

¹Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

DIFFUSIONE DEL CORONAVIRUS RESPIRATORIO DEL CANE IN ITALIA

SUMMARY

The authors report the results of the virological and serological investigations for the detection of canine respiratory coronavirus (CRCoV) in Italy. Of a total of 109 lung samples analysed by RT-PCR only one sample tested positive for CRCoV RNA, that had been collected from a dog infected simultaneously by canine parvovirus type 2 and canine coronavirus. Sequence analysis of the RT-PCR product revealed a strict relationship between the Italian strain and CRCoV strain T101, recently isolated in United Kingdom. By means of an ELISA test, carried out on 216 dog sera collected between 1994 and 2006, CRCoV antibodies were found only in samples collected in 2005 (23/60) and 2006 (19/71).

Key words: Canine respiratory coronavirus; Italy; ELISA; RT-PCR; sequence analysis.

INTRODUZIONE

I coronavirus sono inclusi nella famiglia Coronaviridae e sono responsabili di forme respiratorie e/o intestinali nei mammiferi e negli uccelli. Sono virus a simmetria elicoidale, provvisti di envelope e di RNA monocatenario a polarità positiva. In base all'analisi filogenetica e alla cross-reattività antigenica, i coronavirus vengono distinti in tre diversi cluster⁽⁵⁾, anche se recentemente è stato identificato un nuovo gruppo costituito dal coronavirus della SARS (SARS-CoV) e dai coronavirus SARS-correlati.⁽⁸⁾

All'interno di ciascun cluster, i coronavirus vengono classificati in base al loro ospite naturale, alla sequenza nucleotidica dell'RNA genomico ed alle correlazioni sierologiche. Nel cane si riconoscono attualmente tre differenti genotipi di coronavirus.^(7,12)

I coronavirus del cane (CCoV) tipo I e II, inclusi nel gruppo antigenico 1, sono responsabili di forme gastroenteriche ad esito solitamente benigno. Recentemente, Erles e collaboratori⁽⁷⁾ hanno identificato, in cani affetti da sintomatologia respiratoria (tosse dei canili o sindrome respiratoria dei cani, CIRD), un nuovo coronavirus, denominato coronavirus respiratorio del cane (CRCoV). L'analisi di sequenza della polimerasi ha permesso di includere CRCoV nei coronavirus di gruppo 2 ed ha evidenziato una correlazione genetica del 98.8% con il coronavirus bovino (BCoV) e del 98.4% con il coronavirus umano (HCoV) OC43.⁽⁷⁾

Al momento, CRCoV è stato identificato, oltre che nel Regno Unito⁽⁷⁾, in Canada⁽⁴⁾ e Giappone⁽¹⁰⁾; indagini sierologiche hanno tuttavia dimostrato una attiva circolazione del virus negli Stati Uniti ed in Grecia.⁽¹³⁾

Nel presente studio vengono riportati i risultati di indagini sierologiche e virologiche per CRCoV effettuate in Italia.

MATERIALI E METODI

Test RT-PCR per CRCoV

Sono stati analizzati 109 campioni di polmone prelevati da carcasse di cani sottoposti ad accertamenti di laboratorio di routine. L'RNA virale è stato estratto da ciascun campione subito dopo il prelievo, utilizzando il kit commerciale QIAamp® RNeasy Mini Kit (Qiagen S.p.a., Milano), seguendo le istruzioni della casa produttrice, e ciascun estratto è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo. L'RNA estratto è stato diluito in 50 µl di acqua RNasi-free. La reazione di RT-PCR è stata eseguita utilizzando i primer SP1 (CTTATAAGTGCCCCCAAATAAAT) SP2 (CCTACTGTGAGATCACATGTTTG) in grado di amplificare un frammento di 622 bp del gene S di CRCoV.⁽⁷⁾

L'amplificazione è stata effettuata con il kit SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates (Life Technologies, Invitrogen, Milano) utilizzando il seguente protocollo termico: retrotrascrizione a 50°C per 30 min, inattivazione della Superscript II a 94°C per 2 min, 40 cicli di 94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec, 68°C per 30 sec, e estensione finale a 68°C per 10 min. La lettura della reazione è stata effettuata al transilluminatore dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% e colorazione con etidio bromuro.

Isolamento virale

Per le prove di isolamento in vitro, i campioni risultati positivi in RT-PCR sono stati omogenati (10% p/v) in terreno minimo essenziale di Dulbecco (D-MEM), contenente antibiotici (5000UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomycin, 10 µg/ml anfotericina), e tripsina (5 µg/ml), ed inoculati su monostrato confluyente di cellule HRT-18 sviluppate in D-MEM addizionato con il 10% di siero fetale bovino (SFB). Dopo aver allontanato il terreno di coltura, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con D-MEM con tripsina (5 µg/ml) ed inoculate con l'omogenato del campione. Dopo incubazione a 37°C per 1 ora, l'inoculum è stato sostituito con D-MEM contenente tripsina. Le cellule inoculate sono state incubate a 37°C in atmosfera modificata contenente il 5% di CO₂, osservate quotidianamente per l'eventuale comparsa di effetto citopatico e, dopo 3 giorni di incubazione, testate in immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando un siero di cane contenente anticorpi per CRCoV, e attraverso il test RT-PCR.

Ciascun campione è stato sottoposto a tre passaggi seriali prima di essere considerato negativo per CRCoV.

Analisi di sequenza

L'amplificato RT-PCR del gene S del polmone 240/05 (unico cane risultato positivo per l'RNA di CRCoV) è stato sottoposto ad analisi di sequenza dalla Genome Express (Meylan, Francia) e la sequenza ottenuta è stata assemblata ed analizzata utilizzando il software BioEdit⁽⁹⁾ e gli strumenti di analisi dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e dell'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>). L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il software MEGA3.⁽¹¹⁾

Al frammento sequenziato è stato assegnato il numero di accesso DQ66240 della GenBank. Gli alberi filogenetici costruiti sul frammento di 595 nucleotidi del gene S del ceppo 240/05 sono stati elaborati usando i metodi neighbor-joining e massima parsimonia e fornendo un supporto statistico mediante bootstrapping pari a 100.

Test ELISA per la ricerca di anticorpi per CRCoV

L'indagine sierologica è stata eseguita su 216 campioni di siero di cane prelevati in diverse regioni italiane tra il 1994 e il 2006. È stato eseguito il test ELISA, utilizzando come antigene il ceppo BCoV 9WBL77 coltivato su cellule HRT-18.

Il surnatante delle colture cellulari infette, raccolto 96 ore dopo l'infezione, è stato chiarificato a 3000 x g per 20 minuti a 4°C. In ciascun pozzetto di piastre a 96 pozzetti (Polysorb, Nunc) sono stati depositi 100 µl di siero iperimmune di cavia specifico per BCoV diluito 1:500 in tampone carbonato [15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ (pH 9.6)]. Dopo incubazione in agitazione lenta a +4°C overnight, sono stati effettuati quattro lavaggi rapidi in soluzione salina tamponata contenente lo 0.05% di Tween 20 (PBS-T). In ciascun pozzetto è stata aggiunta la sospensione virale, (100 µl/pozzetto) diluita 1:5 in PBS-T con l'1% di estratto di lievito. Dopo incubazione per 1 ora a 37°C sono stati effettuati altri quattro lavaggi. I sieri in esame sono stati diluiti 1:50 e lasciati ad incubare per 90 minuti a 37°C. Dopo ulteriori lavaggi, è stato aggiunto siero di capra anti-IgG di cane coniugato con perossidasi e lasciato ad incubare a 37°C per un ora. Dopo l'aggiunta del substrato [2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulphonate), ABTS, Sigma-Aldrich] la piastra è stata tenuta a temperatura ambiente per 25 minuti e, successivamente, è stata determinata la densità ottica a 405 nm (OD₄₀₅). Il cut-off (OD<0.058) è stato determinato calcolando la media più tre deviazio-

ni standard dei valori OD ottenuti su 10 sieri di controllo raccolti da cani risultati negativi per CRCoV al test RT-PCR effettuato su campioni di feci e al test di virusneutralizzazione effettuato sui campioni di siero.

RISULTATI

Identificazione e caratterizzazione di uno stipite CRCoV

Dei 109 campioni di polmone testati, solo uno (240/05) è risultato positivo al test RT-PCR per CRCoV (Fig. 1). Il campione era stato prelevato nell'ottobre 2005 da un Pastore Tedesco di 60 giorni proveniente da Ostuni (BR), morto il giorno precedente l'esame autoptico a seguito di diarrea emorragica ed in assenza di sintomatologia respiratoria. All'esame autoptico erano state osservate limitate aree di broncopneumonia e grave enterite emorragica con aumento di volume dei linfonodi mesenterici. Gli esami di laboratorio, eseguiti sul contenuto intestinale, avevano rilevato la concomitante presenza di CPV-2c⁽²⁾ e CCoV tipo II.⁽³⁾

Oltre al polmone, anche milza, linfonodo mesenterico e feci sono risultati positivi al test RT-PCR per CRCoV, mentre fegato, rene e midollo osseo sono risultati negativi (Fig. 1).

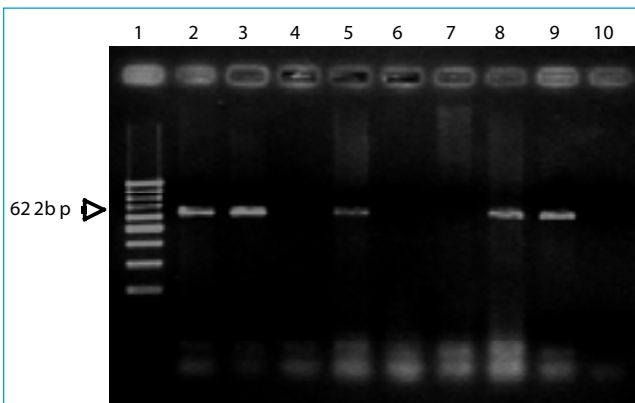


Fig. 1. RT-PCR per CRCoV. Corsia 1, marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germania); corsia 2, controllo positivo (BCoV stipite 9WBL77); corsie 3-9, organi del cane 240/05 (polmone, midollo osseo, milza, fegato, rene, linfonodo mesenterico, intestino); corsia 10, controllo negativo (polmone di cane negativo per CRCoV)

I campioni di organo positivi in RT-PCR inoculati su cellule HRT-18 hanno fornito esito negativo al test IFI e al test RT-PCR per CRCoV.

L'analisi di sequenza, effettuata sul prodotto RT-PCR ottenuto dal polmone 240/05, ha confermato la specificità dell'amplificato, evidenziando una identità nucleotidica del 98% rispetto all'unico stipite CRCoV (T101)⁽⁷⁾ attualmente depositato in GenBank. Una elevata correlazione genetica (96-97%) è stata evidenziata anche con gli sti-

piti bovini ENT e Mebus e con gli stipiti umani HCoV-OC43 e HECV-4408, mentre valori più bassi di identità nucleotidica, compresi tra il 64% ed il 74%, sono stati evidenziati nei confronti degli altri coronavirus di gruppo 2, inclusi il virus dell'epatite murina (MHV), il virus della sialodacrioadenite del ratto (SDAV), il virus emoagglutinante dell'encefalomielite suina (HEV) ed il coronavirus umano HCoV-HKU1, recentemente identificato.⁽¹⁴⁾

L'albero filogenetico ottenuto con il metodo neighbor-joining mostra che lo stipite 240/05 è correlato allo stipite CRCoV-T101, con il quale segrega all'interno dei coronavirus di gruppo 2 (Fig. 2).

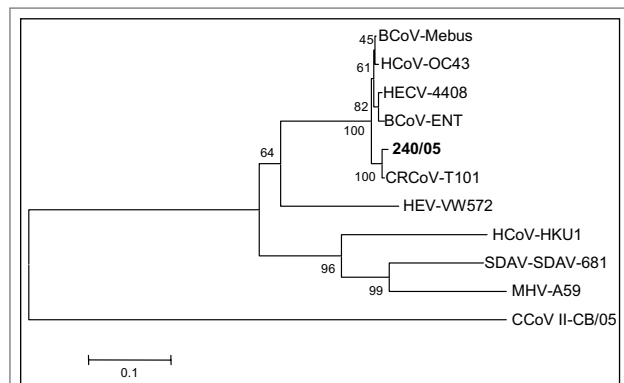


Fig. 2. Albero filogenetico costruito con il metodo neighbor-joining sul frammento del gene S amplificato in RT-PCR e su analoghe sequenze di stipiti coronavirus di riferimento. Lo stipite CCoV tipo II CB/05⁽¹⁾ è stato utilizzato come *outgroup*. Per ciascun nodo sono indicati i relativi valori di *bootstrap*. La barra rappresenta 10 sostituzioni per 10 posizioni nucleotidiche. Gli stipiti usati con i relativi numeri di accesso sono: CRCoV-T101 (AY150272), BCoV-Mebus (U00735), BCoV-ENT (AF391541), HCoV-OC43 (Z32768), HCoV-HKU1 (NC_006577), HECV-4408 (L07748), HEV-VW572 (NC_007732), SDAV-681 (AF207551), MHV-A59 (AY700211), CCoV II-CB/05 (DQ112226)

Una tipologia simile è stata ottenuta con il metodo della massima parsimonia.

Sieroprevalenza per CRCoV

Come riportato nella Tabella 1, anticorpi per CRCoV non sono stati evidenziati nei sieri di cane raccolti tra il 1994 e il 2004. Negli anni 2005 e 2006, invece, sono stati ritrovati positivi, rispettivamente, 23 su 60 e 19 su 71 sieri esaminati. In totale sono risultati positivi 42 sieri con una prevalenza del 32.5%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La recente identificazione di un nuovo coronavirus nel tratto respiratorio di cani⁽⁷⁾ ha aperto nuovi orizzonti nel settore della ricerca sulle infezioni respiratorie del cane. Focolai di infezione da CRCoV, confermati dalla

Tab. 1. Risultati del test ELISA per la ricerca di anticorpi per CRCoV nella popolazione canina in Italia durante gli anni 1994-2006

| Anni | N. positivi/ testati | Sieroprevalenza (%) |
|--------|----------------------|---------------------|
| 1994 | 0/4 | 0 |
| 1996 | 0/18 | 0 |
| 1998 | 0/4 | 0 |
| 1999 | 0/15 | 0 |
| 2000 | 0/18 | 0 |
| 2001 | 0/4 | 0 |
| 2002 | 0/3 | 0 |
| 2003 | 0/7 | 0 |
| 2004 | 0/12 | 0 |
| 2005 | 23/60 | 38,3 |
| 2006 | 19/71 | 26,7 |
| Totale | 42/216 | 32,5 |

identificazione dell'RNA virale, sono stati segnalati in Inghilterra⁽⁷⁾, Canada⁽⁴⁾ e Giappone.⁽¹⁰⁾

Indagini sierologiche hanno evidenziato la circolazione di CRCoV in diversi Paesi, con tassi di sieroprevalenza del 36% nel Regno Unito⁽¹³⁾, del 30% in Irlanda⁽¹³⁾, del 17.8% in Giappone⁽¹⁰⁾ e del 54.7% negli Stati Uniti.⁽¹³⁾

I risultati del presente lavoro indicano che CRCoV sta circolando anche in Italia. Questo dato emerge sia dall'indagine sierologica, che ha messo in evidenza anticorpi specifici nella popolazione canina, sia dai risultati del test RT-PCR, che ha permesso di identificare l'acido nucleico di CRCoV in un cucciolo di 60 giorni di età. Le prove di isolamento su cellule HRT-18 effettuate a partire da organi risultati positivi al test RT-PCR non hanno fornito esito positivo. Il mancato isolamento di CRCoV può essere verosimilmente attribuito al basso titolo virale presente nei campioni o alla inattivazione del virus durante il trasporto della carcassa. Nonostante la presenza di focolai di broncopolmonite evidenziati all'esame necroscopico, la morte del cucciolo non può essere inequivocabilmente ascritta alla infezione da CRCoV, in quanto il soggetto era contemporaneamente infetto da CPV-2 e CCoV. In effetti, il reale potere patogeno di CRCoV non è ancora noto e, molto probabilmente, anche in base a quanto riportato⁽⁶⁾, questo nuovo coronavirus si comporta come altri patogeni dell'apparato respiratorio, determinando l'insorgenza di sintomatologia (tosse dei canili) solo in particolari condizioni di stress e/o sovraffollamento o

in presenza di altri patogeni opportunisti. L'importanza assunta di recente dai coronavirus nel determinismo di importanti patologie dell'uomo (SARS)⁽⁸⁾ e del cane (CCoV antropico)⁽¹¹⁾, deve pertanto stimolare l'attenzione dei ricercatori ad approfondire le conoscenze su questo nuovo patogeno definendone in maniera chiara le caratteristiche patogenetiche e immunologiche.

BIBLIOGRAFIA

- Buonavoglia C., Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Desario C., Castagnaro M., Tempesta M.: Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12, 492-494.
- Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Lucente M.S., Bellacicco A.L., Buonavoglia C.: New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 2005, 52, 316-319.
- Decaro N., Martella V., Ricci D., Elia G., Desario C., Campolo M., Cavaliere N., Di Trani L., Tempesta M., Buonavoglia C.: Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods* 2005, 130, 72-78.
- Ellis J.A., McLean N., Hupaelo R., Haines D.M.: Detection of coronavirus in cases of tracheobronchitis in dogs: a retrospective study from 1971 to 2003. *Canadian Veterinary Journal* 2005, 46, 447-448.
- Enjuanes L., Brian D., Cavanagh D., Holmes K., Lai M.M.C., Laude H., Masters P., Rottier P., Siddell S., Spaan W.J.M., Taguchi F., Talbot P.: Family Coronaviridae. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*, Academic Press, New York, 2000.
- Erles K., Dubovi E.J., Brooks H.W., Brownlie J.: Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 4524-4529.
- Erles K., Toomey C., Brooks H.W., Brownlie J.: Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology* 2003, 310, 216-223.
- Guan Y., Zhen B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Zhang L.J., Guan Y.J., Butt K.M., Wong K.L., Chan K.W., Lim W., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Peiris J.S., Poon L.L.: Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003, 302, 276-278.
- Hall T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999, 41, 95-98.
- Kaneshima T., Hohdatsu T., Satoh K., Takano T., Motokawa K., Koyama H.: The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2006, 68, 21-25.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.: MEGA3:

integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004, 5, 150-163.

12. Pratelli A., Martella V., Decaro N., Tinelli A., Camero M., Cirone F., Elia G., Cavalli A., Corrente M., Greco G., Buonavoglia D., Gentile M., Tempesta M., Buonavoglia C.: Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *Journal of Virological Methods* 2003, 110, 9-17.
13. Priestnall S.L., Brownlie J., Dubovi E.J., Erles K.: Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Veterinary Microbiology* 2006, 115, 43-53.
14. Woo P.C., Lau S.K., Chu C.M., Chan K.H., Tsoi H.W., Huang Y., Wong B.H., Poon R.W., Cai J.J., Luk W.K., Poon L.L., Wong S.S., Guan Y., Peiris J.S., Yuen K.Y.: Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology* 2005, 79, 884-895.

Dentro ogni cane obeso
c'è un cane in piena forma.



amoo.it

MARCHIO REGISTRATO

Yarvitan

una grande
innovazione
nella farmacologia
veterinaria:

il primo farmaco per la
gestione dell'obesità
e sovrappeso del cane

- Risultati rapidi e visibili: nei soggetti trattati si ottiene una perdita di peso del 7% (val. medio) in sole 8 settimane.
- Doppia azione: blocco dei lipidi negli enterociti associato a senso di sazietà senza agire a livello del SNC.
- Posologia e protocollo semplici: facile per il proprietario e per il veterinario.



JANSSEN
ANIMAL HEALTH