheratosi del tartufo nel soggetto B.

tare la dinamica di escrezione virale nei due soggetti. L'RNA standard, costruito sul gene della nucleoproteina di CDV, è stato diluito ed i duplicati di ciascuna diluizione, da 1×10^8 a 1×10^1 , sono stati sottoposti a retrotrascrizione contestualmente ai campioni da saggiare. La retrotrascrizione dell'RNA è stata effettuata in un volume di reazione di 20 μ l contenenti PCR buffer 1x (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 5mM, 1mM di ciascun nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Rnase inhibitor 1U, MuLV reverse transcriptase 2.5 U, random hexamers 2.5 U. La sintesi del cDNA è stata effettuata con 1 ciclo a 42°C per 30 minuti, e successiva denaturazione a 99°C per 5 minuti.

Il c-DNA dei campioni e dell'RNA standard così otte-

nuto è stato sottoposto a real time-PCR in un volume di reazione di 50 μ l contenenti 25 μ l di IQTM Supermix (Biorad laboratories Srl, Milano, Italia), 600 nM del primer CDV-F (5'-AGCTAGTTTCATCT-TAACTATCAAATT-3') e CDV-R (5'-TTAACCTCTCCAGAAAACATCATGC-3'), 400nM della sonda CDV-Pb (FAM-ACCCAAGAGCCGGATACATAGTTT-CAATGC-TAMRA).

I campioni sono stati analizzati con il 7500 real time-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizzando il seguente protocollo termico: 10 minuti a 95°C per la fase di attivazione della polimerasi, 45 cicli denaturazione a 95°C per 15 secondi, annealing dei primer a 48°C per 1 minuto ed estensione a 60°C per 1 minuto.

Genotipizzazione

Per definire il genotipo CDV identificato nei due soggetti è stata effettuata una semi-nested multiplex PCR⁶, in grado di valu-

tare l'eterogeneità genetica del gene H.

L'RNA estratto è stato sottoposto a retrotrascrizione e il cDNA adoperato per la prima reazione di PCR. L'amplicone è stato usato come template per una seconda reazione di PCR, allestita con una miscela di primer dai target diversi e specifici di ciascun lineage. In questo modo l'ampiezza del frammento amplificato risulta identificativa per ciascuno dei 4 lineaggi di CDV (Fig. 2).

Per una valutazione sierologica più completa di entrambi i cani è stato messo a punto un test ELISA allestito con virus intero.

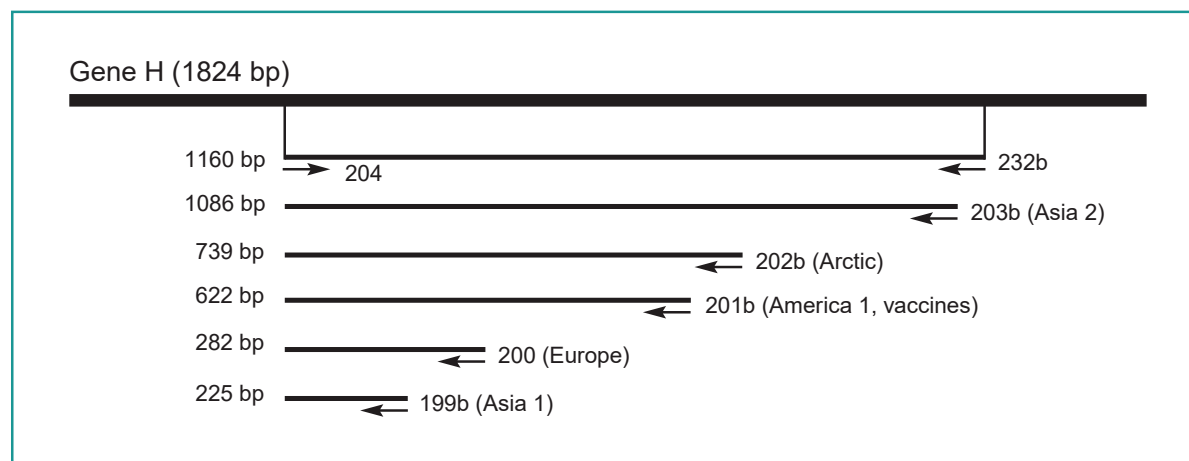


Figura 2 - Schema della strategia di genotipizzazione di CDV.

Screening per altri patogeni

I campioni raccolti sono stati valutati per la presenza di altri patogeni importanti del cane, utilizzando metodiche biomolecolari ampiamente descritte e standardizzate. Si è dunque provveduto alla ricerca di: parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2)^{7,8}; adenovirus del cane tipo 1 e 2 (CAV-1 and CAV-2)⁹; coronavirus enterico (CCoV)¹⁰; coronavirus respiratorio¹¹ e reovirus¹².

Esami sierologici

L'immunità umorale è stata monitorata parallelamente con il test di sieroneutralizzazione (SN) e un test ELISA.

Per la SN sono state allestite diluizioni a raddoppio dei sieri in esame, partendo dalla diluizione 1:2. A ciascuna diluizione dei sieri sono state aggiunte 100 Dosi Infettanti Tessuto Colture₅₀ (TCID₅₀) di CDV, ceppo Onderstepoort e, dopo 60 min di contatto a temperatura ambiente, a ciascuna miscela siero-virus sono state aggiunte 2×10^4 cellule VERO.

La lettura è stata effettuata dopo 72 ore di incubazione a 37°C, considerando come titolo neutralizzante per ciascun siero la più alta diluizione in grado di neutralizzare il virus ed inibire, quindi, la formazione degli effetti citopatici sulle cellule.

L'importanza di una diagnosi tempestiva di CDV risiede nella possibilità di mettere in atto le misure più idonee per contenere la diffusione del virus, soprattutto in situazioni epidemiologiche a rischio.

I medesimi sieri sono stati testati parallelamente in ELISA. Il test è stato allestito con l'antigene intero CDV, ottenuto mediante ultracentrifugazione ($140\,000 \times g$ a 4°C) del surnatante di cellule VERO, raccolto dopo 3 giorni dall'infezione con lo stipite Onderstepoort. Il pellet così ottenuto e risospeso in PBS è stato diluito in tampone carbonato ($25 \mu\text{g/ml}$) ed utilizzato quale antigene per il *coating* overnight a +4°C di piastre a 96 pozzetti (Polysorb, Nunc). Dopo quattro lavaggi rapidi in PBS contenente lo 0.05% di Tween 20 (PBS-T), a ciascun pozzetto è stata aggiunta la soluzione di bloccaggio (0.2% di gelatina in tampone carbonato) e la piastra lasciata incubare a 37°C per 90 min. Dopo ulteriori lavaggi rapidi, i sieri in esame sono stati diluiti 1:50 e lasciati ad incubare nei relativi pozzetti a 37°C per 90 min. Sono stati effettuati altri lavaggi della piastra, quindi l'incubazione con anticorpi anti-IgG di cane coniugati con perossidasi per 1 h a 37°C.

Dopo quattro lavaggi e la successiva aggiunta del substrato [2,2'-azino-di-(3-ethylbenzo-thiazoline sulphonate), ABTS, Sigma-Aldrich], la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 25 min e, successivamente, è stata

determinata la densità ottica a 405 nm (OD405) mediante spettrofotometro.

Il cut off di 0.042 è stato determinato calcolando la media più tre deviazioni standard dei valori OD di 10 sieri di controllo, tutti di collezione, ottenuti da cani sieronegativi per CDV.

RISULTATI

La conferma dell'infezione da CDV è stata ottenuta con il test real time-PCR effettuato sui campioni raccolti al momento del ricovero dai due animali. Nel cucciolo A tutti i campioni (TN, TC, TR, sangue e urine) erano risultati positivi, mentre nel soggetto B erano risultate positive solo le urine ed il TR. L'analisi genotipica mediante semi-nested multiplex PCR ha permesso di classificare il ceppo CDV come appartenente al lineaggio Artico. Entrambi gli animali sono, inoltre, risultati negativi allo screening per gli altri patogeni del cane.

Valutazione dell'escrezione virale

La quantificazione dell'RNA virale è stata effettuata a partire dal giorno di ricovero fino al decesso per il soggetto A, mentre si è protratta fino alla clearance virale nel soggetto B.

Il soggetto A ha mostrato un'escrezione virale costante in tutti i campioni raccolti con titoli più elevati nelle urine, TR, TN e TC (Tab. 1). Anche il giorno prima del decesso (37° giorno dal ricovero), in presenza di sintomatologia nervosa conclamata, tutti i campioni prelevati risultavano positivi con titoli superiori a 1.06×10^4 copie RNA/ μl di template.

Il soggetto B ha presentato un andamento dell'infezione in linea con una risposta immunitaria attiva. L'escrezione virale è stata costante nelle urine per tutto il periodo di osservazione (44° giorno di osservazione). Titoli più elevati sono stati registrati tra il 10° e 22° giorno di osservazione con un valore medio di 1.47×10^4 copie RNA/ μl di template (Tab. 1). Nel restante periodo il titolo medio riscontrato nelle urine è stato di 7.22×10^2 RNA/ μl di template.

I TR sono risultati costantemente positivi dal primo al 32° giorno di osservazione con il valore più elevato (5.71×10^4 RNA copie/ μl di template) registrato al 10° giorno. Gli altri campioni, negativi al momento del ricovero, hanno successivamente mostrato una positività incostante, sempre a titoli piuttosto bassi, e si sono completamente negativizzati a partire dal 32° giorno di osservazione.

Valutazione sierologica

Come prevedibile dal differente decorso clinico, l'immunità umorale valutata nei due soggetti ha presentato notevoli differenze.

Tabella 1 - Determinazione dell'RNA virale di CDV mediante real time-PCR in 2 cani (A e B) con infezione naturale

| Giorni di osservazione | TN | | TC | | TR | | S | | U | |
|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 1 | 5.60x10 ⁵ | neg | 5.60x10 ⁵ | neg | 3.72x10 ⁵ | 3.10x10 ² | 5.95x10 ⁵ | neg | 9.29x10 ⁴ | 3.37x10 ² |
| 5 | 2.01x10 ⁶ | neg | 1.31x10 ⁵ | 1.52x10 ³ | 7.99x10 ⁵ | 7.24x10 ² | 3.59x10 ⁵ | neg | 4.87x10 ⁶ | 2.88x10 ³ |
| 10 | 3.86x10 ⁵ | 1.06x10 ³ | 1.63x10 ⁵ | neg | 1.62x10 ⁶ | 5.71x10 ⁴ | 1.32x10 ⁵ | 1.17x10 ³ | 6.02x10 ⁵ | 2.02x10 ⁴ |
| 14 | 1.25x10 ⁶ | 1.96x10 ² | 1.46x10 ⁶ | neg | 9.45x10 ⁵ | 3.53x10 ² | 9.57x10 ⁴ | neg | 8.29x10 ⁴ | 5.04x10 ³ |
| 18 | 3.12x10 ⁶ | 8.56x10 ² | 3.22x10 ⁵ | 8.66x10 ² | 7.75x10 ⁵ | 8.06x10 ² | 1.14x10 ⁵ | neg | 1.91x10 ⁵ | 8.70x10 ³ |
| 22 | 3.07x10 ⁶ | 3.49x10 ² | 2.26x10 ⁶ | 1.09x10 ³ | 7.94x10 ⁵ | 8.71x10 ² | 4.71x10 ⁴ | 1.06x10 ² | 6.20x10 ⁵ | 2.49x10 ⁴ |
| 27 | 9.01x10 ⁵ | neg | 6.67x10 ⁵ | 9.77x10 ² | 3.32x10 ⁵ | 1.49x10 ³ | 4.71x10 ⁴ | 4.58x10 ² | 9.24x10 ⁴ | 5.26x10 ² |
| 32 | 4.46x10 ⁵ | neg | 2.21x10 ⁵ | neg | 5.25x10 ⁵ | 7.50x10 ² | 3.20x10 ⁴ | neg | 7.85x10 ⁴ | 2.83x10 ² |
| 37 | 4.65x10 ⁴ | neg | 5.03x10 ⁵ | neg | 8.04x10 ⁴ | neg | 1.06x10 ⁴ | neg | 9.81x10 ⁴ | 7.36x10 ² |
| 44 | ND | neg | ND | neg | ND | neg | ND | neg | ND | 1.19x10 ² |

A: cane A; B: cane B; TN: tampone nasale; TC: tampone congiuntivale; TR: tampone rettale; S: sangue intero; U: urine; ND: non determinato.

I campioni di siero prelevati dal cucciolo A, deceduto con sintomatologia neurologica, sono risultati costantemente negativi in SN. Il test ELISA ha invece evidenziato una debolissima risposta anticorpale con valori oscillanti da 0.067 a 0.071, e pressoché costanti nell'intero periodo di osservazione (37 giorni).

Il soggetto B di 8 mesi, e con una sintomatologia poco evidente, ha presentato titoli anticorpali in SN compresi tra 1:160 e 1:320. I risultati del test ELISA, attestandosi su un valore medio di 0.245, hanno confermato una buona sierconversione e hanno dimostrato che nei campioni di siero in esame erano presenti elevati livelli di anticorpi IgG essendo questi gli unici anticorpi rilevabili con il sistema ELISA allestito.

DISCUSSIONE

Il cimurro rappresenta ancora oggi una malattia infettiva altamente contagiosa e potenzialmente letale per il cane. Una diagnosi tempestiva e affidabile dell'infezione può avere ricadute epidemiologiche importanti, soprattutto se interessa soggetti provenienti da allevamenti o da canili.

Nelle fasi iniziali della malattia, nelle quali non si è ancora manifestata la forma nervosa, o in animali che presentano una forma clinica molto lieve, è complicato formulare una diagnosi clinica a causa di sintomi poco specifici e molto variabili.

I due casi clinici di cimurro, oggetto del presente studio, hanno evidenziato da un lato l'estrema variabilità del decorso clinico della malattia, dall'altro l'importanza nella scelta del campione da testare per una diagnosi certa di CDV.

Il cucciolo A ha presentato un decorso clinico in cui, esaurita completamente la sintomatologia sistemica nell'ar-

L'estrema sensibilità delle tecniche biomolecolari e l'affidabilità di campioni semplici da raccogliere, quali urine e tamponi rettali, possono facilitare la diagnosi di CDV.

co delle 3 settimane dal ricovero, le condizioni generali sono tornate soddisfacenti per un periodo di circa 10 giorni, in cui sarebbe stato oggettivamente difficile diagnosticare CDV. In questo periodo, tuttavia, in tutti i campioni prelevati dal cucciolo sono stati registrati alti titoli virali, ricalcando in tal modo l'importanza di una diagnosi precoce della malattia al fine di evitare l'ulteriore diffusione del virus.

Come prevedibile, tutti i prelievi di siero del cucciolo A sono risultati costantemente negativi in SN e debolmente positivi in ELISA. Questi risultati sono assolutamente in linea con la dinamica di produzione anticorpale in corso di infezione da CDV. Nei morbillivirus, la proteina N rappresenta la proteina immunodominante, in grado di stimolare un'importante, nonché precoce, risposta umorale in corso di infezione¹³. In quest'ottica, test diagnostici basati sulla proteina N o, come nel nostro caso, su tutti gli antigeni virali, risultano molto più sensibili rispetto alla SN per valutare lo stato sierologico di un cane infetto da CDV. Inoltre è stato osservato che in alcuni casi di infezione acuta da CDV si sviluppa una risposta immunitaria molto limitata nei confronti delle glicoproteine H ed F che veicolano gli epitopi neutralizzanti, a fronte di una risposta umorale verso la N assolutamente invariata.

Completamente diverso è stato il profilo sierologico registrato nel cane B che, già al momento del ricovero, pre-

sentava un titolo elevato in SN e in ELISA. La spiccata sieroconversione poteva essere giustificata o dall'età del soggetto al momento dell'infezione, o da pregressi contatti con il virus patogeno che da tempo circolava nel canile.

In questo cane è stata osservata un'evoluzione subclinica dell'infezione, con guarigione nel giro di una settimana. Tuttavia, anche in questa situazione di difficile sospetto diagnostico, le urine si sono confermate campione di elezione per la diagnosi di cimurro.

Al momento del ricovero, infatti, ad eccezione delle urine e del TR, tutti gli altri campioni, compreso il sangue, erano risultati negativi mentre, durante il periodo di osservazione, sono risultati positivi in maniera incostante e a basso titolo e, rispetto alle urine, si erano negativizzati precocemente. Nel caso specifico, non sottoponendo ad esame per CDV le urine ed, eventualmente, il TR, sarebbe stato acquisito un risultato falso negativo in molti momenti dell'infezione, precludendo la possibilità di mettere in atto le misure più idonee per contenere la diffusione del virus.

Il sangue intero, i tamponi congiuntivali e le urine sono considerati campioni di elezione per la diagnosi di CDV^{14,15,16}, sebbene la loro affidabilità debba essere valutata in funzione dell'evoluzione clinica dell'infezione e dello stadio della medesima. Nel presente studio solo le urine sono risultate positive in entrambi i soggetti infetti, in tutti i momenti dei prelievi, a dimostrazione della maggiore attendibilità di questo campione rispetto agli altri, indipendentemente dall'evoluzione clinica dell'infezione.

Un dato interessante, già riportato in letteratura¹⁷, è quello relativo ai tamponi rettali che in entrambi i soggetti infetti sono risultati positivi, sebbene per un tempo leggermente inferiore rispetto alle urine.

La recrudescenza di focolai di cimurro¹⁸, collegata quasi sicuramente all'importazione illegale di cani dai Paesi dell'Est Europeo, richiede che venga implementata da un lato la profilassi vaccinale, dall'altro un sistema diagnostico rapido e affidabile per poter mettere in atto idonee misure di profilassi diretta soprattutto nei canili e negli allevamenti.

PUNTI CHIAVE

- L'evoluzione clinica estremamente variabile del cimurro rende difficile una diagnosi precoce dell'infezione e cruciale la scelta del campione biologico più idoneo.
- Indipendentemente dallo stadio dell'infezione e dalle sue manifestazioni cliniche, le urine si attestano come campione biologico affidabile per una diagnosi certa di cimurro.
- In considerazione di una recrudescenza dell'infezione da CDV si rende necessario implementare sia la profilassi vaccinale che la metodologia diagnostica.

Canine distemper: the importance of choosing appropriate biological samples for diagnosis

Canine distemper virus (CDV) is the cause of a severe and highly contagious disease in dogs. The unpredictable and variable course of CDV-related disease may hamper correct diagnosis of infection and makes it crucial the collection of samples suitable for laboratory confirmation. By the way, considering the great infectious potential of the disease, the detection of CDV from different biological specimens is essential of determining subsequent patient management. In this note, the clinical findings, the virological and serological results of natural CDV infection in two dogs from an outbreak observed in a kennel are reported.

We were able to follow canine distemper disease in two naturally infected dogs, collecting different biological matrices during the entire period of infection. Whole blood, urine, rectal, nasal and conjunctival swabs were screened for viral excretion by real time-PCR. Serum samples were collected once a week and tested in virus neutralization and ELISA assays.

By real time-PCR, viral RNA was detected and quantified, suggesting that urine and rectal swabs would be useful for ante-mortem diagnosis of distemper in dogs, regardless of the clinical stage and form of the illness.

BIBLIOGRAFIA

1. Appel MJG. Virus Infections of Carnivores, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1987, pp. 133-159.
2. Appel MJG. Pathogenesis of canine distemper. American Journal of Veterinary Research 30: 1167-1182, 1969.
3. Wunschmann A, Alldinger S, Kremmer E, *et al.* Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. Veterinary Immunology and Immunopathology 67: 101-116, 1999.
4. Greene CE, Appel MJG. Infectious Diseases of the Dog and Cat, ed. Greene CE, 2nd ed., WB Saunders, Philadelphia, PA, 1998, pp. 9-22.
5. Elia G, Decaro N, Martella V *et al.* Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods 136: 171-176, 2006.
6. Martella V, Elia G, Lucente MS *et al.* Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. Veterinary Microbiology 122: 32-42, 2007.
7. Decaro N, Elia G, Martella V *et al.* A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. Veterinary Microbiology 105: 19-28, 2005.
8. Decaro N, Elia G, Martella V *et al.* Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. Journal of Virological Methods. 133: 92-99, 2006.
9. Hu RL, Huang G, Qiu W, *et al.* Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. Veterinary Research Communications 25: 77-84, 2001.
10. Decaro N, Martella V, Ricci D *et al.* Genotyping-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and II RNA in faecal samples of dogs. Journal of Virological Methods 130: 72-78, 2005.
11. Erles K, Toomey C, Brooks HW *et al.* Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. Virology, 310: 216-223, 2003.
12. Decaro N, Campolo M, Desario C *et al.* Virological and molecular characterization of a type 3 mammalian reovirus strain isolated from a dog with diarrhea in Italy. Veterinary Microbiology 109: 19-27, 2005.
13. Von Messling V, Harder TC, Moennig V *et al.* Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology, 37: 1049-1056, 1999.
14. Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR *et al.* Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Research in Veterinary Science. 80: 116-119, 2006.
15. An DJ, Kimb TY, Songc DS *et al.* An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have caninedistemper. Journal of Virological Methods 147: 244-249, 2008.
16. Shin YJ, Cho KO, Cho HS *et al.* Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. Australian Veterinary Journal, 82: 83-86, 2004.
17. Fischer CD, Ikuta N, Canal CW *et al.* Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. Journal of Virological Methods, 194: 39-45, 2013.
18. Griot C, Vandeveld M, Schobesberger M *et al.* Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. Animal Health Research Reviews 4: 1-10, 2003.



AnmviOggi è il quotidiano on-line di informazione professionale dell'ANMVI. Il primo e unico quotidiano di informazione professionale via internet che ogni giorno pubblica notizie sui maggiori fatti di interesse per la Professione Veterinaria. AnmviOggi viene inviato gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'Anmvi, a chi ne fa richiesta ed è disponibile sul sito www.anmvioggi.it

Vet Journal pubblica notizie e reportage di tutti i più importanti eventi nazionali ed internazionali e fornisce una informazione scientifica rigorosa sul mondo della medicina veterinaria e delle bioscienze in generale. Fornisce dal 2004 un servizio di traduzione in italiano degli abstract dei più importanti lavori della letteratura scientifica internazionale. La newsletter di Vet Journal viene inviata gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'ANMVI, a chi ne fa richiesta il lunedì, il mercoledì e il venerdì ed è disponibile sul sito www.evsrl.it/vet.journal/



Chi non li ricevesse ed è interessato ne può far richiesta per e-mail alle redazioni: anmvioggi@anmvi.it - efebbo@scivac.it