

VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI INNOCUITÀ E IMMUNOGENICITÀ DI UNA VARIANTE 2b DI PARVOVIRUS DEL CANE (CPV-2b)

CANIO BUONAVOGLIA, ANNAMARIA PRATELLI, MARIA TEMPESTA, VITO MARTELLA, GIOVANNI NORMANNO

*Dipartimento di Sanità e Benessere degli animali - Sezione Malattie Infettive
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Bari - s.p. per Casamassima Km. 3 - 70010 Valenzano (BA)*

Riassunto

Vengono descritte le caratteristiche di innocuità e di immunogenicità per il cane dello stipite 29-97/40 di parvovirus del cane, variante 2b (CPV-2b), sottoposto a 40 passaggi seriali su cellule renali di gatto (CRFK).

I cuccioli inoculati con lo stipite 29-97/40 non hanno manifestato segni clinici di malattia e non hanno avuto variazioni del numero totale dei leucociti. La stabilità dell'innocuità è stata confermata con 4 retropassaggi su cane. Dopo 14 giorni dalla inoculazione, nei sieri dei cani sono stati evidenziati elevati titoli anticorpali IEA (1:2560). Lo stipite CPV-2b 29-97/40 ha evidenziato una completa innocuità ed un ottimo potere immunogeno per il cane.

Summary

The evaluation of safety and immunogenicity for dogs of a canine parvovirus variant 2b (CPV-2b) is reported. The CPV-2b strain 29-97/40 was tested after 40 serial passages in Crandell Feline Kidney (CRFK) cells.

The pups inoculated with 29-97/40 strain did not have any signs of illness and decrease in white blood cells (WBC) numbers. Four back-passages in pups indicated that the safety of the strain was stable. All inoculated pups developed high levels (1:5120) of hemagglutination inhibiting (HI) antibody titers.

These results suggest that the 29-97/40 CPV-2b strain is safe and immunogenic for dogs.

INTRODUZIONE

Il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2), comparso nel 1978 quale nuovo patogeno responsabile di miocardite e di gastroenterite emorragica nei cuccioli¹, ha subito nel giro di pochi anni significative variazioni antigeniche.

Nel 1985 Parrish et al., mediante l'impiego di anticorpi monoclonali (MoAbs) e l'analisi con enzimi di restrizione, hanno infatti dimostrato che l'originale tipo antigenico era stato sostituito, tra il 1979 e il 1981, da una variante antigenica denominata CPV-2a e che, intorno al 1984, era comparsa una seconda variante antigenica, denominata CPV-2b, diversa dalla precedente per la sostituzione di un aminoacido (Asparagina → Acido aspartico)^{2,3,4}.

Attualmente l'originale tipo antigenico CPV-2 risulta presente solo nei vaccini.

Rispetto allo stipite originale, le varianti CPV-2a e CPV-2b presentano, oltre alle differenze antigeniche, anche una importante modificazione dello spettro d'ospite in quanto possono infettare anche il gatto, una specie non colpita da CPV-2⁵.

La variante CPV-2b è prevalente nella popolazione canina mondiale, anche se, nei vari Paesi, le due varianti possono essere distribuite in maniera diversa: negli USA prevale CPV-2b, nel Regno Unito, in Australia e in Italia domina CPV-2a, mentre in Germania e in Spagna si assiste ad un equilibrio di distribuzione tra le 2 varianti^{6,7,8}.

Tuttavia, secondo diversi autori^{6,9}, l'evoluzione antigenica di CPV-2 non ha compromesso la capacità dei vaccini in commercio di proteggere i cuccioli da infezioni sostenute dalle varianti antigeniche attualmente circolanti.

Risultati preliminari di prove sierologiche crociate effettuate su sieri di cani vaccinati con CPV-2 hanno tuttavia

evidenziato che, verso il virus omologo, i titoli anticorpali sieroneutralizzanti sono significativamente più alti di quelli diretti verso la variante CPV-2b¹⁰.

Questi risultati, unitamente alle considerazioni che la variante CPV-2, oltre ad aver evidenziato una notevole plasticità antigenica, non è comunque più circolante nella popolazione canina, suggeriscono di prendere in considerazione l'ipotesi di immunizzare i cani con la variante CPV-2b essendo questa variante prevalente nella popolazione canina mondiale.

Nella presente nota vengono riportati i risultati di uno studio sulle caratteristiche di innocuità e immunogenicità di una variante CPV-2b.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari

Per l'isolamento del virus dai campioni di feci è stata utilizzata la linea cellulare di cane A-72, sviluppata in terreno minimo essenziale di Dulbecco (DMEM), con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino.

I passaggi seriali dello stipite CPV-2b sono stati effettuati in cellule renali di gatto in linea continua Crandell Feline Kidney (CRFK), coltivate in D-MEM con il 10% di SFB.

Origine del virus

Lo stipite CPV 29-97 è stato isolato dalle feci di un cucciolo di 50 giorni di età morto per una grave forma di gastroenterite emorragica.

L'omogenato di feci al 20% è stato centrifugato a 4000x g per 20' e il surnatante, dopo filtrazione a 0,22 micrometri (Millipore), è stato inoculato in cellule A-72 appena trisinate.

La crescita del virus è stata valutata con prove di emagglutinazione (EA) a +4°C con emazie di suino all'1% e con prove di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando un siero di cane positivo per CPV.

Lo stipite CPV isolato è stato poi tipizzato come variante CPV-2b utilizzando il panel di anticorpi monoclonali (Mo Abs) e le metodiche descritte in precedenza⁸.

Passaggi seriali

Lo stipite 29-97, a partire dal 2° passaggio, è stato passato serialmente 40 volte su cellule CRFK con intervalli di 4 giorni.

Monostrati di cellule infette che avevano fornito esito positivo al test EA e al test IFI sono stati sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento rapidi.

Il criolisato è stato utilizzato per effettuare il passaggio successivo.

La sospensione virale del 40° passaggio (29-97/40), dopo centrifugazione a 4000x g per 30', è stata suddivisa in aliquote da 1 ml, titolata su cellule CRFK, e conservata a -80°C.

Sullo stock virus del 40° passaggio (lotto di semenza) sono state effettuate tutte le prove successive.

Test di sterilità

La sospensione virale 29-97/40 è stata sottoposta a prove di sterilità per batteri aerobi, anaerobi, micoplasmi e miceti utilizzando le usuali tecniche.

Test di assenza di virus contaminanti

Il virus 29-97/40 è stato neutralizzato con siero di cane positivo per CPV e quindi inoculato su monostrati di cellule di cane Madin Darby Canine Kidney, su cellule di scimmia VERO e su cellule di bovino Madin Darby Bovine Kidney.

Sono stati effettuati 3 passaggi seriali ad intervalli di 7 giorni, valutando quotidianamente l'eventuale comparsa di effetto citopatico (ECP).

Sulle cellule inoculate con il 3° passaggio è stato effettuato un test IFI per la ricerca di Pestivirus utilizzando i MoAbs specifici, mentre il surnatante è stato saggiato in prove di EA con emazie di pollo, cavia e uomo gruppo 0.

Titolazione

Lo stock virus 29-97/40 è stato diluito in base 10 in D-MEM utilizzando 4 pozzetti di piastre a 96 per ciascuna diluizione. In ciascun pozzetto sono state quindi aggiunte 20.000 cellule CRFK sospese in D-MEM con il 10% di SFB.

Dopo 4 giorni di incubazione a 37°C, in assenza di un evidente ECP, il surnatante di ciascun pozzetto è stato sottoposto al test EA utilizzando emazie di suino all'1%.

Il titolo del virus è stato calcolato in base al risultato (positivo o negativo) della EA di ciascun pozzetto ed espresso in dosi infettanti tessuto colture (TCID₅₀).

Test di identificazione

Il virus 29-97/40 è stato identificato come CPV in prove di EA con emazie di suino e, successivamente, in prove di inibizione dell'agglutinazione (IEA) e di IFI utilizzando un siero di cane positivo per CPV.

La conferma della tipizzazione come variante CPV-2b è stata effettuata con i MoAbs, secondo la metodica descritta⁸.

Test di innocuità

Due cuccioli di 50 giorni di età, privi di anticorpi IEA per CPV, sono stati inoculati per via oro-nasale con 3 ml dello stock virus 29-97/40. I cuccioli sono stati mantenuti in osservazione per 15 giorni sottoponendoli quotidianamente a visita clinica e alla conta leucocitaria.

Ogni giorno è stato inoltre prelevato un campione di feci per valutare l'eliminazione dello stipite virale mediante prove di isolamento su cellule.

Il virus isolato è stato sistematicamente sottoposto a tipizzazione con MoAbs.

Dopo 14 giorni dall'inoculazione è stato inoltre valutato il livello di anticorpi EA nei confronti di CPV-2b.

Retro-passaggi

Lo stipite 29-97/40 è stato sottoposto a 4 retropassaggi su cani secondo quanto descritto in precedenza^{11,12}. Allo scopo sono stati impiegati cuccioli di 50 giorni di età privi di anticorpi nei confronti di CPV-2b utilizzando 1 soggetto per ciascun passaggio.

Il primo soggetto è stato inoculato per via oro-nasale con 3 ml dello stock virus (1 ml per narice e 1 ml per os) ed è stato mantenuto in osservazione per 15 giorni effettuando ogni giorno l'esame clinico, la conta leucocitaria e il prelievo di campioni di feci per valutare l'escrezione del virus.

Dopo 14 giorni dall'inoculazione è stato prelevato un campione di sangue per la determinazione degli anticorpi IEA nei confronti di CPV-2b.

I successivi retropassaggi sono stati effettuati con le stesse modalità utilizzando per l'inoculazione il virus reisolato dalle feci del cucciolo del passaggio precedente.

Test di immunogenicità

Tre cuccioli di 60 giorni di età privi di anticorpi IEA nei confronti di CPV-2b sono stati inoculati per via intramuscolare con 1 ml dello stock virus 29-97/40 con titolo pari a $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml.

Dopo 7 e 14 giorni dalla inoculazione, sui sieri dei cani è stata fatta la determinazione degli anticorpi IEA nei confronti di CPV-2b.

RISULTATI

Lo stipite virale CPV-2b 29-97 anche dopo 40 passaggi seriali su cellule CRFK, non ha acquisito la capacità di indurre "in vitro" un evidente ECP. Il titolo infettante su cellule è risultato pari a $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml, mentre il titolo EA è sempre rimasto su valori intorno a 1:4000.

Il lotto di semenza è risultato esente da batteri aerobi e anaerobi, da micoplasmi e da miceti. Nelle cellule inoculate con il virus neutralizzato non è stato mai evidenziato ECP, il test IFI per pestivirus è risultato negativo e il surnatante non ha evidenziato attività EA verso le emazie utilizzate.

I due cuccioli utilizzati per la prova di innocuità sono rimasti in buone condizioni di salute per tutto il periodo di osservazione e non hanno mostrato significative variazioni del numero totale dei globuli bianchi.

Nei campioni di feci il virus CPV-2b è stato evidenziato dal 5° al 7° giorno dopo l'inoculazione.

Dopo 14 giorni dall'inoculazione nel siero è stato ritrovato un titolo anticorpale IEA pari a 1:5120

I quattro cuccioli utilizzati per i retropassaggi del virus, durante il periodo di osservazione sono rimasti in buone condizioni di salute e non hanno presentato variazioni significative del numero totale di globuli bianchi.

L'eliminazione del virus con le feci è stata osservata dal 5° al 7° giorno dopo l'inoculazione.

Nei sieri di tutti i soggetti, dopo 14 giorni dall'inoculazione, sono stati osservati titoli anticorpali IEA pari a 1:5120.

I tre cuccioli utilizzati nelle prove di immunogenicità

sono rimasti in buone condizioni di salute per tutto il periodo di osservazione.

Nei sieri di tutti e tre i soggetti, dopo 7 giorni dall'inoculazione, è stato evidenziato un titolo IEA pari a 1:1280 mentre, dopo 14 giorni, il titolo anticorpale è risultato pari a 1:5120.

DISCUSSIONE

Lo stipite CPV-2b 29-97, sottoposto a 40 passaggi seriali su cellule, è risultato completamente innocuo per il cane. Negli animali inoculati non sono infatti comparse manifestazioni cliniche evidenti quali abbattimento del sensorio, vomito, diarrea, ecc. e non sono state notate variazioni significative del numero dei leucociti.

Quattro retro-passaggi su cuccioli hanno inoltre confermato la stabilità dell'attenuazione del potere patogeno per il cane della variante CPV-2b 29-97/40.

Nei sieri dei cuccioli inoculati per via intramuscolare con 1 ml di virus, già dopo 7 giorni dall'inoculazione è stato evidenziato un elevato titolo anticorpale IEA (1:1280) e, dopo 14 giorni, il titolo è risultato pari a 1:2560 in tutti e tre i soggetti.

Al momento non sono state eseguite prove di challenge degli animali vaccinati, tuttavia i titoli anticorpali sono risultati di gran lunga superiori al valore minimo (1:80) ritenuto protettivo nei confronti dell'infezione da virus patogeno.

Lo stipite 29-97/40 è risultato quindi completamente apatogeno per il cane, anche dopo quattro retro-passaggi, ha evidenziato una spiccata attività immunogena e può quindi essere utilizzato per la profilassi della parvovirosi, anche in considerazione del fatto che la variante CPV-2, utilizzata per la preparazione di tutti i vaccini attualmente in uso, non è più circolante nella popolazione canina.

In ricerche successive verranno approfonditi gli aspetti relativi alle correlazioni tra CPV-2 e CPV-2b da un punto di vista immunologico (cross-protezione?) e, soprattutto, verrà valutata la possibilità di impiego della variante vaccinale CPV-2b in cuccioli con anticorpi di derivazione materna verso CPV.

Parole chiave

Cane, parvovirus, variante 2b, vaccino.

Key words

Dog, parvovirus, variant 2b, vaccine.

Abbreviazioni

CPV: Canine parvovirus. D-MEM: Dulbecco-Minimal Essential Medium. CRFK: Crandell Feline Kidney. MoAbs: anticorpi monoclonali. EA: emoagglutinazione. IFI: Immunofluorescenza Indiretta. ECP: effetto citopatico. IEA: inibizione dell'emoagglutinazione. TCID: dosi infettanti tessuto colture.

Bibliografia

1. Appel M.J.G., Scott W.F., Carmichael L.E. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105:156, 1979.
2. Parrish C.R., Have P., Foreyt W.J., Everman J.F., Senda M., Carmichael L.E. Natural variation of canine parvovirus. *Science*. 230:1046, 1985.
3. Parrish C.R., O'Connell P.H., Everman J.F., Carmichael L.E. Global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69:1111, 1988.
4. Parrish C.R., Aquadro C.F., Stassheim M.L., Everman J.F., Sgro J.-Y., Mohammed H.O. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Virology*. 129:401, 1991.
5. Truyen U., Agbandje M., Parrish C.R. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology*. 198:175, 1994.
6. Greenwood N.M., Chalmers W.S.K., Baxendale W., Thompson H. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 21:63, 1995.
7. De Ybanez R.R., Vela C., Cortes E., Simarro I., Casal J.I. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136:174, 1995.
8. Sagazio P., Tempesta M., Buonavoglia D., Normanno G., Buonavoglia C. Le varianti antigeniche del parvovirus del cane: un problema emergente? *Veterinaria*, anno 12, n. 1, febbraio 1998.
9. Appel M.J.G. and Carmichael L.E. Protection of pups with a commercial vaccine against a recent field isolate of canine parvovirus. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 82:1091, 1987.
10. Sagazio P., Tempesta M., Buonavoglia D., De Palma M.G., Buonavoglia C. Antigenic relationship between CPV-2 and CPV-2b: results of a serological study. *Virology of carnivores- First International Meeting, Utrecht, The Netherlands, 13-15 Maggio 1998.*
11. Buonavoglia C., Compagnucci M., Orfei Z. Dog response to plaque variant of canine parvovirus. *Zbl. Vet. Med. B*, 30:526, 1983.
12. Carmichael L.E., Joubert J.C., Pollock R.U.H. A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. *Viral attenuation and dog response. Cornell Vet.*, 71:408, 1981.