

ENTERITI VIRALI DEL CANE: RISULTATI DI UN'INDAGINE VIROLOGICA

ANNAMARIA PRATELLI¹, DOMENICO BUONAVOGLIA², VITO MARTELLA¹,
ALESSANDRA CAVALLI¹, ANTONIO LAVAZZA³, CANIO BUONAVOGLIA¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale - Sezione Malattie Infettive - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bari

²Istituto di Malattie Infettive - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Messina

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale - Brescia

Riassunto

Vengono riportati i risultati di un'indagine virologica su campioni di feci di cani con enterite. Sono stati esaminati complessivamente 223 campioni utilizzando il Microscopio Elettronico (ME), il test di emoagglutinazione (EA) per il parvovirus del cane (CPV-2), prove di isolamento su colture cellulari e la nested-Polymerase Chain Reaction (n-PCR) per il coronavirus del cane (CCV).

CPV-2 è stato messo in evidenza in 82 campioni, mentre CCV è stato evidenziato in 30 campioni su 71 esaminati. Due campioni sono risultati positivi per rotavirus. L'esame al ME ha evidenziato in due campioni la presenza di particelle virali *enterovirus-like*.

Summary

The results of a virological research on faecal samples from dogs with enteritis are reported. 223 samples have been examined using Electron Microscopy (EM), haemoagglutination test (EA) for canine parvovirus (CPV-2), isolation on cell culture and the nested-Polymerase Chain Reaction (n-PCR) for canine coronavirus (CCV).

82 samples resulted positive for CPV-2. 30 samples out of 71 resulted positive for CCV, and 2 for rotavirus. EM also revealed in two samples viral particles enterovirus-like.

INTRODUZIONE

L'isolamento di un coronavirus dalle feci di cani affetti da enterite nel 1971 in Germania¹ ha suscitato i primi interessi nei confronti dei virus patogeni intestinali del cane. Le ricerche sulle enteriti virali si sono poi intensificate a partire dal 1978, a seguito della comparsa di numerosi focolai di gastroenterite nei cuccioli, riconducibili alla diffusione di un nuovo parvovirus del cane, CPV-2².

Attualmente i virus sono riconosciuti come una delle più comuni cause di sindrome gastroenterica nel cane. CPV-2, il coronavirus (CCV) e i rotavirus sono considerati i patogeni più importanti, mentre adenovirus, astrovirus, calicivirus, enterovirus e parainfluenzavirus sono stati segnalati solo occasionalmente³.

CPV-2, così denominato per distinguerlo dal parvovirus tipo 1 isolato nel 1967 da Binn⁴, può determinare una forma miocardica in cuccioli di 2-4 settimane di età, privi di anticorpi specifici, mentre in cuccioli di età più adulta determina una grave forma enterica⁵.

Il ruolo di CCV come agente eziologico di enterite nel cane non è ancora ben definito anche se studi sierologici evidenziano percentuali di sieropositività talora assai elevate⁶. L'infezione da CCV determina generalmente forme asintomatiche negli adulti, mentre i cuccioli possono essere colpiti in modo grave con comparsa di diarrea e vomito, sovente per il sovrapporsi di forme batteriche, parassitarie o di concomitanti infezioni virali⁷.

I *rotavirus* sono la principale causa di diarrea neonatale nell'uomo e negli animali. Nel cane le segnalazioni di isolamento di rotavirus in corso di forme diarroiche sono invece limitate^{8, 9, 10} e il ruolo di questi virus è considerato di scarsa importanza. Indagini sierologiche hanno tuttavia evidenziato presenza di anticorpi nella maggior parte dei cani adulti¹¹. L'infezione da rotavirus nel cane di solito ha decorso subclinico o causa forme lievi di diarrea, accompagnate da anoressia e vomito, per lo più nei cuccioli di età inferiore a 2 settimane³.

In corso di gastroenteriti sono stati descritti diversi altri virus. Particelle *Astrovirus-like* sono state frequentemente

ritrovate in feci di cani sani nonché di cani affetti da diarrea^{12, 13, 14}. Benché gli astrovirus siano già noti come patogeni intestinali del suino e dell'uomo¹⁵, la loro effettiva patogenicità nel cane non è stata ancora dimostrata.

Un virus morfologicamente simile ai calicivirus è stato in più occasioni isolato da cani affetti da diarrea, delle volte in associazione con altre infezioni virali^{16, 17, 18}.

L'osservazione su larga scala al ME di campioni di feci ha permesso di evidenziare inoltre particelle *papovavirus-like*, *torovirus-like*, *picornavirus-like*¹⁹, paramixovirus e adenovirus¹⁴.

Nella presente nota si riportano i risultati di indagini virologiche condotte su campioni di feci di cuccioli con enterite.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati esaminati complessivamente 223 campioni di feci di cuccioli con enterite raccolti in diverse province del sud Italia e del nord Italia, nonché da cani importati dall'Ungheria.

Esami al ME

L'osservazione al ME è stata effettuata su 115 campioni. Ogni campione è stato sospeso in acqua distillata (10% p/v) e immediatamente omogeneizzato. Dopo due cicli di congelamento e scongelamento, il campione è stato centrifugato a 4000 x g per 20' e a 9300 x g per 10'. Una aliquota (85 µl) del surnatante è stata quindi ultracentrifugata in *Airfuge Beckman* per 15' a 21 psi (82000 x g) utilizzando un rotore A 100 con specifici adattatori per una griglia di 3 mm che consente di pellettare direttamente le particelle virali su griglie di rame rivestite di Formvar e carbonato. La colorazione negativa del preparato è stata realizzata utilizzando il sale sodico dell'acido fosfotungstico al 2% (pH 6,8). Per l'osservazione è stato utilizzato il ME a trasmissione *Philips CM 10* a 80 kV da 19000 a 39000 ingrandimenti.

Test EA

Su tutti i campioni di feci (223) è stata effettuata la ricerca di CPV-2 utilizzando il test EA in presenza di globuli rossi di suino all'1%. Per la prova è stato impiegato il surnatante di ciascun campione omogenato al 10% in D-MEM e centrifugato a 3000 x g per 20 minuti. La lettura dei risultati è stata effettuata dopo 4 h di incubazione a +4°C.

IEA

Tutti i campioni positivi al test EA sono stati tipizzati come varianti CPV-2 con la tecnica IEA utilizzando 4 anticorpi monoclonali (MoAbs) denominati A4E3, B4A2, C1D1, B4E1, forniti dal dr. Parrish (Cornell University -

Ithaca - New York - USA). In base alla reattività nei confronti dei MoAbs è stato possibile tipizzare gli stipti CPV come varianti 2a o 2b²⁰.

Isolamento su cellule

Le prove di isolamento sono state effettuate su 157 campioni, dei quali 82 erano risultati positivi al test EA per CPV, 2 erano risultati positivi al ME per rotavirus, 2 erano risultati positivi al ME per *enterovirus-like* e 4 per CCV. Sono state utilizzate tre diverse linee cellulari:

- 1) cellule in linea continua di fibroma di cane: A-72.
- 2) cellule in linea continua di rene di cane: *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK).
- 3) cellule in linea continua di rene di scimmia: MA-104.

I campioni di feci sono stati omogenati al 10% in D-MEM contenente antibiotici (5000UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomycin, 10 µg/ml anfotericina), e quindi centrifugati a 3000 x g per 20' a +4°C. Il surnatante è stato utilizzato per inoculare le cellule.

Per l'isolamento di CPV-2 e CCV sono state utilizzate le cellule A-72.

Per l'isolamento di rotavirus sono stati utilizzati monostrati di cellule MA-104 di 24 ore inoculate con il surnatante delle feci diluito 1:2 in D-MEM contenente 1000 µg/ml di tripsina. Dopo 60' di adsorbimento a 37°C, ai monostrati cellulari è stato aggiunto D-MEM arricchito con l'1% di siero fetale bovino e 5 µg/ml di tripsina.

Le prove di isolamento per *enterovirus-like* sono state effettuate sulle cellule MDCK.

Test IFI

L'identificazione degli stipti CPV-2, CCV e rotavirus è stata effettuata con il test IFI utilizzando un siero di cane monospecifico per CPV-2, MoAbs per CCV e un siero iperimmune di coniglio per rotavirus.

nested-PCR

Per la ricerca di CCV nelle feci è stato impiegato un test n-PCR messo a punto recentemente²¹.

I campioni di feci (n.71) sono stati diluiti 1:100 in PBS e quindi centrifugati per 5' a 8000 x g. L'estrazione dell'RNA genomico è stata effettuata con il kit *RNeasy total RNA Kit* (Qiagen GmbH - Germany) a partire da 1 ml del surnatante. La sequenza target scelta per l'amplificazione è un segmento del gene che codifica per la proteina transmembranaria M di CCV. Per la sintesi del c-DNA è stato utilizzato il *primer antisense* CCV2, e la reazione di retrotrascrizione è stata condotta a 37°C per 30' con una fase finale di 94°C per 5'.

La PCR, utilizzando il *primer sense* CCV1, ha previsto 34 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 1', allineamento a 55°C per 1' e polimerizzazione a 72°C per 3'. Per la n-PCR 20 µl della diluizione 1:100 del primo amplificato sono stati sottoposti al secondo ciclo di amplificazione utilizzando il *primer* CCV2 e il *primer* interno CCV3 e mantenendo le stesse procedure di cicizzazione.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati riassuntivi degli esami di laboratorio eseguiti sui campioni di feci.

L'osservazione al ME ha permesso di evidenziare particelle virali morfologicamente riconducibili a parvovirus (Fig. 1) in 35 campioni sui 115 esaminati. In 4 campioni sono state evidenziate particelle virali pleomorfe di 90-120 nm di diametro con *spikes* tipici dei coronavirus (Fig. 2). In 2 campioni sono stati evidenziati rotavirus (Fig. 3) e in altri 2 campioni sono state osservate particelle virali *enterovirus-like*.

Nelle prove di EA per CPV-2 sono risultati positivi 82 campioni che mediante tipizzazione con i MoAbs sono stati identificati come variante 2a (68 stipiti) e variante 2b (14 stipiti). Al riguardo si fa presente che la variante CPV-2b è stata messa in evidenza solo in alcuni campioni prelevati in Puglia.

Le prove di isolamento su cellule hanno permesso di isolare oltre agli 82 stipiti CPV-2, anche 3 stipiti CCV (Figg. 4 A e B) e 2 stipiti rotavirus (Figg. 5 A e B).

L'identificazione mediante il test IFI degli stipiti isolati ha fornito i risultati attesi. Nelle cellule A-72 inoculate con gli stipiti CPV-2 è stata evidenziata una tipica fluorescenza intranucleare (Fig. 6), mentre nelle cellule A-72 e MA-104 inocu-

late rispettivamente con i coronavirus e con i rotavirus è stata evidenziata una fluorescenza citoplasmatica (Figg. 7 e 8).

Secondo quanto atteso, l'amplificato è risultato di grandezza pari a 230 bp. Sono risultati positivi per CCV 30 campioni sui 71 esaminati (Fig. 9).

DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine effettuata hanno ulteriormente confermato che nel determinismo delle gastroenteriti dei cuccioli, i virus svolgono un ruolo fondamentale e rappresentano gli agenti patogeni di più frequente riscontro.

Oltre alla evidenziazione di CPV-2 in una percentuale elevata di campioni di feci (82/223), è interessante il dato relativo all'isolamento di rotavirus da due campioni di feci di cuccioli con gravi sintomi di gastroenterite.

Tra le metodiche utilizzate per la diagnosi eziologica, le prove di isolamento su cellule, che notoriamente risultano lunghe e laboriose, per alcuni patogeni quali CCV non sembrano costituire un metodo sensibile. In effetti CCV è stato isolato solo da 3 campioni sui 30 risultati positivi in n-PCR. Questo dato, che comunque richiede ulteriori

Tabella 1
Risultati degli esami di laboratorio su feci di cani con gastroenterite

	EA	ME	ISOLAMENTO	n-PCR
N. CAMPIONI ESAMINATI	223	115	157	71
CPV-2	82	35	82	NE
CCV	NE	4	3	30
ROTA VIRUS	NE	2	2	NE
ENTERO-LIKE VIRUS	NE	2	0	NE

Legenda:

EA: Emoagglutinazione

ME: Microscopio Elettronico

ISOLAMENTO: Cellule A-72, MDCK, MA-104

n-PCR: Nested-Polymerase Chain Reaction

NE: Non Eseguito

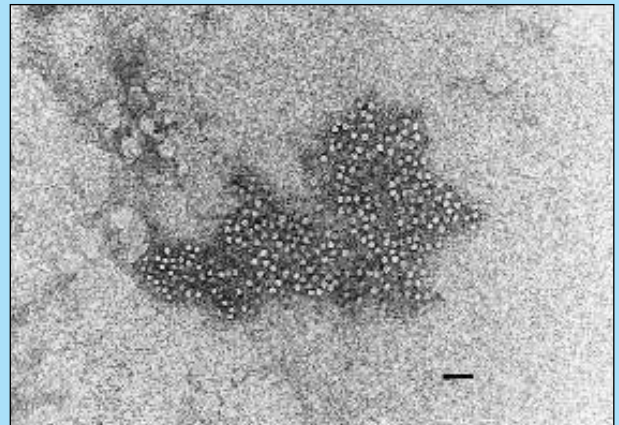


FIGURA 1 - Particelle virali di parvovirus del cane al ME. Colorazione negativa. Barra: 100 nm.

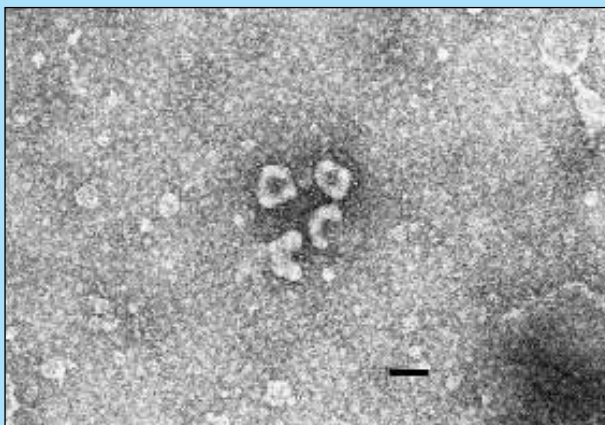


FIGURA 2 - Coronavirus del cane al ME. Colorazione negativa. Barra 100 nm.

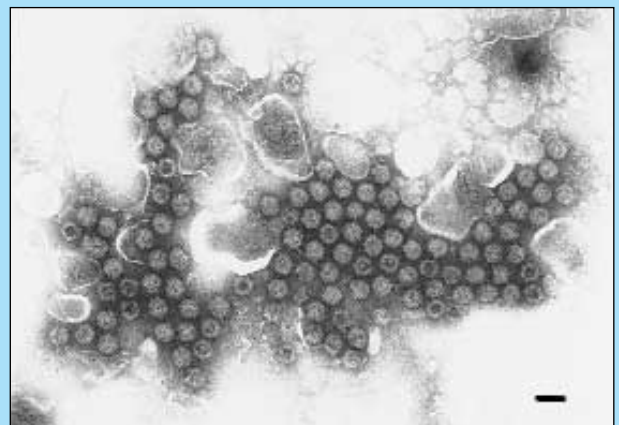


FIGURA 3 - Particelle virali di rotavirus del cane. Colorazione negativa. Barra: 100 nm.

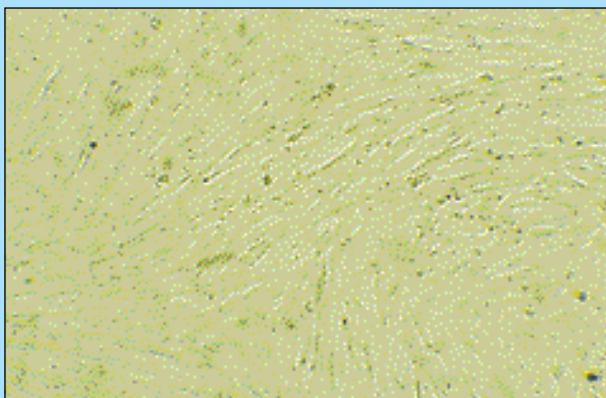
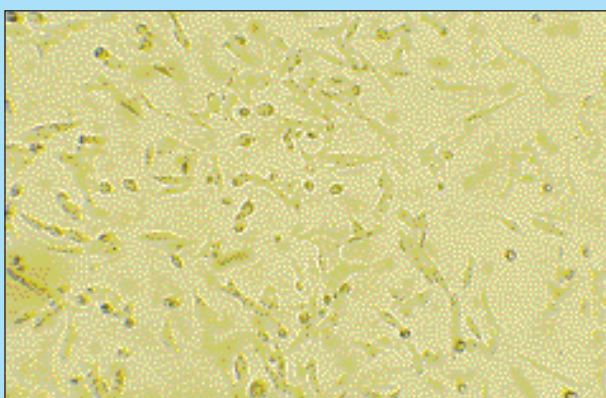

Figura 4A

Figura 4B

FIGURA 4 - (A) Monostrato di cellule A-72 di controllo. **(B)** Monostrato di cellule A-72 con ecp da CCV.

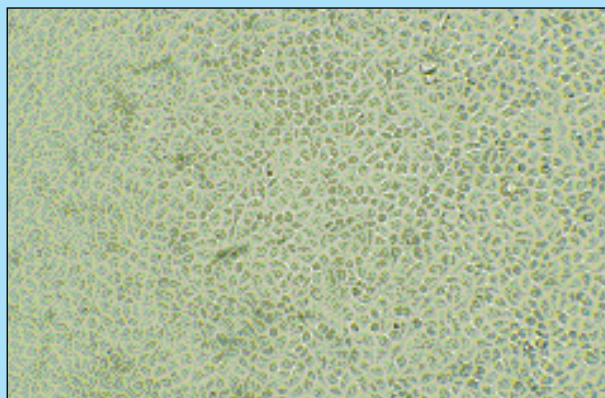
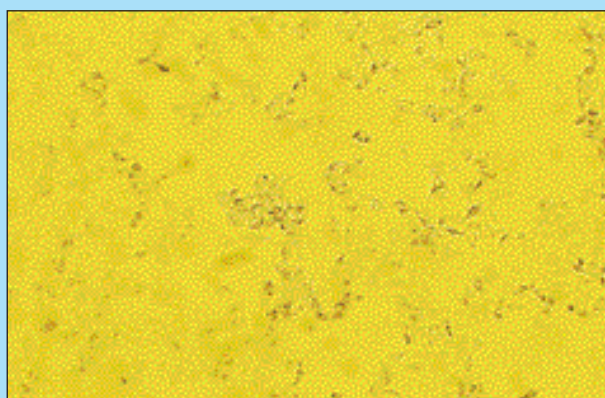

Figura 5A

Figura 5B

FIGURA 5 - (A) Monostrato di cellule MA104 di controllo. **(B)** Monostrato di cellule MA104 con ecp da rotavirus.

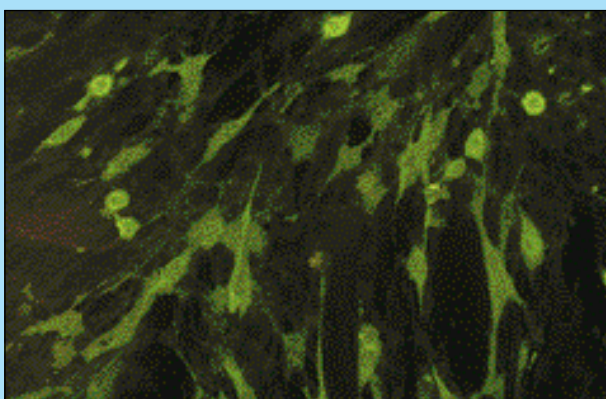


FIGURA 6 - Cellule A-72 infettate con CPV-2. Fluorescenza intranucleare.

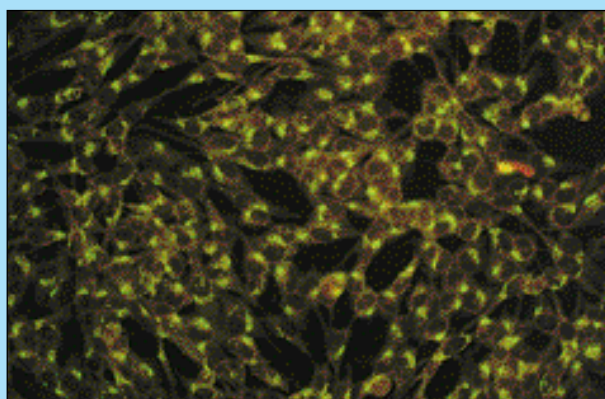


FIGURA 7 - Cellule A-72 infettate con CCV. Fluorescenza intracitoplasmatica.

approfondimenti e conferme, permette di fare alcune considerazioni di tipo virologico ed epidemiologico. La scarsa sensibilità del test di isolamento su cellule per CCV rispetto alle prove di PCR può essere attribuito al fatto che CCV si denatura con estrema facilità nell'ambiente esterno²² e quindi il campione può risultare falso negativo. Viene quindi ulteriormente confermato che l'isolamento su cellule non può essere utilizzato come test di elezione per la ricerca di CCV.

Risulta inoltre evidente che la diffusione di CCV nella popolazione canina finora è stata sicuramente sottostimata e che a questo virus è stato attribuito un ruolo di scarsa importanza nel determinismo delle gastroenteriti in quanto, a fronte di elevate percentuali di positività sierologica⁶, gli isolamenti di CCV da campioni di feci erano scarsi. Alla luce dei risultati della presente indagine, CCV può essere invece ritenuto oltre che un patogeno molto diffuso anche un importante agente causale di gastroenterite del cane.

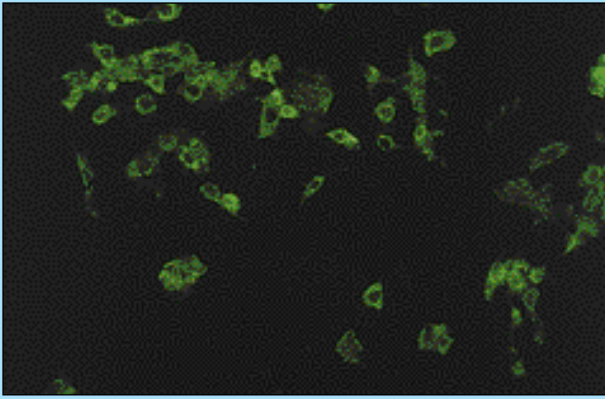


FIGURA 8 - Cellule MA104 infettate con rotavirus. Fluorescenza intracitoplasmatica.

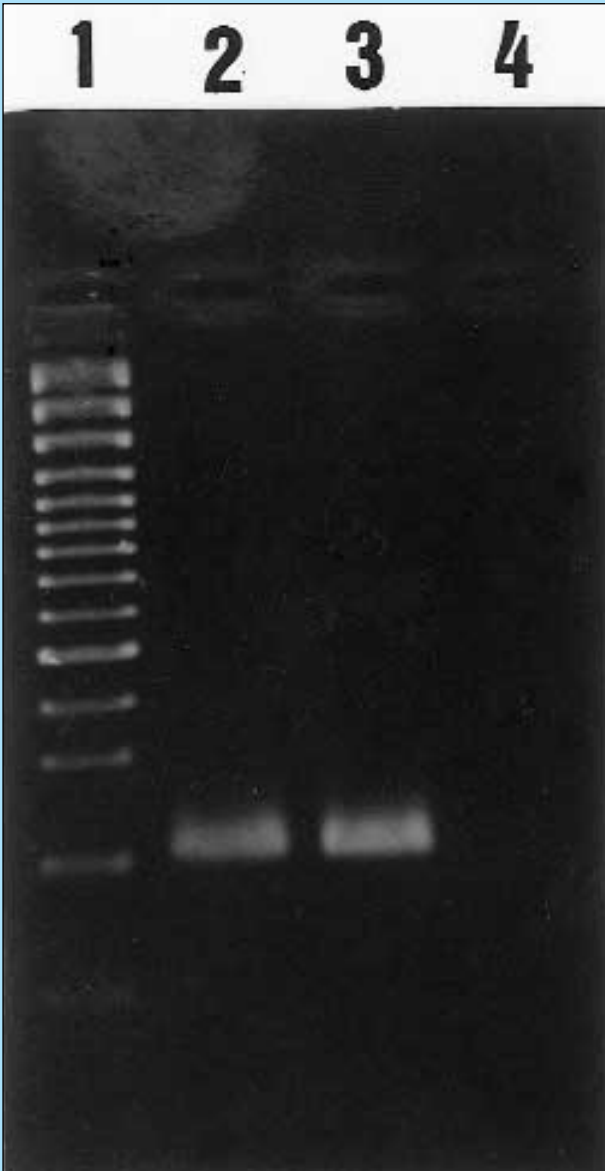


FIGURA 9 - n-PCR per CCV. Linea 1: marker (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas); Linea 2 e 3: campioni positivi (230 bp); Linea 4: controllo negativo.

Parole chiave

Cane, enterite, parvovirus, coronavirus, rotavirus.

Key words

Dog, enteritis, parvovirus, coronavirus, rotavirus.

Abbreviazioni

CPV-2: *canine parvovirus type 2*. CCV: *canine coronavirus*. ME: microscopio elettronico. EA: emoagglutinazione. D-MEM: *Dulbecco-Minimal Essential Medium*. IEA: Inibizione dell'Emoagglutinazione. IFI: immunofluorescenza indiretta. n-PCR: *nested-polymerase chain reaction*.

Bibliografia

1. Binn L.N., Lazar E.C., Keenan K.P., Huxsoll D.L., Marchwicki R.H., Strano A.J. (1975). Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. 78th Meet. U.S. Anim. Health Assoc.* 359-366.
2. Eugster A.K., Nairn C. (1977). Diarrhea in puppies: parvovirus-like particles demonstrated in their feces. *Southwest Vet.* 30: 50-60.
3. Pollock R.V.H., Carmichael L.E. (1990). Canine viral enteritis. In Greene C.E. (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp.268-287.
4. Binn L.N., Lazar E.C., Eddy G.A., Kajima A. (1970). Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.* 1: 503-508.
5. Meunier P.C., Cooper B.J., Appel M.J.G., Slauson D.O. (1984). Experimental viral myocarditis: Parvoviral infection of neonatal pups. *Vet. Pathol.* 21: 509-515.
6. Helfer-Baker C., Evermann J.F., McKiernan A.J., Morrison W.B. (1980). Serological studies on the incidence of canine enteritis viruses. *Canine Pract.* 7: 37-42.
7. Evermann J.F., Foreyth W., Maag-Miller L., Leathers C.W., McKiernan A.J., Leamaster B. (1980). Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infection in captive coyote population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 784.
8. England J.J., Poston R.P. (1980). Electron microscopy identification and subsequent isolation of a rotavirus from a dog with fatal neonatal diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 41: 782-783.
9. Fulton R.W., Johnson C.A., Pearson N.J., Woode G.N. (1981). Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 42 (5): 841-843.
10. Mochizuki M., Hsuan S. (1984). Isolation of a rotavirus from canine diarrhoeal faeces. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 905-908.
11. Mochizuki M., Minami K., Sakamoto H. (1986). Seroepizootiological studies on rotavirus infection of dogs and cats. *Jpn. J. Vet. Sci.* 48: 957-964.
12. Hammond M.M., Timoney P.J. (1983). An electron microscopic study of viruses associated with canine gastroenteritis. *Cornell Vet.* 73: 82-97.
13. Marshall J.A., Healey D.S., Studdert M.J., Scott P.C., Kennett M.L., Ward B.K., Gust I.D. (1984). Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 61(2): 33-38.
14. Vieler E., Herbst W. (1995). Electron microscopic demonstration of viruses in feces of dogs with diarrhea. *Tierarztl. Prax* 23(1): 66-69.
15. Ashley C.R., Caul E.O., Paver W.K. (1978). Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J. Clin. Pathol.* 31:10, 939-943.
16. Evermann J.F., McKiernan A.J., Smith A.W., Skilling D.E., Ott R.L. (1985). Isolation and identification of caliciviruses from dogs with enteric infections. *Am. J. Vet. Res.* 46: 218-220.
17. Schaffer F.L., Soergel M.E., Black J.W., Skilling D.E., Smith A.W., Cubitt W.D. (1985). Characterization of new calicivirus isolated from feces of a dog. *Arch. Virol.* 84: 3-4, 181-195.
18. Mochizuki M., Kawanishi A., Sakamoto H., Tashiro S., Fujimoto R., Ohwaki M. (1993). A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet. Rec.* 132: 221-222.
19. Finlaison D.S. (1995). Fecal viruses of dogs - an electron microscope study. *Vet. Microbiol.* 46: 295-305.
20. Sagazio P., Tempesta M., Pratelli A., Aubert A., Buonavoglia C. (1996). Caratterizzazione antigenica mediante anticorpi monoclonali di stipiti di parvovirus del cane (CPV-2). *Atti S.I.S.Vet. L.* 329-330.
21. Pratelli A., Tempesta M., Greco G., Martella V., Buonavoglia C. (1999). Development of a nested-PCR assay for the detection of canine coronavirus. *J. Virol. Meth.* 80: 11-15.
22. Tennant B.J., Gaskell R.M., Gaskell C.J. (1994). Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. *Vet. Microbiol.* 42: 255-259.