

# PARVOVIROSI DEL CANE: METODICHE PER LA DIAGNOSI EZIOLOGICA

ALESSANDRA SCAGLIARINI, MARA BATTILANI, ANTONIETTA DI FRANCESCO,  
FABIO OSTANELLO, FEDERICO MARTINELLO, SANTINO PROSPERI, LUIGI MORGANTI

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO)*

## Riassunto

Per la ricerca del parvovirus canino (CPV-2) sono stati esaminati 92 campioni, 86 dei quali rappresentati da feci di cane e 6 da raschiati di mucosa intestinale. Sono state utilizzate le tecniche di isolamento virale, emoagglutinazione ed ELISA-sandwich. Sono state calcolate la sensibilità e la specificità relative dell'emoagglutinazione e dell'ELISA utilizzando come test di riferimento l'isolamento virale. In via preliminare 15 campioni sono stati sottoposti a polymerase chain reaction (PCR).

## Summary

*92 samples were analyzed by viral isolation, emoagglutination and enzyme linked immunosorbent assay to detect canine parvovirus (CPV-2), 86 samples were feces and 6 were taken from intestin. Sensibility and specificity of all these techniques were compared. 15 samples were preliminary analyzed by polymerase chain reaction (PCR).*

## INTRODUZIONE

La parvovirosi del cane è una malattia virale contagiosa caratterizzata da gastroenterite e, meno frequentemente, da miocardite. L'agente causale, il *Canine Parvovirus-2* (CPV-2), è un Dna-virus appartenente alla famiglia *Parvoviridae*, genere *Parvovirus*, correlato antigenicamente con il virus responsabile della enterite del visone (MEV), con quello della panleucopenia felina (FPLV) e con il parvovirus del procione (RPV).

La malattia è comparsa verso la fine degli anni '70 e in breve tempo si è diffusa in quasi tutti i Paesi del mondo. Il primo isolamento di CPV-2 in Italia risale al 1980 (Buonavoglia e coll., 1980). Tra la fine degli anni '70 e la metà degli anni '80 sono comparse due varianti antigeniche del ceppo originario di CPV-2 (rispettivamente CPV-2a e CPV-2b); tali varianti sono attualmente responsabili della forma morbosa mentre lo stipo originale (CPV-2) continua ad essere presente solo nei vaccini.

Il virus si trasmette per contatto diretto, principalmente mediante un ciclo oro-fecale (Appel e Parrish, 1987). Il virus si rinviene nelle feci 3-4 giorni dopo il contagio, il picco di eliminazione viene raggiunto 4-7 giorni dopo l'infezione per via orale e l'escrezione fecale persiste per circa 40 giorni dopo la guarigione clinica. Il virus presenta un'elevata resistenza nell'ambiente esterno e questo aspetto,

unitamente alla presenza di animali portatori eliminatori, determina il mantenimento dell'infezione nella popolazione canina. È inoltre dimostrato che alcuni animali sviluppano forme subcliniche di infezione, con eliminazione di quantità elevate di virus.

Attualmente, per la profilassi vaccinale vengono impiegati vaccini omologhi contenenti CPV-2 vivo attenuato che sono in grado di stimolare una immunità in grado di prevenire l'infezione naturale sostenuta dalle varianti antigeniche CPV-2a e CPV-2b (Sagazio e coll., 1998).

Nonostante la diffusione della profilassi vaccinale, numerosi sono i casi d'infezione che continuano ad essere segnalati, probabilmente in relazione agli aspetti epidemiologici precedentemente descritti. Questo conferma l'importanza di una accurata diagnosi eziologica che consenta di instaurare una corretta terapia individuale e di predisporre adeguati interventi sanitari finalizzati al controllo della diffusione dell'infezione nelle popolazioni a rischio.

Nel presente lavoro sono state messe a confronto tre tecniche routinarie per la diagnosi diretta: isolamento su colture cellulari (IV), emoagglutinazione (HA) ed ELISA-sandwich. L'isolamento virale, in virtù della sua alta sensibilità e specificità, è stato considerato come *gold standard*, nonostante i lunghi tempi di esecuzione (circa 10 giorni) ne limitino l'uso diagnostico routinario. Un numero limi-

tato di campioni è stato inoltre sottoposto a *polymerase chain-reaction* (PCR) che, per la sua elevata sensibilità, è in grado di rilevare anche concentrazioni virali estremamente esigue nei campioni biologici, ma richiede attrezzature complesse e laboratori specializzati.

## MATERIALI E METODI

### a) Casi clinici

Sono stati analizzati 92 campioni, 86 dei quali costituiti da materiale fecale e 6 da raschiato di mucosa intestinale, raccolti dal 1996 al 1998.

I campioni appartenevano a cani di diversa razza, 82 dei quali erano originari dell'Emilia-Romagna, 4 della provincia di Ancona, 5 della provincia di Torino e 1 della provincia di Udine. Di questi soggetti, 79 provenivano da privati, 3 da canili e 10 da negozi di animali. Venti erano cuccioli tra 0-2 mesi, 26 erano cuccioli tra 2-6 mesi, 25 avevano un'età superiore ai 6 mesi; di 21 soggetti non era conosciuta l'età.

Tutti i soggetti esaminati presentavano sintomatologia gastroenterica con diarrea ematica e in alcuni casi vomito.

Di 48 cani era nota l'anamnesi vaccinale: 36 risultavano regolarmente vaccinati e 12 non erano stati immunizzati mentre dei restanti 44 animali non è stato possibile raccogliere dati relativi alla profilassi.

### b) Metodiche diagnostiche

#### b.1.) Isolamento virale su colture cellulari

Per l'isolamento virale è stata impiegata la linea cellulare continua derivata da fibroblasti di embrione felino, denominata FEA (Mochizuki e Hashimoto, 1986).

L'inoculum è stato preparato diluendo ciascun campione 1:10 p/v in tampone fosfato pH 7,4 (PBS) addizionato con antibiotici. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato raccolto e filtrato su membrana di 450 nm.

Per ogni campione sono stati effettuati tre passaggi seriali.

Sono stati considerati positivi tutti i campioni che hanno mostrato effetto citopatico caratteristico (degenerazione cellulare globiforme) a 96 ore dall'inoculo fino al terzo passaggio in coltura cellulare.

Per alcuni campioni è stato ricercato il virus nel liquido colturale del terzo passaggio mediante microscopia elettronica con colorazione negativa (Fig. 1) allo scopo di confermare la presenza del virus nel surnatante del terzo passaggio.

Le colture cellulari infettate sono state colorate con May-Grünwald Giemsa, secondo la metodica di Buonavoglia e coll. (1981) modificata, allo scopo di evidenziare i corpi inclusi intranucleari eosinofili, tipici dell'infezione da parvovirus (Fig. 2).

#### b.2.) Emoagglutinazione (HA)

Il CPV-2 ha proprietà emoagglutinanti nei confronti di emazie di suino, di varie specie di scimmia, di cavallo e di

gatto, a pH 5,8-7,2 e a +4°C. Le proprietà emoagglutinanti sono legate alla presenza del determinante antigenico HA, di natura proteica e sono indipendenti dal potere infettante. Di conseguenza un capsido vuoto, mentre non è in grado di infettare, è comunque emoagglutinante se la struttura antigenica è integra.

La reazione di emoagglutinazione è stata eseguita in micrometodo (Carmichael e coll., 1980), utilizzando eritrociti di suino all'1% in soluzione tampone fosfato.

Sono stati considerati positivi i campioni con titolo emoagglutinante  $\geq 1:32$ .

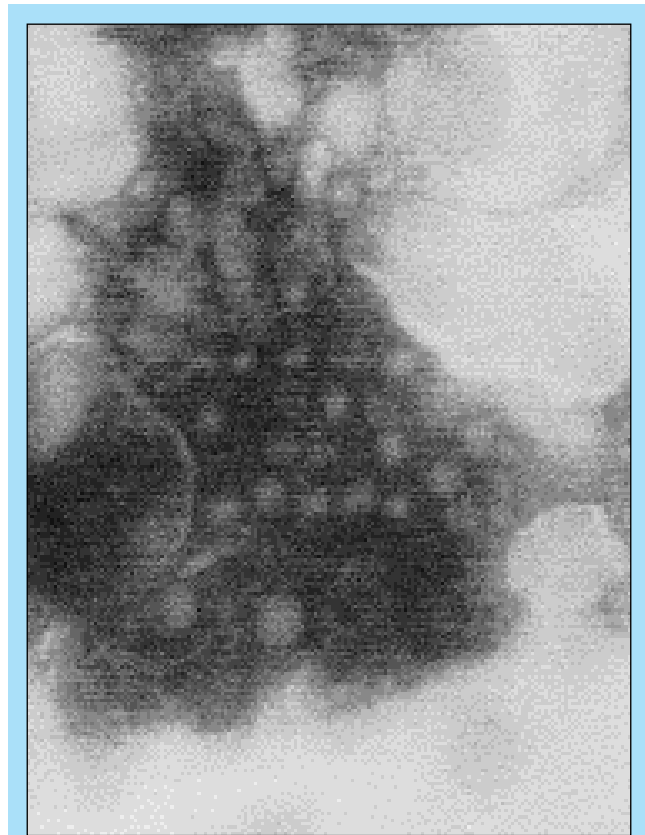


FIGURA 1 - Immagine in microscopia elettronica di CPV-2 (130.000×).

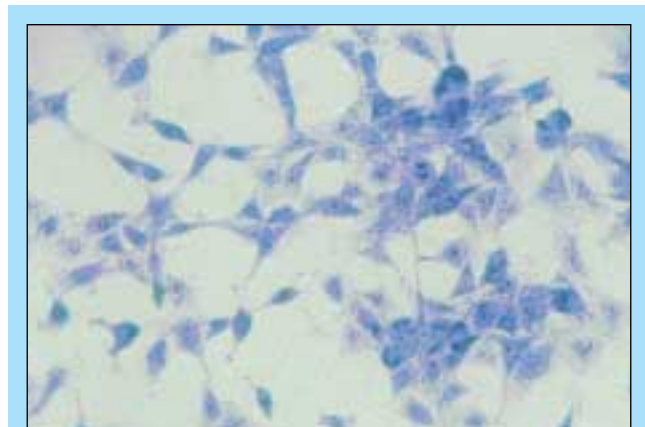


FIGURA 2 - Monostrato infetto di cellule FEA (May-Grünwald Giemsa, 250×).

### b.3.) ELISA-sandwich

È stato impiegato un kit del commercio (Ingenasa, Madrid) che utilizza due anticorpi monoclonali specifici per due differenti epitopi, ottenendo in tal modo un legame altamente specifico.

La lettura è stata eseguita mediante spettrofotometro (Titertek Multiscan Plus): sono stati considerati positivi i campioni il cui valore medio di densità ottica ( $DO_{405}$ ) era superiore al 20% della  $DO_{405}$  del controllo positivo.

### b.4.) Polymerase chain reaction (PCR)

**Campioni:** la prova è stata eseguita su 15 campioni di feci, di cui 5 risultati positivi e 10 negativi all'isolamento virale; come controllo negativo è stato utilizzato un campione di feci di cane sano.

Ciascun campione è stato diluito 1:10 in acqua bidistillata deionizzata e centrifugato a 2000g per 10'. Il surnatante è stato diluito 1:10 in acqua bidistillata deionizzata, ottenendo una diluizione finale di 1:100. Successivamente ogni campione è stato trattato termicamente per 10' a 100°C, al fine di eliminare eventuali sostanze inibenti la *Taq* polimerasi (Uwatoko e coll., 1996; Schunk e Truyen, 1996).

**PCR:** è stata seguita la tecnica di Mochizuki e coll. (1993) modificata. Sono stati utilizzati 2 primer costituiti da 19 basi riferibili alla regione nota del genoma di CPV-2 codificante le proteine VP1/VP2. La PCR è stata effettuata in un volume finale di 50 µl. A una miscela di reazione contenente 34 µl di PCR buffer sono stati aggiunti: 200 µM di oligonucleotidi trifosfati, 10 picomoli di ciascun primer, 5 µl di ogni estratto fecale; la *Taq*-polimerasi (AmpliTag, Perkin-Elmer Cetus, USA) è stata aggiunta in quantità pari a 2 unità.

La PCR è stata condotta in Dna Thermal cycler (Omne, Hybaid, UK) per 30 cicli di amplificazione: ciascun ciclo era costituito da una fase di denaturazione a 94°C per 1', seguita dalla fase di *annealing* per 1' a 55°C e dalla successiva fase di estensione a 72°C per 2'. Al termine dei 30 cicli di amplificazione la temperatura di 72°C è stata successivamente protratta per 5'.

Ciascun amplificato, in quantità pari a 10 µl, è stato addizionato a 2,5 µl di blu di bromofenolo e glicerolo e successivamente analizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1% (p/v) in tampone Tris acetato-EDTA (TAE buffer). Contemporaneamente ai campioni in esame sono stati sottoposti ad elettroforesi 10 µl di un marker costituito da DNA ottenuto dal batteriofago λ e digerito con endonucleasi Eco RI e Hind III (Boehringer-Mannheim). La corsa elettroforetica è stata effettuata in cella (Hybaid, UK) per 60' a 100 V. Le bande di amplificato sono state visualizzate, dopo colorazione con bromuro di etidio, mediante transilluminatore a UV (UV 21, Fotodyne, UK).

### c) Valutazione dei test e analisi statistica

La valutazione dei test ELISA-s e HA è stata effettuata utilizzando come *gold standard* la prova di isolamento virale. In particolare sono state calcolate: prevalenza apparen-

te dell'infezione, sensibilità e specificità relative, concordanza e *K* (Thrusfield, 1995). È stata inoltre valutata, mediante test chi-quadrato secondo McNemar, la discordanza tra i risultati alla prova in esame rispetto al *gold standard*.

La proporzione di soggetti positivi e negativi all'isolamento virale, in funzione del ricorso o meno alla vaccinazione è stata valutata mediante test chi-quadrato.

## RISULTATI

Dei 92 campioni esaminati, 48 sono risultati positivi ad almeno una delle prove di laboratorio; in particolare 25 sono risultati positivi alle tre prove (IV, HA, ELISA), 2 ad IV ed ELISA, 7 ad IV e HA, 11 ad IV e 3 a HA (Fig. 3). Nessun soggetto è risultato positivo al solo test ELISA e 44 sono risultati negativi a tutti i tre test.

Dei soggetti di età nota, sono risultati positivi 10 cani di 0-2 mesi (n=20), 14 di 2-6 mesi (n=26) e 9 di età superiore a 6 mesi (n=25).

I parametri di valutazione dei test sono riportati nelle Tabelle 1, 2 e 3. Paragonati ai risultati dell'isolamento virale i test HA ed ELISA evidenziano una buona specificità (rispettivamente 93,48% e 100%) ma una modesta sensibilità (rispettivamente 71,11% e 70%).

Confrontando i risultati di ELISA *vs* HA si evidenzia una concordanza sostanziale ( $K=70,89$ ) anche se le proporzioni di soggetti positivi/negativi alle due prove differiscono in modo significativo (chi-quadrato secondo McNemar=4,08;  $p<0,05$ ).

Diciannove soggetti regolarmente vaccinati e 6 non vaccinati sono risultati positivi all'IV. La proporzione dei soggetti di cui era nota l'anamnesi vaccinale e risultati positivi non differisce in maniera statisticamente significativa in funzione del ricorso o meno alla vaccinazione (chi-quadrato= 0,28,  $p=0,87$ ) (Tab. 4).

Relativamente alla PCR, sui 15 campioni esaminati, 5 risultati positivi alle metodiche diagnostiche già descritte hanno evidenziato un prodotto di amplificazione di 2,2 kb considerato specifico per CPV-2 (Mochizuki e coll., 1993), mentre hanno fornito esito negativo il campione di feci di cane sano (controllo negativo) e i 9 campioni già risultati negativi alle altre metodiche (Fig. 4).

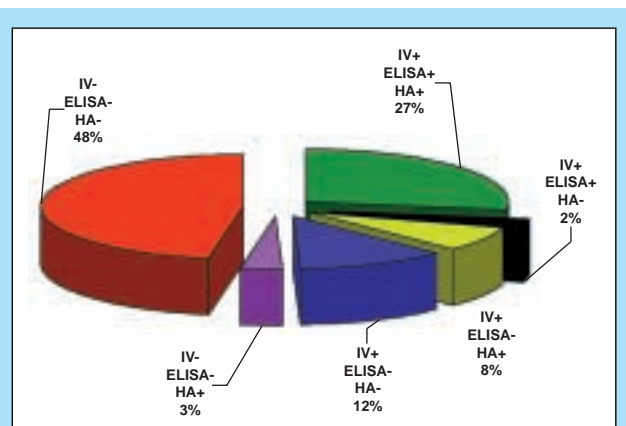


FIGURA 3 - Risultati dei 3 test diagnostici.

**Tabella 1**  
Risultati del test HA vs isolamento virale (gold standard) e relativi parametri di valutazione

	Isolamento Virale			
	+	-	Totale	
HA	+	32 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	35 <sup>(a+b)</sup>
	-	13 <sup>c</sup>	43 <sup>d</sup>	56 <sup>(c+d)</sup>
		45 <sup>(a+c)</sup>	46 <sup>(b+d)</sup>	91 <sup>n</sup>
Prevalenza (gold standard)	(a+c)/n = 49,45%			
Prevalenza apparente	(a+b)/n = 38,46%			
Sensibilità relativa	a/(a+c) = 71,11%			
Specificità relativa	d/(b+d) = 93,48%			
Concordanza osservata	(a+d)/n = 82,42%			
Kappa	64,75%			
Chi-quadrato secondo McNemar	5,06	P<0.05		

**Tabella 2**  
Risultati del test ELISA vs isolamento virale (gold standard) e relativi parametri di valutazione

	Isolamento Virale			
	+	-	Totale	
ELISA	+	27 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	27 <sup>(a+b)</sup>
	-	18 <sup>c</sup>	46 <sup>d</sup>	64 <sup>(c+d)</sup>
		45 <sup>(a+c)</sup>	46 <sup>(b+d)</sup>	91 <sup>n</sup>
Prevalenza (gold standard)	(a+c)/n = 49,45%			
Prevalenza apparente	(a+b)/n = 29,67%			
Sensibilità relativa	a/(a+c) = 70 %			
Specificità relativa	d/(b+d) = 100 %			
Concordanza osservata	(a+d)/n = 80,22%			
Kappa	60,26%			
Chi-quadrato secondo McNemar	15,05	P<0.05		

**Tabella 3**  
Risultati dei test HA vs ELISA e relativi parametri di valutazione

	ELISA			
	+	-	Totale	
HA	+	25 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	35 <sup>(a+b)</sup>
	-	2 <sup>c</sup>	54 <sup>d</sup>	56 <sup>(c+d)</sup>
		27 <sup>(a+c)</sup>	64 <sup>(b+d)</sup>	91 <sup>n</sup>
Prevalenza ELISA	(a+c)/n = 29,67%			
Prevalenza HA	(a+b)/n = 38,46%			
Sensibilità relativa	a/(a+c) = 92,59%			
Specificità relativa	d/(b+d) = 84,37%			
Concordanza osservata	(a+d)/n = 86,81%			
Kappa	70,89%			
Chi-quadrato secondo McNemar	4,08	P<0.05		

## DISCUSSIONE

La maggiore prevalenza riscontrata nei soggetti al di sotto dei 6 mesi di età conferma la più elevata recettività al CPV-2 nei cuccioli rispetto agli adulti.

**Tabella 4**  
Risultato del test di IV in funzione del ricorso o meno alla vaccinazione

	Isolamento Virale			
	+	-	Totale	
Vaccinazione	Si	19	17	36
	No	6	6	12
		25	23	48
Chi-quadrato = 0,28    p = 0,87				

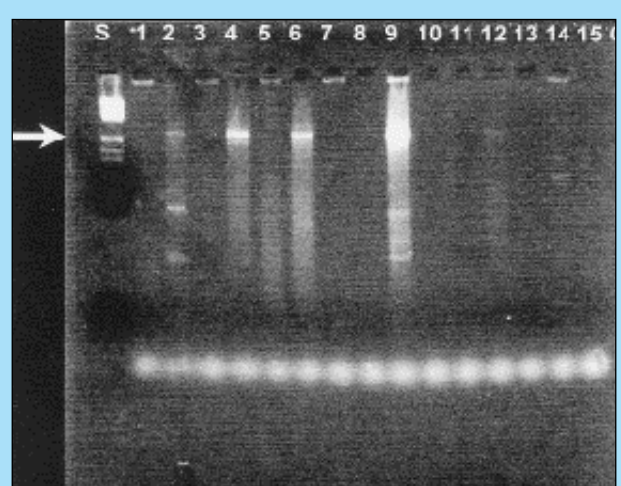


FIGURA 4 - Tracciato elettroforetico su gel di agarosio. S: standard; 2, 4, 6, 9, 12: campioni positivi; C: controllo negativo.

L'assenza di differenze statisticamente significative tra soggetti vaccinati e non, per quanto riguarda la positività all'isolamento virale, non deve essere necessariamente attribuita a inefficacia vaccinale ma molto probabilmente a vaccinazioni troppo precoci: esiste un periodo critico di *gap* immunitario della durata di 2-4 settimane e che generalmente va dalla quinta alla nona settimana di vita (Buonavoglia e coll. 1995), durante il quale il tasso anticorpale di origine materna diviene troppo basso ai fini della protezione nei confronti del virus selvaggio, restando peraltro ancora troppo elevato per permettere una buona sierconversione post vaccinale. Questo ostacolo è stato in parte superato con l'impiego di vaccini ad alta concentrazione antigenica che permettono di anticipare il primo intervento vaccinale nei cuccioli in situazioni di particolare rischio (Imbert e Adelus Neveu, 1997).

I valori di sensibilità relativa delle tecniche HA ed ELISA sono estremamente elevati (rispettivamente 93,48% e 100%), mentre la specificità relativa è modesta (rispettivamente 71,11% e 70%). Ciò comporta un aumento della proporzione di soggetti falsamente negativi con conseguente sottostima dell'infezione.

Dal presente lavoro emerge che la maggior parte degli animali esaminati è risultata positiva alle tre metodiche utilizzate. I casi positivi all'isolamento e all'emoagglutinazione ma non all'ELISA possono essere attribuiti alla più elevata sensibilità di HA rispetto all'ELISA; al contrario, i

casi risultati positivi all'isolamento e all'ELISA ma non a HA possono essere attribuiti alla maggiore difficoltà da parte di quest'ultima tecnica di svelare il virus se ricoperto da copro-anticorpi specifici. I 3 soggetti che hanno mostrato reattività al solo test HA sono stati considerati falsi positivi, in relazione alla possibile presenza di emoagglutinine aspecifiche presenti nel materiale fecale (Mathys e coll., 1983). I risultati di questo studio non si discostano da quelli ottenuti da altri Autori (Rimmelzwaan e coll., 1990; Mochizuki e coll., 1993; Drane e coll., 1994) per quanto riguarda i valori di specificità di HA e ELISA, mentre, per quanto concerne i livelli di sensibilità relativa, questi si attestano su valori inferiori, probabilmente perché sono stati esaminati campioni appartenenti a soggetti sospetti di gastroenterite da parvovirus e non ad animali infettati sperimentalmente.

La tecnica di isolamento virale, pur manifestando le migliori caratteristiche di sensibilità e specificità, presenta lo svantaggio di richiedere lunghi tempi di esecuzione (circa 10 giorni) e costi economici superiori.

Per quanto riguarda la tecnica PCR, per ora impiegata solo in laboratori specializzati, i risultati ottenuti confermano una elevata sensibilità della metodica, in grado di individuare campioni positivi già a concentrazioni di  $10^3$  particelle virali/g di feci (Schunk e Truyen, 1996; Tempesta e coll., 1996). Questa tecnica associa quindi le caratteristiche di elevata sensibilità e specificità, finora prerogativa dell'isolamento virale, a quelle della rapidità diagnostica.

## Parole chiave

*Parvovirus, CPV-2, isolamento virale, HA, ELISA, PCR.*

## Key words

*Parvovirus, CPV-2, viral isolation, HA, ELISA, PCR.*

## Bibliografia

- Appel M.J.G., Parrish C.R. (1987) "Canine Parvovirus Type 2". In: "Virus Infection of Carnivores". Ed. Elsevier Publishers, Amsterdam: 69-72.
- Buonavoglia C., Di Trani L., Orfei Z. (1980) "Identificazione del parvovirus del cane, agente causale di una grave forma di gastroenterite: primo isolamento in Italia". *Selezione veterinaria* 11:1073-1074.
- Buonavoglia C., Di Trani L., Tollis M., Tangucci F., Orfei Z. (1981) "Parvovirus associato ad una grave forma di gastroenterite del cane: isolamento ed identificazione". *La clinica veterinaria* 104:219-226.
- Buonavoglia C., Sagazio P., Corrente M.L. (1995) "Attuali conoscenze sulla profilassi vaccinale della parvovirosi del cane". *Bollettino AIVPA* 1:33-36.
- Carmichael L.E., Joubert M.S., Pollock R.H.V. (1980) "Haemagglutination by Canine Parvovirus: serologic studies and diagnostic application". *American Journal of Veterinary Research* 41:784-791.
- Drane D.P., Hamilton R.C., Cox J.C. (1994) "Evaluation of a novel diagnostic test for Canine Parvovirus". *Veterinary Microbiology* 41:293-302.
- Imbert S., Adelus Neveu F. (1997) "La nuova concezione della lotta contro la parvovirosi: i vaccini ad antigene concentrato". *Veterinaria* 5:125-132.
- Mathys A., Mueller R., Pedersen N.C., Theilen G.H. (1983) "Comparison of hemagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces". *American Journal of Veterinary Research* 42:152-154.
- Mochizuki M., Hashimoto T. (1986) "Growth of feline panleukopenia virus and canine parvovirus in vitro". *Japanese Journal of Veterinary Science* 48:841-844.
- Mochizuki M., San Gabriel M.C., Nakatani H., Yoshida M., Harasawa R. (1993) "Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assay for parvoviruses in faecal specimens". *Research in Veterinary Science* 55:60-63.
- Rimmelzwaan G.F., Juntti N., Klingeborn B., Groen J., Uytendaele F.G.C.M., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirus infection". *The Veterinary Quarterly* 12:14-20.
- Sagazio P., Tempesta M., Pratelli A., Normanno G., Buonavoglia C. (1998) "Correlazione antigenica tra CPV-2 e CPV-2b: risultati di prove sierologiche crociate". *Atti SISVET LII*: 183-184.
- Schunk B., Truyen U. (1996) "Polymerase Chain Reaction assay for the detection of canine and feline Parvoviruses in feces". *Revue Médicine Vétérinaire* 147:109-110.
- Tempesta M., Sagazio P., Buonavoglia C., Conserva A., Cirone F., Iovane G. (1996) "Impiego della reazione a catena della polimerasi (PCR) per la diagnosi di parvovirosi del cane". *Atti SISVET L*: 319-320.
- Thrusfield M. In: "Veterinary Epidemiology". Blackwell Science Ltd., Cambridge; II edizione, 1995.
- Uwatoko K., Sunairi M., Yamamoto A., Nakajima M., Yamaura K. (1996) "Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples". *Veterinary Microbiology* 52:73-79.