

L'INFEZIONE DA ROTAVIRUS DEL CANE IN ITALIA: CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI DUE STIPITI

VITO MARTELLA, ANNAMARIA PRATELLI, MICHELE CAMERO,
DOMENICO BUONAVOGLIA*, MARIA TEMPESTA, CANIO BUONAVOGLIA

Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

**Dipartimento di Patologia, Malattie Infettive e Parassitarie e Ispezione degli alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria di Messina*

Riassunto

Viene descritto l'isolamento di due stipiti rotavirus di gruppo A da cuccioli affetti da enterite acuta. L'analisi del genoma ed il sequenziamento del gene della proteina principale del capsido hanno permesso di stabilire che entrambi gli stipiti sono di origine canina e appartengono al sierotipo G3. A livello aminoacidico e nucleotidico sono state tuttavia evidenziate differenze significative fra i due stipiti. Un'indagine sierologica, effettuata su 223 sieri con il test di immunofluorescenza indiretta, ha messo in evidenza la presenza di anticorpi per rotavirus in 133 sieri (59,6%).

Summary

Two group A rotavirus strains were isolated from pups with acute enteritis. On the basis of the genome analysis and the sequence of the gene encoding the rotaviral major capsid protein, it was shown that both the strains are of canine origin and belong to the G3 serotype. Nevertheless, between the two strains, significant differences were shown either at amino acid or at nucleotide level. A serologic survey, carried out on 223 sera samples by means of an indirect immunofluorescent assay, revealed the presence of antibodies to rotavirus in 133 sera (59.6%).

INTRODUZIONE

I rotavirus di gruppo A sono la principale causa di diarrea neonatale nell'uomo e negli animali. Sono classificati in sierotipi sulla base delle caratteristiche delle proteine virali del capsido esterno, VP7 e VP4, che esprimono, rispettivamente, l'antigene di neutralizzazione maggiore (G-tipo) e minore (P-tipo) ^{1,2,3}.

Al momento sono noti 14 G-tipi e 20 P-tipi ^{4,5}. I tipi di rotavirus più comuni nell'uomo sono G1, G2, G3, G4 e P1A [P8], P1B [P4], P2 [P6] ^{4,5,6}. Nel cane sono stati individuati solo il sierotipo G3 ^{7,8} ed il genotipo P[3] ⁹.

L'infezione da rotavirus del cane è ritenuta una patologia scarsamente importante e le segnalazioni sull'isolamento di rotavirus da cani affetti da gastroenterite sono limitate ^{10,11,12}. L'infezione nel cane determina una forma enterica subclinica, associata talvolta ad anoressia e vomito. La diarrea da rotavirus viene solitamente osservata in soggetti con meno di 2 settimane di età, mentre è raramente segnalata in soggetti con più di 3 mesi ¹³. L'infezione sperimentale ha causato comparsa di diarrea e disidratazione solo in cuccioli gnotobiotici di 2 giorni ¹⁴

mentre non ha causato patologia nei cuccioli di 10 giorni di età (Appel e Summers, dati non pubblicati). L'infezione si localizza nel tratto del piccolo intestino e la replicazione virale causa atrofia dei villi e sostituzione delle cellule epiteliali cilindriche con cellule cuboidi, determinando alterazioni funzionali cui è riconducibile l'insorgenza della diarrea ¹³. Nel caso della rotaviroosi, la terapia è sintomatica e non esiste profilassi vaccinale, in quanto i caratteri clinico-epidemiologici dell'infezione non motivano la messa a punto e l'impiego di un vaccino. Precedenti indagini sierologiche ^{15,16} hanno accertato, in effetti, che la maggior parte della popolazione canina adulta presenta anticorpi per rotavirus. L'elevata positività sierologica a fronte dell'esiguo numero di segnalazioni della presenza di rotavirus nel cane, dimostra che la maggior parte dei cani subisce l'infezione ma che la rotaviroosi del cane, contrariamente alla rotaviroosi suina e bovina, è clinicamente poco rilevante.

Nella presente nota viene descritto l'isolamento e la caratterizzazione genomica di due stipiti di rotavirus del cane e vengono riportati i risultati di un'indagine sierologica.

MATERIALI E METODI

Casi clinici

Le indagini virologiche sono state effettuate su due cuccioli meticcì, dei quali uno (#52/96), di 2¹/₂ mesi, presentava una forma enterica di lieve entità, mentre l'altro (#198/95), di 6 mesi di età, manifestava una gastroenterite grave con anoressia, vomito e diarrea emorragica.

Esame al microscopio elettronico (ME)

Le feci dei due soggetti sono state osservate al ME mediante colorazione negativa. Brevemente, le feci sono state diluite 1:10 in acqua distillata, vortexate e centrifugate per 20 min a 4000 x g e poi per 10 min a 9300 x g per chiarificare i campioni.

Il surnatante è stato quindi ultracentrifugato (*Beckman Airfuge*) per 15 min a 82000 x g. Dopo colorazione negativa con sale sodico dell'acido fosfotungstico 2% (pH 6.8), i campioni sono stati osservati al microscopio elettronico Philips CM10.

Isolamento dei virus

I virus sono stati isolati su cellule di rene di scimmia MA-104 in terreno D-MEM, addizionato di tripsina 5 µg/ml. La crescita del virus è stata visualizzata mediante osservazione dell'ecp e IFI, usando un siero di coniglio iperimmune per rotavirus.

Entrambi i campioni sono stati inoltre inoculati su cellule A-72 per la ricerca del parvovirus del cane (CPV) e del coronavirus (CCV), valutando l'eventuale crescita mediante test IFI specifici.

I campioni di feci dei due cuccioli sono stati anche esaminati mediante una *nested*-PCR specifica per CCV¹⁷.

Elettroferotipo

Il dsRNA dei due virus è stato estratto mediante metodica fenolo-cloroformio, a partire dai monostrati cellulari infetti in fase avanzata di ecp. Il profilo genomico dei due stipiti è stato visualizzato mediante migrazione elettroforetica in gel di agarosio 1%.

Caratterizzazione mediante PCR e RFLP-PCR

Gli stipiti sono stati tipizzati mediante *hemi-nested*-PCR, come descritto da Gouvea *et al.*¹⁸ e Isegawa *et al.*¹⁹ Brevemente, l'intero gene della proteina VP7 è stato inizialmente amplificato usando la coppia di *primer* generici Beg9-End9 e successivamente caratterizzato usando un *primer* G3-specifico ed il *primer* Beg9.

Il prodotto della prima amplificazione, di 1062 bp, è stato inoltre tagliato con gli enzimi di restrizione *DdeI* e *Hinfl*, come descritto da Vonsover *et al.*²⁰

Sequenziamento ed analisi delle sequenze

Il prodotto della prima amplificazione è stato purificato e direttamente sequenziato, usando inizialmente i *primer* End9 e Beg9 e scegliendo successivamente altri *primer* sulla base delle sequenze ottenute. Le sequenze sono state confrontate con analoghe sequenze disponibili sui database della Genbank e dell'EMBL e analizzate con il programma CLUSTALW²¹.

Indagine sierologica

È stata effettuata un'indagine sierologica su 223 sieri di cane utilizzando un test di immunofluorescenza indiretta (IFI) su vetrini multispot (*Biomerieux*) contenenti cellule MA-104 infettate con lo stipite isolato RV198/95. Per la preparazione dell'antigene, le cellule sono state infettate in una flask, e, dopo 24 ore di incubazione, tripsinizzate e distribuite nei pozzetti dei vetrini in ragione di 10⁶ cellule/pozzetto. I vetrini sono stati asciugati in termostato, fissati in acetone freddo e poi conservati a -20°C fino al momento dell'uso. I sieri sono stati diluiti a raddoppio in PBS partendo dalla diluizione 1:50. La reazione è stata visualizzata con siero di topo anti IgG di cane marcato con fluoresceina (*Sigma-Aldrich Co.*).

RISULTATI

Microscopio elettronico

Nei campioni di feci dei due cani, l'osservazione al M.E. ha permesso di visualizzare particelle virali con caratteristiche morfologiche riconducibili a rotavirus. Nelle feci del cucciolo #198/95 sono state inoltre evidenziate particelle virali parvovirus- e coronavirus-like.

Isolamento dei virus

Le prove di isolamento su cellule hanno consentito di isolare il rotavirus da entrambi i campioni già al 1° passaggio (Foto 1, 2, 3 e 4). Dal campione #198/95 è stato inoltre isolato sulle cellule A-72 uno stipite CPV-2 mentre è stato possibile evidenziare CCV solo con la *nested*-PCR.

Elettroferotipo

I due rotavirus hanno mostrato un *pattern* elettroforetico 4:2:3:2, tipico dei rotavirus di gruppo A, con mobilità dei segmenti genomici molto simile (Foto 5).

Caratterizzazione mediante PCR e RFLP-PCR

La PCR con i *primer* generici Beg9-End9 ha amplificato in entrambi i virus il gene della VP7, di 1062 bp. Mediante *hemi-nested*-PCR con *primer* G3 specifico, lo stipite RV198/95 è stato tipizzato come G3, mentre lo stipite RV52/96 non è stato riconosciuto (Foto 6).

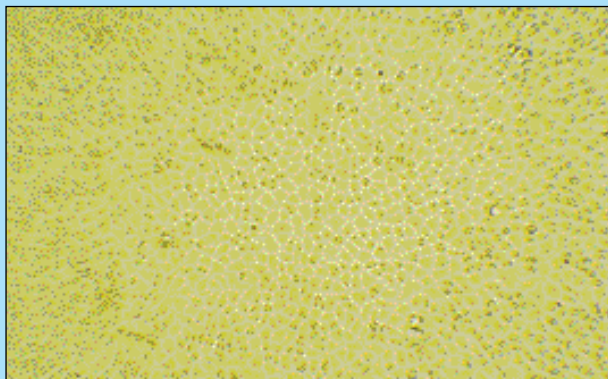


FOTO 1 - Cellule MA-104 non infette.

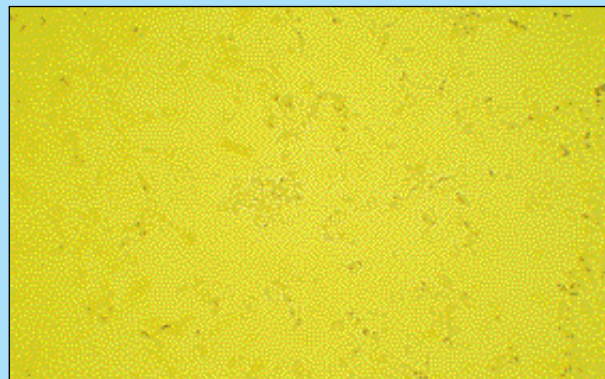


FOTO 2 - Cellule MA-104 con effetto citopatico da rotavirus.

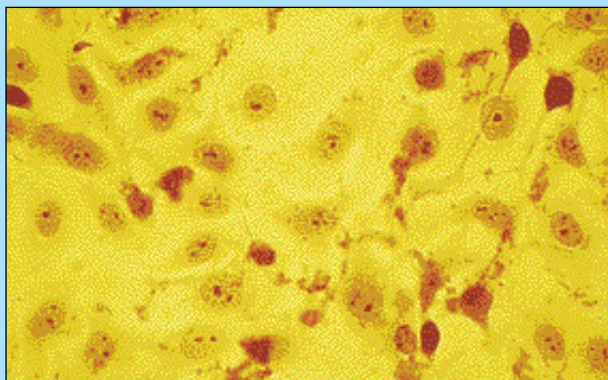


FOTO 3 - Cellule MA-104 infette da rotavirus: corpi inclusi intracitoplasmatici. Colorazione ematossilina-eosina.

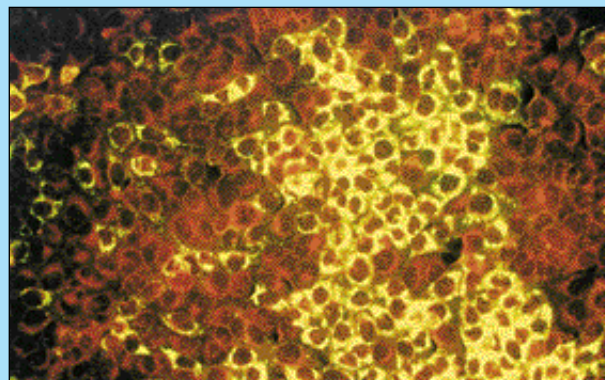


FOTO 4 - Cellule MA-104 infette da rotavirus: fluorescenza citoplasmatica.

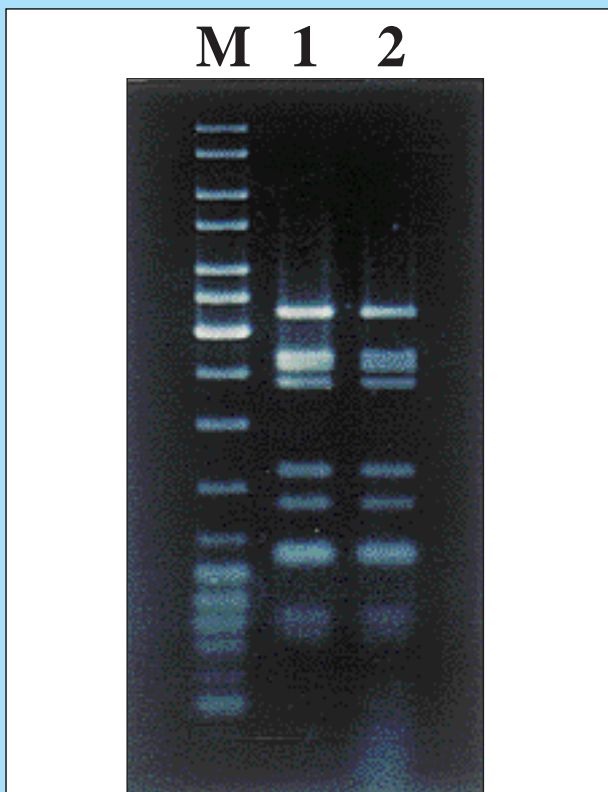


FOTO 5 - Elettroferotipo degli stipiti RV198/95 (linea 1) e RV52/96 (linea 2). M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

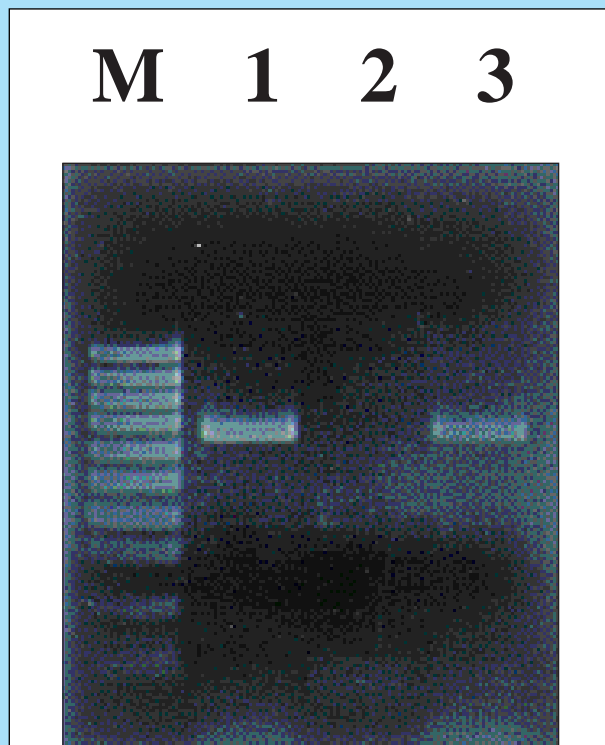


FOTO 6 - Hemi-nested-PCR con il primer G3 tipo specifico: stipite RV198/95 (linea 1), RV52/96 (linea 2) e stipite umano YO (sierotipo G3), usato come riferimento (linea 3). M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

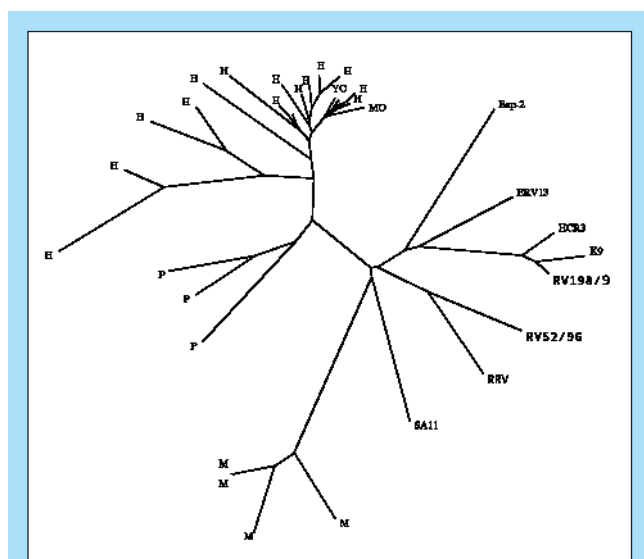


FIGURA 1 - Dendrogramma basato sull'allineamento multiplo delle sequenze della proteina VP7 dei rotavirus di tipo G3 disponibili nei database. Il dendrogramma è stato costruito con il programma TREE-COON²³, usando il metodo neighbor-joining²⁴ e calcolando le matrici di distanza con il modello di Kimura²⁵. Un bootstrapping in 1000 repliche è stato effettuato per fornire supporto statistico al dendrogramma. I valori di bootstrapping non sono riportati. H: rotavirus dell'uomo; P: rotavirus del suino; M: rotavirus del topo. Sono inoltre indicati gli stipiti umani MO e YO; del coniglio Bap-2; dell'equino ERV13; della scimmia RRV e SA11; lo stipite HCR3 isolato dall'uomo; lo stipite K9 del cane.

La RFLP-PCR mediante gli enzimi *DdeI* e *HinfI*, sull'amplificato Beg9-End9, ha generato un *pattern* di digestione differente fra i due stipiti. Solamente il *pattern* di digestione dello stipite RV198/95 è risultato simile al profilo di digestione virtualmente generato al computer dello stipite K9 del cane, incluso nel sierotipo G3.

Sequenziamento ed analisi delle sequenze

Il sequenziamento ha mostrato che tra lo stipite RV198/95 e RV52/96 esiste un'omologia dell'83% a livello nucleotidico e del 96% a livello aminoacidico. Dal confronto con analoghe sequenze disponibili sui database è emerso che entrambi gli stipiti appartengono al sierotipo G3, l'unico sinora segnalato nel cane, e che sono entrambi di origine animale.

Lo stipite RV52/96 mostra inoltre variazioni aminoacidiche in siti strategici della proteina VP7 (residui 147, 212, 213 e 221)^{2,22}.

Il dendrogramma, costruito sulla base dell'allineamento multiplo delle sequenze, mostra che RV198/95 e RV52/96 sono differenziabili dai rotavirus umani, ad eccezione dello stipite umano HCR3, che è probabilmente di origine animale²² (Fig. 1).

Indagine sierologica

I risultati dell'indagine sierologica sono riportati nella Tabella 1. Dei 223 sieri testati, 133 (59,6%) hanno presentato anticorpi specifici per rotavirus con titoli compresi tra 1:50 e 1:3200.

Tabella 1
Risultati del test IFI per la ricerca di anticorpi per rotavirus nei sieri di cane

<i>n° sieri</i>	<i>positivi</i>	<i>negativi</i>
223	133 (59,6%)	90 (40,4%)

DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine sierologica e l'isolamento del virus confermano che, analogamente a quanto osservato in precedenti studi^{15,16}, anche in Italia il rotavirus è diffuso nella popolazione canina.

Un dato interessante è l'isolamento del rotavirus da un cucciolo di 6 mesi di età colpito da gravi sintomi gastroenterici (#198/95), in quanto manifestazioni cliniche significative causate da rotavirus non sono solitamente segnalate in soggetti con più di tre mesi di età¹³. Non si può tuttavia escludere che nel caso in questione la gravità dei sintomi fosse dovuta all'azione patogena sinergica di CCV e CPV-2, secondo quanto già descritto in passato^{26,27}.

I risultati del presente studio dimostrano inoltre che, fra le cause di enteriti del cane, anche i rotavirus possono esplicare un ruolo non marginale, sia pure meno importante rispetto a CPV-2 e CCV.

L'analisi genomica degli stipiti isolati ha evidenziato che RV198/95 e RV52/96 appartengono entrambi al sierotipo G3. I due stipiti tuttavia differiscono significativamente (17%) a livello nucleotidico, confermando l'elevata variabilità del gene della VP7 all'interno del sierotipo G3^{28,29}. Le variazioni nucleotidiche e le differenze aminoacidiche rilevate in siti strategici della VP7^{2,22} potrebbero motivare la definizione di un sottotipo nel sierotipo G3 del cane. Questo aspetto merita, tuttavia, ulteriori approfondimenti, in considerazione dell'importante ruolo immunitario della VP7^{30,31,32}. L'analisi delle sequenze ha, inoltre, dimostrato che il rotavirus RV198/95 è praticamente identico (99%) allo stipite HCR3 di origine canina ma isolato dall'uomo²², confermando la circolazione interspecifica dei rotavirus³³ e i potenziali rischi zoonotici per l'uomo, in particolare neonati e bambini, a contatto con cuccioli con infezione da rotavirus²².

Ringraziamenti

Si ringrazia vivamente Donato Narcisi per la sua collaborazione tecnica.

Parole chiave

Rotavirus, caratterizzazione, cane, enterite, isolamento.

Key words

Rotavirus, characterization, dog, enteritis, isolation.

Abbreviazioni

D-MEM: *Dulbecco's Minimal Essential Medium*. ecp: effetto citopatico. IFI: immunofluorescenza indiretta. MA-104: cellule renali di embrione di scimmia *Macaca mulatta*. A-72: cellule di adenocarcinoma di cane. CPV-2: parvovirus del cane tipo-2. CCV: coronavirus del cane. PCR: *polymerase chain reaction*. RFLP: *restriction fragment length polymorphism*. bp: *base pairs*. PBS: soluzione salina tampone.

Bibliografia

- Bellamy AR, Both GW: Molecular biology of rotaviruses. *Adv Virus Res* 38: 1-38, 1990.
- Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449, 1989.
- Paul PS, Lyoo YS: Immunogens of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 37: 299-317, 1993.
- Estes MK: Rotaviruses and their replication. In: *Virology*, vol. 2. Ed by BN Fields, DN Knipe, PM Howley et al. New York, Raven Press, 1996, pp 1625-1655.
- Kirkwood CD, Coulson BS, Bishop RF: G3P2 rotaviruses causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7, and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch Virol* 141: 1661-1676, 1996.
- Gorrel RJ, Palombo EA: Use of non-radioactive probes for VP4 typing of human rotaviruses. *J Virol Meth* 61: 59-64, 1996.
- Hoshino Y, Wyatt RG, Scott FW, Appel MJ: Isolation and characterization of a canine rotavirus. *Arch Virol* 72: 113-125, 1982.
- Nagakomi T, Matsuda Y, Ohshima A, et al: Characterization of a canine rotavirus strain by neutralization and molecular hybridization assays. *Arch Virol* 106: 145-150, 1989.
- Taniguchi K, Urusawa T, Urasawa S: Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline and canine rotavirus strains. *Virology* 200: 390-400, 1994.
- England JJ, Poston RP: Electron microscopic identification and subsequent isolation of a rotavirus from a dog with fatal neonatal diarrhea. *Am J Vet Res* 40: 7782-783, 1980.
- Fulton RW, Johnson CA, Pearson NJ, Wood GN: Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea. *Am J Vet Res* 42: 841-843, 1981.
- Mochizuki M, Hsuan S: Isolation of a rotavirus from canine diarrhoeal faeces. *Jpn J Vet Sci* 46: 905-908, 1984.
- Pollock RVH, Carmichael LE: Canine viral enteritis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. Ed by CE Greene. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990, pp 268-287.
- Johnson CA, Fulton RW, Henk WG, Snider TG: Inoculation of neonatal gnotobiotic dogs with a canine rotavirus. *Am J Vet Res* 44: 1687-1693, 1983.
- Mochizuki M, Minami K, Sakamoto H: Sero-epizootiological studies on rotavirus infection of dogs and cats. *Jpn J Vet Sci* 48: 957-964, 1986.
- Rimmelzwaan GF, Groen J, Egberink H, et al: The use of enzyme-linked immunosorbent assay system for serology and antigen detection in parvovirus, coronavirus and rotavirus infections in dog in The Netherlands. *Vet Microbiol* 26(1-2): 26-40, 1991.
- Pratelli A, Tempesta M, Greco G, et al: Development of a nested PCR for the detection of canine coronavirus in dog feces. *J Virol Meth* 80: 11-15, 1999.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, et al: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acids from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28: 276-282, 1990.
- Isegawa Y, Nagakomi O, Nagakomi T, et al: Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 7: 277-284, 1993.
- Vonsover A, Shif I, Silberstein I, et al: Identification of feline- and canine- like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. *J Clin Microbiol* 31: 1783-1787, 1993.
- 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.
- Li B, Clark HF, Gouvea V: Amino acid sequence similarity of the VP7 protein of human rotavirus HCR3 to that of canine and feline rotaviruses. *J Gen Virol* 75: 215-219, 1994.
- Van De Peer Y, De Wachter R: TREECOON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput Applic Biosci* 9: 177-182, 1993.
- Saitou N, Nei M: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425, 1987.
- Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120, 1980.
- Yasoshima A, Fujinami F, Doi K, et al: Case report on mixed infection of canine parvovirus and canine coronavirus. *Electron microscopy and recovery of canine coronavirus*. *Jpn J Vet Sci*, 1983, 45: 217-225, 1983.
- Pratelli A, Tempesta M, Roperto FP, et al: Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *J Vet Diagn Invest* 11: 550-553, 1999.
- Cao X, Akihara S, Fang ZY et al: Genetic variation in the VP4 and NSP4 gene of human rotavirus serotype 3 (G3 type). *Microbiol Immunol* 43(2): 171-175, 1999.
- Wen L, Nakayama M, Yamanishi Y, et al: Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Arch Virol* 142(7): 1481-1489, 1997.
- Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ: Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccines: implication for vaccine development. *J Infect Dis* 161(4): 667-679, 1990.
- Snodgrass DR, Fitzgerald TA, Campbell I, et al: Homotypic and heterotypic serological responses to rotavirus neutralization epitope in immunological naive and experienced animal. *J Clin Microbiol* 29: 2668-2672, 1991.
- Beards GM, King JA, Mazhar S et al: Homotypic and heterotypic immune responses to group A rotaviruses in parenterally immunized sheep. *Vaccine* 11(2): 262-266, 1993.
- Nagakomi O, Nagakomi T: Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Arch. Virol. (Suppl.)* 12: 93-98, 1996.