

ENTERITE DA CORONAVIRUS DEL CANE: CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS ISOLATO

FULVIO MARSILIO

Dipartimento di Strutture, Funzioni e Patologie degli Animali - Università degli Studi di Teramo

ANNAMARIA PRATELLI, GABRIELLA ELIA

Dipartimento di Sanità, Patologia, Farmacotossicologia e Benessere Animale - Università degli Studi di Bari

LOREDANA RICCI

Medico Veterinario - Libero Professionista - Ambulatorio Veterinario - Teramo

Riassunto

L'enterite da coronavirus canino sta assumendo un ruolo importante nella patologia del cane e la prevalenza di questo virus nella popolazione canina risulta tuttora sottostimata. Gli Autori riportano un caso clinico di coronavirosi in un cucciolo di cane e le successive prove di isolamento e caratterizzazione del virus al fine di studiarne le caratteristiche antigeniche e genomiche. Lo stipite isolato ha dimostrato di possedere una sequenza nucleotidica ben conservata a livello del gene M rispetto agli stipiti di riferimento.

Summary

Canine coronavirus enteritis is playing an important key role in canine pathology and the prevalence of this virus in dog population is underestimated. The Authors report a clinical case of coronavirus enteritis in puppy and the tests for isolation and characterization of the virus in order to study antigenic and genomic features. The isolate possess the M gene sequence with a high degree of conservation compared with reference strains.

INTRODUZIONE

La famiglia *Coronaviridae* comprende virus generalmente associati a sindromi respiratorie ed enteriche dei vertebrati¹.

Il *coronavirus del cane* (CCV) è stato isolato per la prima volta da Binn et al.² da cuccioli di cane con diarrea, anche se precedenti ricerche avevano dimostrato nei sieri di cane la presenza di anticorpi anti-coronavirus^{3,4}. Successivamente CCV è stato isolato in numerose altre parti del mondo^{5,6} ed anche in Italia^{7,8}.

La diagnosi clinica di coronavirosi canina risulta alquanto difficile in considerazione dell'assenza di sintomi clinici specifici. È necessario, pertanto, ricorrere ad esami specifici di laboratorio che prevedono la messa in evidenza di anticorpi specifici oppure l'isolamento e l'identificazione del virus.

Per la ricerca degli anticorpi il test Elisa è risultato più sensibile della classica sieroneutralizzazione⁹. La diagnosi

virologica prevede l'isolamento e l'identificazione del virus su cellule oppure la polymerase chain reaction (PCR). Quest'ultima è dotata di una sensibilità elevata ed è in grado di svelare anche virus non replicante¹⁰.

Scopo della presente nota è quello di descrivere un caso clinico di coronavirosi del cane e di riportare le caratteristiche antigeniche e genomiche dello stipite CCV isolato.

MATERIALI E METODI

Caso clinico

Un cucciolo di razza rottweiler dell'età di circa 45 gg. è stato sottoposto a visita medica in quanto presentava febbre (39,9°C), diarrea e scolo nasale muco-purulento. Dopo 5 gg. di trattamento terapeutico il cucciolo, in condizioni generali migliorate, presentava ancora la diarrea. Veniva nuovamente eseguito l'esame parassitologico che rivelava la presenza di ascaridi e contemporaneamente veniva inviato un campione di feci (144/01) al laboratorio per gli esami virologici.

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 3/9/2001 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 15/11/2001”.

Test di emoagglutinazione (EA)

Il campione di feci è stato diluito 1:10 in tampone salino fosfato (pH 7,2), sottoposto ad agitazione su vortex e quindi centrifugato a 3000 rpm per 30' alla temperatura di +4°C. Per la ricerca del parvovirus del cane tipo 2 (CPV2) è stato effettuato il test EA sulle feci utilizzando globuli rossi di suino all'1% a +4°C.

Isolamento su colture cellulari

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari: cellule in linea continua di fibroma di cane A-72 e cellule in linea continua di rene di scimmia MA-104.

Il campione di feci è stato omogenato al 10% in D-MEM contenente antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomina, 10 µg/ml anfotericina), e quindi centrifugato a 4000 x g per 20' a +4°C. Il surnatante è stato utilizzato per inoculare i monostrati cellulari.

Per la ricerca di CCV sono state utilizzate le cellule A-72. Per la ricerca 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, limitatamente a quelli di MA-104, 5 µg/ml di tripsina. I monostrati cellulari sono stati incubati a 37°C in termostato a CO₂ ed osservati quotidianamente per l'eventuale comparsa di effetto citopatico (ecp).

Immunofluorescenza indiretta (IFI)

Dopo 5 giorni di incubazione, sul monostrato cellulare A-72 è stato effettuato il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando anticorpi monoclonali specifici (MoAbs) per coronavirus gentilmente forniti dal Dott. Chappuis (Merial, France). Il monostrato di cellule di MA-104 è stato sottoposto al test IFI utilizzando un siero iperimmune di coniglio per rotavirus.

Nested-Polymerase Chain Reaction (n-PCR)

Per la ricerca di CCV nel campione di feci è stato impiegato il test n-PCR descritto da Pratelli et al.¹⁰.

Il campione di feci è stato diluito 1:100 in PBS e quindi centrifugato per 5 min a 8000 x g. L'estrazione dell'RNA genomico è stata effettuata con il kit *Rnasy total RNA Kit* (Qiagen GmbH - Germany) a partire da 1 ml del surnatante. La sequenza target scelta per l'amplificazione è un segmento interno del gene che codifica per la proteina transmembrana M di CCV. Per la sintesi del c-DNA è stato utilizzato il *primer antisense CCV2*, e la reazione di retrotrascrizione (*GeneAmp RNA PCR - Perkin Elmer*) è stata condotta a 37°C per 30 min con una fase finale di 94°C per 5 min.

La PCR, che amplifica un frammento di 409 bp del gene M, utilizzando il *primer sense CCV1*, ha previsto 34 cicli di amplificazione: denaturazione a 94°C per 1 min, allineamento a 55°C per 1 min e polimerizzazione a 72°C per 3 min. 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 ciclizzazione. Gli amplificati PCR e n-PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% a 70 V per 90 min e visualizzati al transilluminatore UV previa colorazione con etidio bromuro.

Sequenziamento e analisi di sequenza

L'amplificato della PCR (409 bp) è stato purificato su colonnine *Ultrafree-DA* (Amicon, Millipore) e successivamente sottoposto a sequenziamento diretto per due volte mediante ABI-PRISM 377 (*Perkin Elmer, Applied Biosystem Instruments*). L'analisi di sequenza è stata eseguita utilizzando gli strumenti di analisi dell'NCBI (*National Center for Biotechnologies and Information*) e dell'EMBL (*European Molecular Biology Laboratories*). L'allineamento delle sequenze dello stipite isolato e dello stipite CCV In-savc di referenza, è stato eseguito mediante programma CLUSTAL W¹¹.

RISULTATI

La prova di emoagglutinazione sul campione di feci ha fornito esito negativo per CPV-2. Nel monostrato di A-72, a distanza di 48 ore dall'inoculazione del secondo passaggio, è comparso l'ecp, caratterizzato da focolai di cellule arrotondate e rifrangenti che tendevano a staccarsi dal monostrato (Foto 1 e 2). Le prove di IFI con i MoAbs per CCV hanno permesso di evidenziare una tipica fluorescenza citoplasmatica (Foto 3). Nelle cellule MA-104 non è comparso ecp ed il test IFI è risultato negativo.

Secondo quanto atteso, mediante amplificazione PCR con la coppia di *primers* CCV1/CCV2 è stato amplificato il frammento del gene della proteina M pari a 409 bp, mentre l'amplificato della n-PCR è risultato di grandezza pari a 230 bp (Foto 4). La sequenza nucleotidica del frammento del gene M del ceppo 144/01 confrontata con quella del ceppo CCV di referenza (Insavc) è risultata molto simile (Fig. 1).

DISCUSSIONE

Il ruolo di CCV quale agente enteritogeno nel cane sta diventando sempre più importante. La diffusione di questo virus nella popolazione canina è stata per molto tempo sottostimata e al CCV è stato attribuito un ruolo di scarsa importanza nel determinismo delle gastroenteriti in quanto, a fronte di elevate percentuali di positività sierologica^{12,13,14}, gli isolamenti di CCV da campioni di feci erano limitati^{15,16,17,18}. Questa apparente discrepanza può tro-

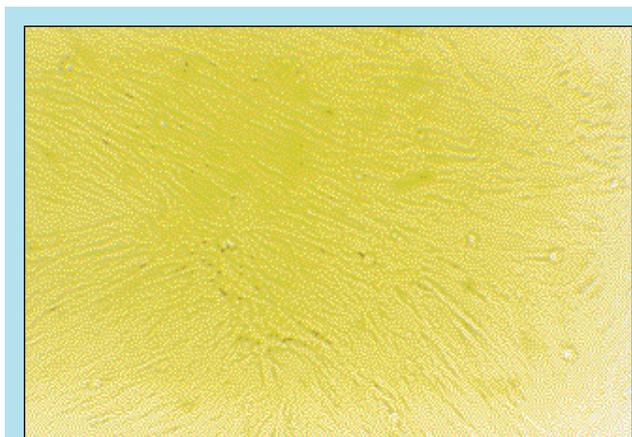


FOTO 1 - Monostrato di cellule A-72 di controllo.

vare una plausibile spiegazione nella scarsa sensibilità del test di isolamento di CCV su cellule rispetto ai test PCR messi a punto di recente^{5,17,18}. In effetti, la scarsa resistenza di CCV nell'ambiente esterno¹⁹, può rendere poco affi-

abile le prove di isolamento. Recenti indagini e l'episodio descritto nella presente nota confermano tuttavia, che CCV è un patogeno particolarmente diffuso nella popolazione canina^{10,20}.

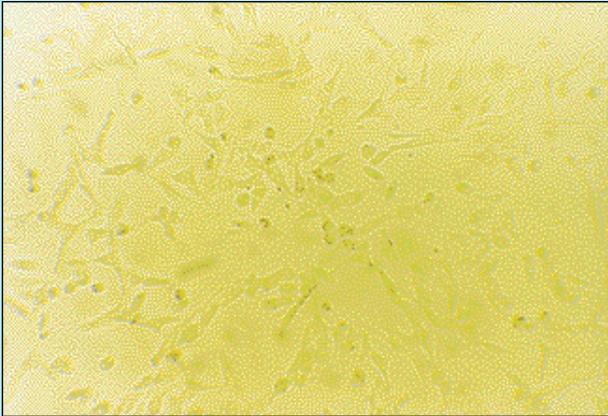


FOTO 2 - Monostrato di cellule A-72 con ecp da CCV.

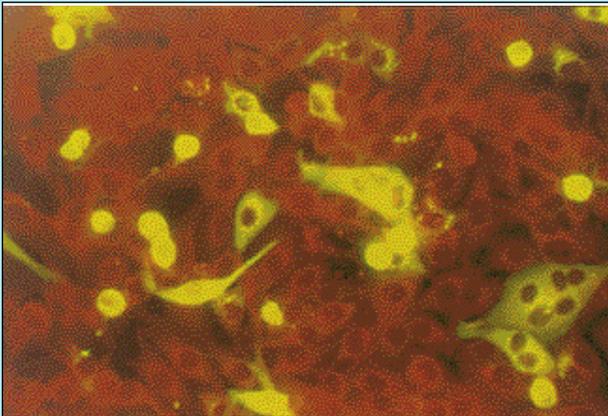


FOTO 3 - Cellule A-72 infettate con CCV. Fluorescenza intracitoplasmatica.



FOTO 4 - PCR e n-PCR per CCV. Linea 1: marker (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas); Linea 2: campione PCR positivo (409bp); Linea 3: campione n-PCR positivo (230 bp).

| | | |
|--------|-----|---|
| Insavc | 1 | AACTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAG |
| 144/01 | 1 | .. T |
| Insavc | 61 | GACTAAGTCTTGGTGGTCTTCAACCCTGAAACTAGCGCAATTCTTTGCGTTAGTGCGTT |
| 144/01 | 61 | A |
| Insavc | 121 | AGGAAGAAGCTATGTGCTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGCTCACTTAACATTGCT |
| 144/01 | 121 | T |
| Insavc | 181 | TTCAGGGAATTTGTGTGCTGAAGGGTTCAAATTCAGGTGGTATGAACATCGACAATTT |
| 144/01 | 81 | C A C |
| Insavc | 241 | ACCAAAATATGTAATGGTTGCATTACCTGTCAGAACCATAGTCTACACACTTGTGGCAA |
| 144/01 | 241 | G G .. C A G ... G T T .. |
| Insavc | 301 | GAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGGCTTACTATGTAAAGTCTAAAGCTGGTG |
| 144/01 | 301 | A A |

FIGURA 1 - Sequenza nucleotidica del frammento del gene M di CCV.

Un altro elemento importante anche da un punto di vista epidemiologico, è relativo alle caratteristiche della sequenza nucleotidica del gene della proteina M dello stipite CCV isolato.

Recentemente è stato osservato che in alcuni amplificati PCR di campioni di feci positivi per CCV, il gene della proteina M presentava diverse sostituzioni di nucleotidi rispetto alle sequenze degli stipiti CCV di referenza²¹. Lo stipite isolato nel presente studio ha mostrato di possedere a livello di gene M, una sequenza nucleotidica ben conservata rispetto agli stipiti di riferimento.

Parole chiave

Cane, coronavirus, caratterizzazione.

Key words

Dog, coronavirus, characterization.

Bibliografia

- Siddell SG, Snijder EJ: Coronaviruses, toroviruses and arteriviruses. In: Virology. Ed by BWJ Mahy and L Collier. 9th ed. London, Arnold, 1998, pp 463-484.
- Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, et al: Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. Proc. 78th Ann. Meeting U.S. An. Hlt. Ass., 359-366, 1974.
- Norman JO, McClurkin AW, Stark SL: Transmissible gastroenteritis (TGE) of swine: canine serum antibodies against an associated virus. Can. J. Comp. Med. 34: 115-117, 1970.
- Cartwright SF, Lucas MH: Vomiting and diarrhoea in dogs. Vet. Rec. 91: 571-572, 1972.
- Naylor MJ, Monckton RP, Lehrbach PR, Deane EM: Canine coronavirus in Australian dogs. Aust. Vet. J. 79: 116-119, 2001.
- Mochizuchi M, Hashimoto M, Ishida T: Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan. J. Vet. Med. Sci. 63: 573-575, 2001.
- Marsilio F, Tiscar PG, Varvara B, et al: Isolamento e caratterizzazione di un ceppo di coronavirus del cane (CCV). Atti S.I.S. Vet.: 47, 1213-1217, 1993.
- Sagazio P, Tempesta M, Normanno G, et al: Su un grave episodio di infezione da coronavirus in cuccioli. Veterinaria 11 (4): 111-114, 1997.
- Soma T, Hara M, Ishii H, Yamamoto S: Antibody testing against canine coronavirus by immunoperoxidase plaque staining. Vet. Res. Commun. 25: 327-336, 2001.
- Pratelli A, Tempesta M, Greco G, et al: Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. J. Virol. Meth. 80: 11-15, 1999.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids Res. 22: 4673-4680, 1994.
- Helper-Baker C, Evermann JF, McKiernan AJ, Morrison WB: Serological studies on the incidence of canine enteritis viruses. Canine Pract. 7: 37-42, 1980.
- Tuchiya K, Horimoto T, Azetaka M, et al: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine coronavirus and its antibodies in dogs. Vet. Microbiol. 26: 41-51, 1991.
- Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ: Studies on the epizootiology of canine coronavirus. Vet. Rec. 132: 7-11, 1993.
- Schnagl RD, Holmes IH: Coronavirus-like particles in stools from dogs, from some country areas of Australia. Vet. Rec. 102: 528-529, 1978.
- Vandenberghe J, Ducatelle R, Debouck P, Hoorens J: Coronavirus infection in a litter of pups. Vet. Quart. 2: 136-141, 1980.
- Bandai C, Ishiguro S, Masuya N, et al: Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. J. Vet. Med. Sci. 61: 731-736, 1999.
- Naylor MJ, Harrison GA, Monckton RP, et al: Identification of canine coronavirus strains from feces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate. J. Clin. Microbiol. 39: 1036-1041, 2001.
- Tennant BJ, Gaskell RM, Gaskell CJ: Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. Vet. Microbiol. 42: 255-259, 1994.
- Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, et al: Enteriti virali del cane: risultati di un'indagine virologica. Veterinaria 13 (6): 57-63, 1999.
- Pratelli A, Martella V, Elia G, et al: Variation of the sequence in the gene encoding for transmembrane protein M of canine coronavirus (CCV). Mol. Cell. Probes, in press.