

# PARVOVIRUS DEL CANE: STUDIO MOLECOLARE DI ALCUNI CEPPI DEL TIPO 2 (CPV-2)

MARA BATTILANI, SANTINO PROSPERI

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università degli Studi di Bologna,  
Via Tolara di Sopra, 50, 40064-Ozzano Emilia (BO), Italia

## Riassunto

In questo lavoro sono state analizzate le sequenze del gene che codifica per la proteina virale VP2 (Viral Protein 2, VP2) di 17 ceppi di parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2) isolati da cani e 4 ceppi isolati da lupi.

Nella sequenza del gene VP2 sono state rilevate diverse mutazioni nucleotidiche che si traducono in cambiamenti nell'aminoacido codificato a livello dei residui 265, 297, 426 e 440 della proteina del capsido VP2.

L'analisi filogenetica effettuata utilizzando sequenze analoghe di CPV-2 pubblicate su banche dati, rileva una stretta somiglianza degli isolati italiani con recenti isolati asiatici e conferma un processo evolutivo omogeneo del CPV-2 a livello mondiale; dall'albero filogenetico non si evince una suddivisione degli isolati sulla base della provenienza geografica.

## Summary

*The viral protein VP2 genes of 17 Italian canine parvovirus (CPV) type 2 strains isolated from dogs and 4 isolates from wolves were sequenced and molecular genetics analysis was conducted.*

*In the VP2 sequences were detected several coding changes that modified the residues 265, 297, 426 and 440 of the viral protein VP2.*

*Phylogenetic analysis revealed that the Italian CPV-2 strains followed the same evolution as observed in other countries, and the Italian isolates are similar to Asian strains.*

## INTRODUZIONE

L'evoluzione delle malattie virali avviene attraverso complesse interazioni tra virus, ospite ed ambiente. La comparsa di un nuovo agente patogeno è un evento che si può determinare con vari meccanismi<sup>1</sup>. Il parvovirus canino di tipo 2 (CPV-2) e il virus dell'immunodeficienza umana dell'AIDS (HIV) costituiscono un tipico esempio di come la comparsa di un nuovo patogeno possa avvenire esclusivamente per mutazioni del genoma virale<sup>2</sup>.

Il CPV-2 costituisce un modello interessante per studiare i meccanismi di evoluzione virale, infatti trattandosi di un virus comparso recentemente, è stato possibile effettuare studi approfonditi sul genoma virale, inoltre è possibile che l'antenato del CPV-2 sia conservato in qualche raccolta istologica.

## Origine del CPV- 2

Le prime segnalazioni di parvovirosi nel cane risalgono al 1978<sup>3</sup>, quando pressoché contemporaneamente negli Stati Uniti, in Canada, in Australia e in alcuni paesi Europei, comparvero gravi forme gastro-enteriche nei soggetti di età superiore alle sei settimane con morte improvvisa dei cuccioli in seguito a miocardite ed insufficienza cardiaca congestizia. Tale virus venne denominato CPV-2 per distinguerlo dal Minute Virus of Canines (MVC), che essendo il primo parvovirus autonomo isolato nel 1967 dalle feci di cane fu denominato CPV-1<sup>4</sup>.

Al suo esordio la malattia si diffuse rapidamente in tutto il mondo assumendo un carattere epidemico; in seguito per il diffondersi nella popolazione di uno stato immunitario di base nei confronti del CPV-2, la parvovirosi ha perso l'iniziale carattere epidemico, assumendo un andamento endemico in molte aree geografiche.

Indagini retrospettive effettuate su sieri di cane raccolti tra il 1974 e il 1977 in Europa hanno rilevato sieropositi-

<sup>1</sup> "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 3/9/2001 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 20/11/2001".

vità verso il CPV-2<sup>5,6,7</sup>, quindi è molto probabile che il virus sia originato in Europa a metà degli anni Settanta, in un periodo antecedente alla sua diffusione mondiale avvenuta nel 1978.

In Italia il primo isolamento di parvovirus nel cane risale al 1980; attualmente nel nostro Paese l'infezione è endemica come nel resto dell'Europa<sup>8</sup>.

Varie ipotesi sono state avanzate per spiegare l'origine del CPV-2. Considerata la stretta correlazione genomica ed antigenica del CPV-2 con il virus della panleucopenia felina (FPV), si è ipotizzato che il CPV-2 rappresenti una variante d'ospite del FPV originatasi nella popolazione canina o felina; un'altra ipotesi è che si sia originato dal virus vaccinale della panleucopenia felina per un incidente di laboratorio; la terza ipotesi è che il virus si sia originato in un ospite diverso dal cane e dal gatto, probabilmente un carnivoro selvatico che ha albergato il ceppo ancestrale del CPV-2<sup>9</sup>. L'analisi delle sequenze geniche di diversi isolati di FPLV e CPV non ha evidenziato alcun ceppo ancestrale escludendo le prime due ipotesi<sup>10</sup>; di recente Truyen *et al.*,<sup>11</sup> hanno isolato da una volpe in Germania un ceppo di parvovirus avente caratteristiche intermedie tra il CPV-like e il FPV-like. Questo ceppo rappresenta quindi il collegamento tra i due gruppi virali, dato che, insieme alla significativa sieroprevalenza nelle volpi, sembra confermare l'ipotesi della trasmissione interspecifica tra carnivori domestici e selvatici.

## Evoluzione del CPV-2

Tra il 1979 e il 1981 lo stipite originariamente isolato nel 1978 e designato CPV-2 è stato rimpiazzato da un nuovo virus denominato CPV-2a che, a sua volta, è ulteriormente mutato nel 1984 in nuova variante identificata con la sigla di CPV-2b<sup>12</sup>.

Il meccanismo di tale evoluzione non è ancora stato completamente chiarito; in parte sembra dovuto alla pressione immunitaria, in quanto i nuovi tipi antigenici hanno perduto un epitopo neutralizzante rispetto all'originale tipo antigenico<sup>13</sup>. La stessa evoluzione però si è verificata anche nelle popolazioni di carnivori selvatici, quindi in animali non vaccinati<sup>14</sup>; questo starebbe ad indicare che la sostituzione del tipo 2 da parte dei nuovi tipi antigenici probabilmente si è verificata per una superiorità naturale delle nuove varianti e non è dipeso dall'intervento vaccinale<sup>15</sup>.

Le nuove varianti antigeniche 2a e 2b hanno completamente rimpiazzato l'originale tipo antigenico 2<sup>16</sup>, hanno esteso il loro spettro d'ospite al gatto, per cui sono in grado di infettare e causare la malattia nel gatto<sup>17,18</sup>.

Da indagini effettuate in Giappone e negli Stati Uniti è emerso che circa il 10% dei parvovirus isolati dai gatti sono CPV-like<sup>17,19</sup>. Il parvovirus del cane è stato isolato anche nei felidi selvatici in Africa<sup>20</sup> e da recenti indagini effettuate in Vietnam e Taiwan è emerso che più dell'80% dei parvovirus isolati da gatti domestici e selvatici erano CPV-2<sup>21</sup>. L'estensione dello spettro d'ospite dei nuovi tipi antigenici al gatto potrebbe giustificare il successo evolutivo delle nuove varianti che coesistono a livello mondiale in proporzione variabile. In futuro è ipotizzabile che il CPV-2 possa rimpiazzare l'originale parvovirus del gatto nei

gatti domestici comunemente vaccinati contro la panleucopenia felina<sup>9,21</sup>.

L'evoluzione del CPV non sembra però essere terminata; l'analisi di recenti isolati ha evidenziato la presenza di una nuova variante caratterizzata da una mutazione puntiforme a livello del residuo 297 della proteina del capsido VP2 dove una serina è sostituita con l'alanina. Indagini retrospettive hanno evidenziato che questo virus è comparso per la prima volta in Germania nel 1993 ed è attualmente la variante prevalente nel Nord-Europa<sup>22</sup>; è presente anche in altre parti del mondo, come in Giappone, Taiwan, non è presente negli isolati africani e non è prevalente negli Stati Uniti<sup>9</sup>. Anche in Italia come nel resto dell'Europa la variante 297 è prevalente ed è rilevabile sia nell'ambito del tipo antigenico 2a che del 2b<sup>23</sup>.

Negli isolati italiani di CPV-2 di cane e di lupo è stata riscontrata una mutazione a livello del residuo 265 della proteina VP2, dove una treonina viene sostituita da una prolina. Questo cambio aminoacidico determina una modificazione della struttura della proteina a livello del motivo a "jelly-roll"<sup>24</sup>. Il ripiegamento a "jelly-roll" delle proteine virali è caratteristico di diversi virus a simmetria icosaedrica<sup>25</sup> ed è una zona tra le più conservate nell'ambito dei parvovirus<sup>26</sup>. Questa mutazione determina la distruzione di uno dei foglietti della proteina<sup>24</sup>, provocando quindi una drastica modificazione della struttura della proteina tra l'altro in una zona che contrae rapporti con il DNA<sup>27</sup>, di conseguenza è ipotizzabile un'implicazione di tale mutazione nell'interazione DNA-proteina.

Le conseguenze biologiche delle varianti 297 e 265 sono ancora sconosciute.

Di recente in Asia è stato evidenziato nei leopardi un nuovo tipo antigenico denominato CPV-2c; questa nuova variante è geneticamente correlata con i tipi 2a e 2b, e possiede un amminoacido diverso rispetto alle varianti finora conosciute a livello del residuo 300 della VP2, mutazione che determina un notevole cambiamento nelle proprietà antigeniche del virus<sup>21</sup>. Infezioni sperimentali hanno evidenziato una virulenza minore nel gatto dei tipi antigenici 2a e 2b rispetto al nuovo tipo antigenico 2c<sup>28</sup>.

## Proprietà del CPV-2

Il parvovirus del cane è un piccolo virus a DNA delle dimensioni di 18-26 nm, a simmetria icosaedrica, sprovvisto di envelope<sup>29</sup>.

Il genoma virale costituito da un unico filamento di DNA a singola catena di 5200 bp, contiene due open reading frames (ORFs). Il primo ORF all'estremità 3' codifica per due proteine non strutturali (Non structural, NS1 e NS2), il secondo ORF all'estremità 5' codifica per due proteine strutturali (Viral Protein, VP1 e VP2). Nelle particelle virali "full" contenenti il DNA la proteina VP2 subisce il clivaggio dell'estremità N dando origine ad una terza proteina strutturale, la VP3<sup>30</sup>.

Il capsido virale risulta dall'assemblaggio di un totale di 60 copie delle proteine strutturali VP1 e VP2 (5-6 copie di VP1 e 54-55 copie di VP2); la superficie del capsido virale appare irregolare per l'alternarsi di protrusioni (*spike*) e depressioni (*dimples* e *canyon*), il canyon è ritenuto il principale sito d'adsorbimento del parvovirus<sup>31</sup>. Due impor-

tanti siti antigenici (denominati A e B) sono stati rilevati mediante l'uso di anticorpi monoclonali specifici a livello dello spike del terzo asse di simmetria<sup>13, 32</sup>.

La VP2 costituisce la proteina strutturale più rappresentata ed è sede di importanti epitopi che condizionano lo spettro d'ospite, le caratteristiche genetiche ed antigeniche ed altre importanti proprietà biologiche quali la capacità di emoagglutinare le emazie di diverse specie animali<sup>12</sup>.

In questo studio abbiamo esaminato le caratteristiche genetiche ed antigeniche di recenti CPV-2 isolati in Italia; il gene virale che codifica per la proteina VP2 è stato sequenziato allo scopo di monitorare l'evoluzione degli isolati italiani.

## MATERIALI E METODI

### Virus

Sono stati esaminati 17 ceppi di CPV-2 isolati tra il 1994 e il 2000 da cani con sintomatologia gastro-enterica e 4 ceppi isolati da lupo<sup>33</sup>. Gli isolati erano provenienti da diverse parti dell'Italia.

I campioni fecali sono stati opportunamente trattati ed inoculati su fibroblasti di embrione felino (linea cellulare FEA) come descritto da Mochizuchi e Hashimoto<sup>34</sup>. I virus sono stati amplificati in coltura cellulare per tre passaggi e l'infezione virale è stata giudicata dalla comparsa di un caratteristico effetto citopatico dopo 72 ore post-infezione<sup>34</sup>.

I virus esaminati sono elencati nella Tabella 1 dove è riportato anche il tipo antigenico di appartenenza<sup>23</sup>.

### Sequenziamento ed analisi del gene VP2

Il DNA virale di ogni ceppo è stato estratto dal surnatante del III passaggio cellulare utilizzando il QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany), secondo le indicazioni della ditta. Il gene VP2 è stato amplificato mediante polymerase chain reaction (PCR) utilizzando un set di quattro coppie di primers<sup>24, 38</sup>.

L'amplificazione mediante PCR dei vari segmenti del gene VP2 è stata effettuata utilizzando la Pfu Turbo (Stratagene, USA) mediante 35 cicli ciascuno costituito da una fase di denaturazione a 94°C per 30", una fase di *annealing* per 2' a temperatura variabile a seconda della temperatura di melting dei primers, e una fase di estensione a 72°C per 2'; al termine dei cicli ha fatto seguito un'estensione finale di 72 per 10'.

I prodotti di PCR sono stati purificati mediante l'impiego del kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Germany) quantificati e marcati con fluorocromi utilizzando il kit "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer Applied Biosystem Inc.). I prodotti ottenuti dalla reazione di sequenza sono stati precipitati, denaturati e caricati nel sequenziatore automatico "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" (Perkin Elmer Applied Biosystems Inc) con capillare da 36 o 47 cm e polimero POP-6. I dati di sequenza sono stati corretti, analizzati, allineati e confrontati per mezzo del software "Sequence Navigator" (Perkin Elmer Applied

Tabella 1  
Origine degli isolati di parvovirus canino (CPV-2) utilizzati in questo studio e relativo tipo antigenico d'appartenenza

Virus	Anno di isolamento	Origine	Tipo antigenico
W42	1995	Lupo	2b
W44	1995	Lupo	2b
W55	1995	Lupo	2b
W88	1995	Lupo	2b
CPV-584	1994	Cane	2a
CPV-589	1995	Cane	2a
CPV-598	1995	Cane	2b
CPV-603	1995	Cane	2b
CPV-616	1995	Cane	2b
CPV-618	1995	Cane	2a
CPV-632	1996	Cane	2a
CPV-637	1996	Cane	2b
CPV-660	1997	Cane	2a
CPV-677	1998	Cane	2a
CPV-684	1999	Cane	2a
CPV-685	1999	Cane	2a
CPV-687	1999	Cane	2a
CPV-689	1999	Cane	2a
CPV-695	2000	Cane	?
CPV-697	2000	Cane	2a
CPV-699	2000	Cane	2a

Biosystems Inc); le sequenze ottenute sono state immesse nella banca dati GenBank.

L'allineamento delle sequenze del gene VP2 dei vari isolati è stato effettuato utilizzando il programma GeneDoc<sup>39</sup>. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state comparate con altre sequenze analoghe disponibili su GenBank e l'analisi molecolare ed evolutiva è stata effettuata utilizzando il programma MEGA versione 2,1<sup>40</sup>.

## RISULTATI

Il sequenziamento del gene VP2 ha fornito un prodotto di sequenza di 1745 nucleotidi.

L'analisi delle sequenze conferma il tipo antigenico degli isolati precedentemente caratterizzati con gli anticorpi monoclonali specifici<sup>23</sup>.

Dall'allineamento delle sequenze è emersa una completa identità tra i 4 ceppi di lupo W42, W44, W55, W88, il CPV-603 e il CPV-616; tra CPV-584 e CPV-589 e tra il CPV-618, CPV-660, CPV-687 e CPV-697.

Gli altri isolati mostrano una omologia variabile tra il 99,5 e il 99,9%.

Nella Tabella 2 sono indicate le percentuali di divergenza e di identità tra i diversi isolati.

Nella Tabella 3 sono indicate le differenze nucleotidiche tra i diversi isolati.

La maggioranza delle sostituzioni nucleotidiche sono di tipo silente o sinonimo, cioè non determinano alcuna modificazione nell'amminoacido codificato. Le mutazioni codificanti o non-sinonime si rilevano nei nucleotidi (nt.) 3579-3675-4062-4064-4104 e si traducono rispettivamente

**Tabella 2**  
Percentuali di identità e di divergenza tra le varie sequenze

	584	589	598	603	616	618	632	637	660	677	684	685	687	689	695	697	699	W42	W44	W55	W88		
584		100	99,6	99,6	99,6	99,9	99,7	99,6	99,9	99,8	99,7	99,7	99,9	99,8	99,6	99,9	99,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	584
589	0,0		99,6	99,6	99,6	99,9	99,7	99,6	99,9	99,8	99,7	99,7	99,9	99,8	99,6	99,9	99,9	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	589
598	0,4	0,4		99,7	99,6	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,5	99,7	99,7	99,6	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	598
603	0,4	0,4	0,3			99,7	99,7	99,8	99,7	99,5	99,7	99,7	99,7	99,5	99,7	99,7	99,6	100	100	100	100	100	603
616	0,4	0,4	0,3	0,0		99,7	99,7	99,8	99,7	99,5	99,7	99,7	99,7	99,5	99,7	99,7	99,6	100	100	100	100	100	616
618	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3		99,8	99,7	100	99,9	99,8	99,8	100	99,8	99,7	100	99,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	618
632	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2		99,7	99,8	99,7	99,8	99,8	99,8	99,6	99,7	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	632
637	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3		99,7	99,5	99,7	99,7	99,7	99,6	99,7	99,7	99,6	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	637
660	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,0	0,2	0,3		99,9	99,8	99,8	100	99,8	99,7	100	99,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	660
677	0,2	0,2	0,3	0,5	0,5	0,1	0,3	0,5	0,1		99,7	99,7	99,9	99,7	99,5	99,9	99,8	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	677
684	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3		99,8	99,8	99,7	99,7	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	684
685	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2		99,8	99,6	99,7	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	685
687	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,0	0,2	0,3	0,0	0,1	0,2	0,2		99,8	99,7	100	99,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	687
689	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2		99,5	99,8	99,8	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	689
695	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5		99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	695
697	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,0	0,2	0,3	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,3		99,9	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	697
699	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	0,1	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1		99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	699
W42	0,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4		100	100	100	100	W42
W44	0,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,0		100	100	100	W44
W55	0,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,0	0,0		100	100	W55
W88	0,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0		100	W88
	584	589	598	603	616	618	632	637	660	677	684	685	687	689	695	697	699	W42	W44	W55	W88		

**Tabella 3**

Nucleotidi variati nella sequenza del gene VP2 degli isolati analizzati. I nucleotidi identici al CPV-584 sono indicati con una linea, mentre quelli che differiscono sono indicati con la lettera. Le mutazioni non sinonime che determinano modificazioni nell'aminoacido codificato sono indicate con la relativa posizione dell'aminoacido nella proteina VP2

Nt.	2816	2822	2861	2933	3089	3119	3179	3290	3323	3506	3542	3579	3675	3869	4062	4064	4096	4104	4388	4448	4496	4499
genoma completo	2816	2822	2861	2933	3089	3119	3179	3290	3323	3506	3542	3579	3675	3869	4062	4064	4096	4104	4388	4448	4496	4499
Nt. gene VP2	30	36	75	147	303	333	393	504	537	720	756	793	889	1083	1276	1278	1310	1318	1602	1662	1710	1713
CPV-584	A	A	T	G	T	G	T	T	C	T	A	A	G	G	A	T	A	A	A	T	G	T
CPV-589	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPV-598	-	-	C	A	-	-	-	-	T	C	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-	A	-
CPV-603-616	-	-	C	-	-	A	-	-	T	-	-	C	T	-	G	-	-	-	-	-	A	-
W42-44-55-88	-	-	C	-	-	A	-	-	T	-	-	C	T	-	G	-	-	-	-	-	A	-
CPV-618-660-687-697	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPV-632	-	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	C	A	-
CPV-637	-	-	C	-	-	-	-	C	T	-	-	-	T	A	G	-	-	-	-	-	A	-
CPV-677	-	-	C	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPV-684	-	G	C	-	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-
CPV-685	C	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G
CPV-689	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	T	-	-	-	-	-
CPV-695	-	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	G	A	-	-	-	-	A	-
CPV-699	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-

2a2263 T→P

2a2297 S→A

2a2426 N→D

2a2428 D→E

2a2440 T→A

con un cambio dell'amminoacido codificato nei residui 265 (treonina prolina), 297 (serina alanina), 426 (asparagina acido aspartico), 426 (acido aspartico acido glutammico) e 440 (treonina alanina) della VP2.

L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando le sequenze di ceppi isolati in diverse parti del mondo e pubblicate su GenBank.

Nell'albero filogenetico del gene VP2 (Fig. 1) sono identificabili tre gruppi principali: uno di questi gruppi include il FPV ed altri isolati FPV-like isolati in specie diverse dal cane. Un secondo gruppo include l'originale tipo antigenico 2, e il terzo gruppo include i nuovi tipi antigenici.

Nell'ambito di quest'ultimo gruppo si possono ulteriormente riconoscere diversi sottogruppi: uno di questi è costituito dai dodici isolati italiani del tipo 2a insieme con recenti isolati asiatici del tipo 2a; un altro sottogruppo include la maggior parte dei nostri isolati di tipo 2b insieme agli isolati africani, americani ed asiatici 2b (tipo 2b); un sottogruppo comprende il CPV-598, CPV-695 e diversi isolati asiatici del tipo 2b e 2c (variante 297), infine un sottogruppo è costituito dagli originali tipi antigenici 2a CPV-15 e CPV-31 che sono i ceppi di referenza americani.

## DISCUSSIONE

In questo lavoro sono state esaminate le sequenze del gene VP2 di 17 ceppi di CPV-2 isolati da cani e 4 ceppi isolati da lupi.

In Italia la situazione epidemiologica del CPV-2 è simile al resto dell'Europa con una maggiore prevalenza della variante 297<sup>22, 23</sup>; inoltre in Italia, come già avvenuto a livello mondiale, i nuovi tipi antigenici 2a e 2b hanno completamente rimpiazzato l'originale tipo antigenico 2<sup>41, 42</sup>.

L'analisi delle sequenze dei nostri isolati ha evidenziato una prevalenza delle mutazioni silenti nella regione del gene VP2 (Tab. 3); le mutazioni non codificanti sono localizzate principalmente in una determinata regione della VP2, tra i residui 260 e 440 come per altro rilevato già da altri autori<sup>43</sup>.

Dai dati delle sequenze si rileva una netta prevalenza della nuova variante caratterizzata dalla mutazione a livello del residuo 297, dove una serina viene sostituita dall'alanina. Da indagini precedentemente effettuate analizzando con gli enzimi di restrizione il gene VP1/VP2 di 62 ceppi di CPV-2 isolati da diverse regioni italiane, si è evidenziata una prevalenza dell'85,4% di questa nuova variante<sup>23</sup>, segno che anche in Italia come già avvenuto nel Nord Europa, la variante 297 è divenuta prevalente<sup>22</sup>.

Invece la mutazione del residuo 265 è stata riscontrata su un esiguo numero di campioni<sup>22</sup> ed è presente soprattutto nei tipi antigenici 2b<sup>23</sup>.

Nessun isolato possiede entrambe le mutazioni per cui probabilmente le due varianti 265 e 297 sono il risultato di due diverse linee evolutive.

Il residuo 426 della proteina VP2 consente la distinzione tra il tipo 2a e il 2b, infatti nella variante 2a a livello dell'amminoacido 426 è presente l'asparagina, invece nel 2b l'acido aspartico. Nel CPV-695 è stato riscontrato un altro amminoacido che è l'acido glutammico, quindi tale ceppo non è classificabile né come 2a né come 2b.

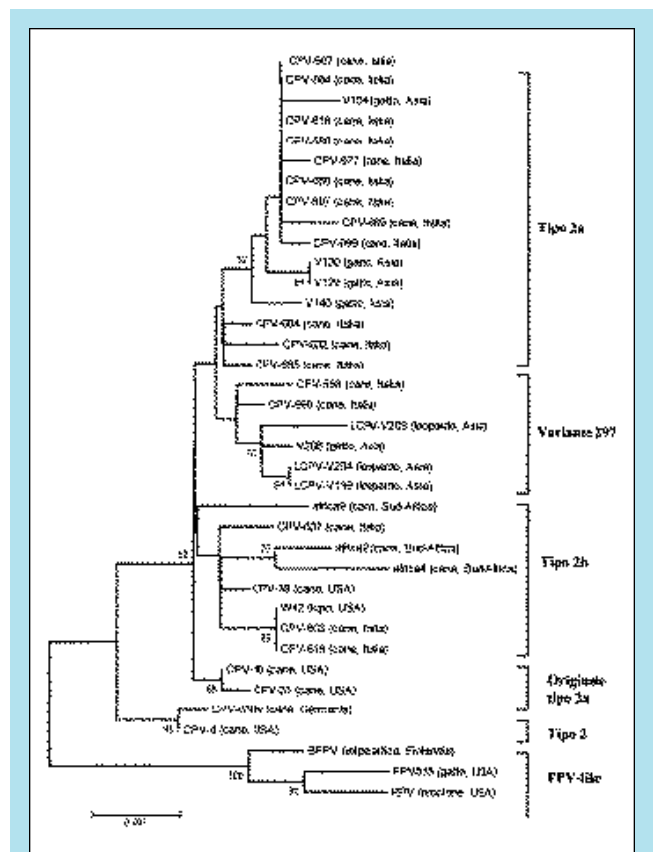


FIGURA 1 - Albero filogenetico costruito con le sequenze del gene VP2 degli isolati italiani e sequenze analoghe di parvovirus canino isolati in varie parti del mondo. Per valutare l'attendibilità dell'albero costruito, è stato eseguito il "bootstrapping test", di cui sono indicati sui rami i principali valori.

Questo cambio amminoacidico determina l'introduzione di un sito di taglio per l'enzima di restrizione MboII; sottoponendo ad analisi con tale enzima i nostri isolati è emerso che un altro ceppo presenta la stessa mutazione (dati non ancora pubblicati). Molto probabilmente si tratta di un nuovo tipo antigenico, pertanto ulteriori indagini tenderanno ad approfondire le caratteristiche di questo ceppo non A/non B.

Nel CPV-699 a livello del residuo 440, si è verificata una mutazione puntiforme con la sostituzione della treonina con l'alanina; tale residuo è localizzato in una zona altamente antigenica, a livello dello spike del 3° asse di simmetria. La maggiore variabilità tra i parvovirus è stata osservata in questa regione, che dal punto di vista strutturale è costituita da "loops", cioè da regioni a forma di ansa di forma e lunghezza variabile<sup>26</sup>.

La treonina e l'alanina sono due amminoacidi che possiedono differenti caratteristiche idropatiche: la treonina è un amminoacido polare, mentre l'alanina è un amminoacido idrofobico, per cui questo cambio amminoacidico potrebbe determinare una variazione dell'antigenicità della zona: questo dato è particolarmente significativo considerando che il CPV-699 è un ceppo particolarmente virulento isolato in un cucciolo morto con una grave forma di gastroenterite emorragica.

A livello mondiale la stessa mutazione è stata riscontrata anche in due ceppi, LCPV-V203 e LCPV-V139 isolati da leopardi in Asia.

Ai fini di stimare le relazioni filogenetiche abbiamo costruito un albero filogenetico per il gene VP2 utilizzando sequenze analoghe disponibili su GenBank.

Nell'albero filogenetico nove ceppi di tipo 2a formano un gruppo insieme agli isolati asiatici 2a. Tre isolati italiani del tipo 2a, il CPV-684, il CPV-685 e il CPV-632 sono localizzati in rami differenti a formare delle linee indipendenti: questo probabilmente dipende da mutazioni silenti possedute da questi ceppi rispetto agli isolati 2a.

All'interno del gruppo dei 2b sono compresi anche 4 ceppi italiani del medesimo tipo antigenico e in particolare il CPV-603, CPV-616 e il W42 costituiscono un gruppo a sé, probabilmente per la presenza della mutazione del nt. 3579 che si traduce con un cambio aminoacidico del residuo 265 della VP2 T → P, mutazione che non è segnalata per nessun altro ceppo a livello mondiale.

Invece il CPV-598, nonostante sia del tipo antigenico 2b, è incluso all'interno del gruppo 2a formando insieme al CPV-695 e ad alcuni isolati asiatici 2a e 2c un sottogruppo a sé: questi ceppi appartenenti a differenti tipi antigenici sono tutti accomunati dalla mutazione S297A, pertanto tale sottogruppo viene definito variante 297.

Dall'analisi filogenetica i nostri ceppi mostrano grande somiglianza con i recenti isolati asiatici (21). I ceppi asiatici che sono stati considerati in questo studio sono stati isolati nei felini domestici e selvatici, quindi questo dato indica che il CPV ha seguito la stessa evoluzione indipendentemente dalla specie ospite.

I nostri isolati hanno seguito lo stesso trend evolutivo come già osservato in altri Paesi, in particolare Nord-Europa e Asia, e dall'analisi filogenetica si denota come non esista una correlazione con l'area geografica di appartenenza dei ceppi.

Particolarmente interessante è l'aver rilevato tra gli isolati sequenziati un ceppo di cui non si può ancora definire il tipo antigenico di appartenenza. La presenza dell'acido glutammico nel residuo 426 del ceppo CPV-695 non è mai stata segnalata a livello mondiale e sarà interessante con ulteriori indagini chiarire le caratteristiche antigeniche di questo ceppo.

Poiché il CPV-2 è un virus recente e in continua evoluzione, è importante monitorare il virus sequenziando ulteriori isolati per rilevare cambiamenti antigenici. Le caratteristiche antigeniche del virus sono estremamente importanti, infatti nonostante l'utilizzo di vaccini vivi attenuati, il virus è ancora ampiamente diffuso in natura, e se i cuccioli non sono vaccinati o se gli anticorpi di derivazione materna interferiscono con la vaccinazione, gli animali si infettano.

Alla luce di questi risultati circa le mutazioni del virus si potrebbe ipotizzare che la vaccinazione con i tradizionali vaccini potrà in futuro non essere più sufficiente per proteggere gli animali. Inoltre anche i gatti, che sono divenuti recettivi al parvovirus del cane, rischiano in futuro di essere colpiti dal virus del cane.

## Parole chiave

*Canine parvovirus, CPV-2, sequenze, proteina virale, VP2.*

## Key words

*Canine parvovirus, CPV-2, sequences, viral protein, VP2.*

## Bibliografia

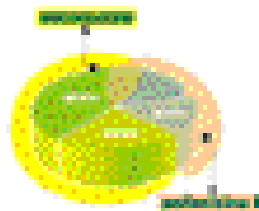
1. Truyen U, Parrish CR, Harder TC, Kaaden O-R: There is nothing permanent except change. The emergence of new virus diseases. *Vet. Microbiol.* 43: 103-122, 1995.
2. Nathanson N, McGann KA, Wilesmith J, et al: The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity and control. *Virus Res* 29: 3-20, 1993.
3. Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE: Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Record* 105: 156-159, 1979.
4. Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima A: Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun* 1: 503-508, 1970.
5. Koptopoulos G, Papadopoulos O, Papanastasopoulou M, Cornwell HJC: Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. *Vet. Record* 118: 332-333, 1986.
6. Schwers A, Pastoret PP, Burtonboy G, Thiry E: Fréquence en Belgique de l'infection à Parvovirus chez le chien, avant et après l'observation des premiers cas cliniques. *Ann Méd Vét* 123: 561-566, 1979.
7. Osterhaus ADME, Drost GA, Wirahadiredja RMS, van degh Ingh TSGAM: Canine viral enteritis: prevalence of parvo-, corona-, and rotavirus infections in dogs in The Netherlands. *Vet. Q.* 2: 181-190, 1980.
8. Buonavoglia C, Di Trani L, Orfei Z: Identificazione del parvovirus del cane, agente causale di una grave forma di gastroenterite: primo isolamento in Italia. *Sel Veterinaria*, 11: 1073-1074, 1980.
9. Truyen U: Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69: 47-50, 1999.
10. Truyen U, Geissler K, Parrish CR, et al.: No evidence for a role of modified live virus vaccines in the emergence of canine parvovirus. *J Gen Virol* 79: 1153-1158, 1998.
11. Truyen U, Müller T, Heidrich R, et al: Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infectious* 121: 433-440, 1998.
12. Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, et al: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution on canine parvovirus. *J Gen Virol* 65: 6544-6552, 1991.
13. Strassheim LS, Gruenberg A, Veijalainen P, et al.: Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184, 1994.
14. Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, et al.: The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol* 69: 1111-1116, 1988.
15. Parrish CR: Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvovirus. *Adv Virus Res* 38, 1990.
16. Parrish CR: The emergence and evolution of canine parvovirus-an example of recent host range mutation. *Seminars in Virology* 5: 121-132, 1994.
17. Mochizuki M, Horiuchi M, Hiragi H, et al.: Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J Clin Microbiol* 34: 2101-2105, 1996.
18. Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR: Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215:186-189, 1996.
19. Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR: Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol* 63: 4702-4710, 1996.
20. Steinel A, Munson L, van Vuuren L, Truyen U: Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J Gen Virol* 81: 345-350, 2000.
21. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, et al.: Predominance of Canine Parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278:13-19, 2000.
22. Truyen U, Steinel A, Bruckner L, et al.: Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 142: 115-119, 2000.
23. Battilani M, Ciulli S, Tisato E, Prosperi S: Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. *Virus Res*, 83:149-157, 2002.
24. Battilani M, Scagliarini A, Tisato E, et al: Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dog isolated in Italy. *J Gen Virol* 82: 1555-1560, 2001.
25. Rossmann MG, Johnson JE: Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* 58: 533-573, 1989.

26. Chapman MS, Rossmann RG: Structure, sequence, and function correlations among Parvoviruses. *Virology* 194: 491-508, 1993.
27. Chapman MS, Rossmann RG: Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure* 3: 151-162, 1995.
28. Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, et al.: Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(3): 663-668, 2001.
29. Appel MJG, Parrish CR: Canine parvovirus type 2. In: *Virus infections of carnivores*. Elsevier, Amsterdam, 1987, pp 69-92.
30. Wu H, Rossmann MG: The canine parvovirus empty capsid structure. *J Mol Biol* 233: 231-244, 1993.
31. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, et al.: The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251: 1456-1463.
32. Wikoff WR, Wang G, Parrish CR, et al: The structure of a neutralized virus: canine parvovirus complexed with neutralizing antibody fragment. *Structure* 2: 595-607, 1994.
33. Martinello F, Galuppo F, Ostanello F, et al.: Detection of canine parvovirus in wolves from Italy. *J Wildlife Dis* 33: 628-633, 1997.
34. Mochizuki M, Hashimoto T: Growth of feline panleukopenia virus and canine parvovirus in vitro. *Jpn J Vet Sci* 48: 841-844, 1986.
35. Reed AP, Jones EV, Miller TJ: Nucleotide sequence and genome organization of Canine Parvovirus. *J Virol* 69: 1111-1116, 1988.
36. Rhode SL: Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J Virol* 54: 630-633, 1985.
37. Senda M, Parrish CR, Harasawa R, et al.: Detection by PCR of wild-type Canine Parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol* 33: 110-113, 1995.
38. Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M: Comparison of polymerase chain reaction and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci* 55: 60-63, 1995.
39. Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DWII: GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* 4: 14, 1997.
40. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M: MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, in press, 2001.
41. Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, Cirone F & Buonavoglia C, 1998. Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73, 197-200.
42. Buonavoglia, D, Cavalli, A, Pratelli, A, Martella, V, Greco, G, Tempesta, M, Buonavoglia, C, 2000. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Microbiologica* 23, 93-96.
43. Horiuchi M, Yamaguchi Y, Gojabori T, et al.: Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Virology* 249: 440-452, 1998.

# l'arma vincente contro le otiti.

perché...

**Surolan è l'associazione vincente di Miconazolo e Polimixina B**



perché...

**Surolan utilizza un veicolo studiato per ottimizzare la diffusione.**

Il prodotto non aderisce ma diffonde bene in tutto il condotto uditivo in modo da trattare in modo uniforme tutte le zone colpite.



# SUROLAN



**JANSSEN-CILAG** s.p.a.

Via Michelangelo Buonarroti, 21 • 20095  
Cologno Monzese • Tel. 0225801 • Fax 0225708196