

IMMUNIZZAZIONE DI CUCCIOLI CON ANTICORPI MATERNI NEI CONFRONTI DEL PARVOVIRUS DEL CANE CON VACCINO VIVO MODIFICATO CPV-2b PER VIA INTRANASALE

IMMUNIZATION OF PUPS WITH MATERNAL DERIVED ANTIBODIES AGAINST CANINE PARVOVIRUS, USING AN INTRANASALLY ADMINISTERED MODIFIED LIVE CANINE PARVOVIRUS TYPE 2b VACCINE

ALESSANDRA CAVALLI¹, VITO MARTELLA¹, COSTANTINA DESARIO¹, NICOLA DECARO¹, MARCO CAMPOLO¹, MARIALaura CORRENTE¹, LAURA MANNA², CANIO BUONAVOGLIA¹

¹ Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano (BA)

² Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli (NA)

Riassunto

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia di un vaccino CPV-2b vivo modificato (ML), somministrato per via intranasale, in cuccioli con anticorpi di derivazione materna (MDA). Sono stati utilizzati 78 cuccioli di 5-7 settimane di età, provenienti da 16 diverse cucciolate e nati da madri vaccinate con un vaccino ML CPV-2 prima dell'accoppiamento. Tutti i cuccioli sono stati vaccinati a 5 settimane di età. Gli animali che non avevano presentato sierconversione in seguito alla prima vaccinazione, sono stati nuovamente vaccinati a 7 settimane di età. Il vaccino ha indotto sierconversione attiva in tutti i cuccioli con titoli MDA $\leq 1:80$, nonché nel 66,6% e nel 37,5% dei cuccioli con titoli MDA rispettivamente uguali a 160 e 320. Nessun cucciolo con titolo ≥ 640 , ha sierconvertito dopo la vaccinazione. L'analisi di sequenza della ORF2 ha evidenziato, nella porzione che codifica per la proteina capsidica VP2, l'esistenza di differenze aminoacidiche, tra lo stipite vaccinale ML CPV-2b utilizzato nel presente studio ed i vaccini commerciali allestiti con lo stipite CPV-2. L'elevata efficacia dei vaccini ML-CPV-2b in cuccioli con alti livelli di MDA può essere attribuita alle differenze antigeniche/biologiche esistenti tra CPV-2 e le varianti 2a/b, nonché alla migliore induzione della risposta attiva che si ottiene mediante la somministrazione intranasale del vaccino.

Summary

The purpose of this study was to evaluate the ability of a modified live (ML) canine parvovirus (CPV) type 2b vaccine, to elicit active immunization in pups with maternally derived antibodies (MDA) by intranasal administration. Seventy-eight 5 to 7-week-old pups were used from 16 litters born to bitches that had been vaccinated with a commercially-available ML CPV-2 vaccine, before mating. Pups were vaccinated initially when they were 5 weeks old. If they failed to seroconvert, they were re-vaccinated at the age of 7 weeks. The vaccine induced active seroconversion in all the pups with MDA of ≤ 80 , as well as in 66.6% and 37.5% of pups with MDA titers respectively of 160 and 320. None of the pups with MDA titers ≥ 640 sero-converted after vaccination. Sequence analysis in the ORF2, revealed several amino acid changes in the capsid protein VP2, between the ML CPV-2b virus used in this study and commercially-available type-2 vaccine viruses. The high efficacy of the ML-CPV-2b vaccine in overcoming the MDA obstacle may be accounted for by either the antigenic/biological differences between CPV-2 and the variants 2a/b, or a better induction of active immunization obtainable administering the vaccine by the nasal route.

INTRODUZIONE

Agli inizi degli anni '70 fu osservata in tutto il mondo, una grave patologia infettiva dei cuccioli, associata ad un

nuovo parvovirus e caratterizzata da miocardite e gastroenterite emorragica^{1,2,3,4}. L'agente eziologico fu definito parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2), per distinguerlo dal già noto parvovirus del cane tipo 1 (CPV-1 o minute virus of canine, MVC)^{5,6,7}.

CPV-2 è strettamente correlato al virus della panleucopenia felina (FPV), verso il quale presenta una omologia di sequenza superiore al 98%, e ad altri parvovirus

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 6/7/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 4/12/2006".

dei carnivori selvatici, come il parvovirus dell'Enterite del visone (MEV)⁸, il parvovirus del procione (RPV) ed il parvovirus della volpe blu (BFPV). Tutti questi parvovirus sono considerati parte del sottogruppo del parvovirus felino⁹.

Si ipotizza che CPV-2 sia comparso nella popolazione canina come variante d'ospite di FPV o di un altro parvovirus FPV-like circolante nei carnivori selvatici.

CPV-2 è un patogeno in continua evoluzione antigenica. Infatti, negli anni '80, due nuove varianti, designate 2a e 2b e distinguibili con anticorpi monoclonali, comparvero in rapida successione^{10,11}, distribuendosi in maniera variabile nella popolazione canina e sostituendosi completamente allo stipite originario^{12,13,14,15,16,17,18,19,20,21}. Più di recente, sono stati identificati altri stipiti CPV-2 con ulteriori mutazioni a carico di alcuni importanti residui (297, 300 e 426) della proteina capsidica (Tab. 1)^{16,22,23,24,25,26}.

L'insorgenza e la rapida diffusione di queste nuove varianti potrebbero essere correlate ad un aumento del fitness virale derivante dalla stabilizzazione del capsido, dalle variazioni antigeniche ed anche da un migliore adattamento all'ospite.

A livello di proteina capsidica VP2, CPV-2 differisce da FPV solo per la sostituzione di 6 o 7 aminoacidi e le varianti CPV-2a/b differiscono dallo stipite originale CPV-2 per ulteriori 5-6 sostituzioni (Tab. 1).

Mutazioni puntiformi nella sequenza della VP2 di FPV, CPV-2 e CPV-2a/b sono pertanto responsabili di notevoli cambiamenti a carico delle loro proprietà antigeniche e biologiche.

In vitro, FPV replica efficacemente solo su cellule feline, mentre CPV replica su cellule di cane e di gatto. In vivo, la replicazione di FPV nel gatto e di CPV-2 nel cane è particolarmente efficace nei tessuti linfoidi e nelle cellule dell'epitelio intestinale, con successiva escrezione virale con le feci. FPV è in grado di replicare anche nel cane, ma solo a livello di timo e di midollo osseo e senza escrezione virale con le feci^{27,28}. Le varianti 2a/2b, contrariamente a CPV-2, replicano anche nel gatto²⁹.

Uno studio condotto da *Parker et al.*³⁰ sull'interazione esistente tra i virus FPV e CPV ed il recettore cellulare transferrina (TfR), ha dimostrato che FPV ha la capacità di legarsi specificamente solo al TfR delle cellule feline, mentre CPV e le sue varianti possono legarsi al TfR delle cellule di cane e di gatto. Rispetto al tipo-2 originario la variante CPV-2b ha inoltre una maggiore affinità per il TfR delle cellule di cane³¹. La capacità di replicare in vivo anche nei felini ed il migliore adattamento alla replicazione nel cane, sono ritenuti i fattori responsabili del successo evolutivo delle varianti 2a/2b.

Subito dopo la comparsa della malattia, furono usati i vaccini eterologhi allestiti con FPV che tuttavia si dimostrarono poco protettivi per il cane³² e per questo furono sostituiti dai vaccini omologhi inattivati o vivi modificati (ML) allestiti con CPV-2^{33,34,35,36}. Sebbene CPV-2 non circoli più nella popolazione canina ormai da molti anni, continua ancora oggi ad essere utilizzato per l'allestimento della maggior parte dei vaccini in commercio. L'insorgenza delle nuove varianti di CPV ha sollevato numerosi dubbi circa l'efficacia dei vaccini attualmente utilizzati per la

Tabella 1

Variations aminoacidiche nella proteina capsidica VP2 tra i parvovirus del sottogruppo felino. Sono inoltre riportati stipiti CPV-2 di recente identificazione e gli stipiti vaccinali A, B e 29/97-68 sequenziati in questo studio. Lo stipite 29/97-68 è il vaccino utilizzato in questo studio

Virus	Origine, anno	Stipite	Residuo Ospite	80	87	93	101	232	265	297	300	305	323	426	555	564	568
FPV	USA, 1967	FPV-b	Gatto	Lys	-	Lys	-	Val	-	-	-	-	Asp	-	-	Asn	Ala
MEV	USA, 1975	MEV-b	Visone	Lys	-	Lys	-	Val	-	-	-	-	Asp	-	-	Asn	Ala
CPV-2	USA, 1978 USA, 1978	CPV-b CPV-Norden	Cane Cane	Arg	Met	Asn	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
Vaccino A ^b		Cornell 780916	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccino B ^b		154	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPV-2a	USA, 1984 USA, 1983	CPV-15 CPV-31	Cane Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	-	Ile	-	-
CPV-2b	USA, 1984 USA, 1990	CPV-39 CPV-133	Cane Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-
Asp-300 CPV-2 ^a	Vietnam, 2000 Vietnam, 2000	LCPV-V203 LCPV-V140	Leopardo Leopardo	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Asp	Tyr	-	Asp	-	-	-
Pro-265 CPV-2 ^a	Italia, 2000 Italia, 2000	CPV-616 W42	Cane Lupo	-	Leu	-	Thr	-	Pro	-	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-
Glu-426 CPV-2 ^a	Italia, 2000 Italia, 2000	136/00 56/00	Cane Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	Glu	-	-	-
CPV-2b Vaccino ^{b,c}	Italia, 1997	29/97-68	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-

^a Stipite CPV-2 di recente identificazione.

^b Stipite sequenziato nel presente studio.

^c Stipite vaccinale utilizzato nel presente studio.

profilassi della parvovirosi del cane^{37,38}. Secondo diversi autori l'evoluzione antigenica di CPV-2 non ha compromesso la capacità dei vaccini di conferire una buona protezione anche nei confronti delle varianti attualmente circolanti^{39,40,41}. Tuttavia il sospetto che le differenze antigeniche esistenti tra CPV-2 e le varianti 2a/b possano compromettere l'efficacia della vaccinazione, ha portato, anche in Italia, alla commercializzazione di nuovi vaccini allestiti con la variante CPV-2b.

Prove sierologiche crociate effettuate con il test di sieroneutralizzazione (SN), su sieri di due gruppi di cuccioli vaccinati rispettivamente con CPV-2 e CPV-2b, hanno evidenziato differenze significative tra i titoli anticorpali nei confronti del virus omologo ed eterologo. In particolare, i cuccioli vaccinati con lo stipo CPV-2 hanno sviluppato titoli SN verso la variante CPV-2b significativamente inferiori rispetto a quelli verso il virus omologo contenuto nel vaccino⁴².

Un altro problema legato all'immunizzazione attiva del cane nei confronti di CPV è rappresentato dalla persistenza nel cucciolo di alti livelli di anticorpi di derivazione materna (MDA) che possono interferire con la risposta attiva alla vaccinazione. Titoli IEA $\geq 1:20$ riescono ad interferire con la vaccinazione ma non proteggono dall'infezione; titoli $\geq 1:80$ sono ritenuti protettivi sia nei confronti della malattia che dell'infezione. Valori di MDA compresi tra 1:80 e 1:20 conferiscono una protezione solo parziale nei confronti della infezione, ma interferiscono con la immunizzazione.

Esiste pertanto nella vita di ogni cucciolo, un periodo critico ("gap immunologico"), che dura circa 2-5 settimane, durante il quale il cucciolo risulta recettivo all'infezione ma "refrattario" all'immunizzazione^{43,35,37}. Cuccioli vaccinati in questo periodo possono successivamente risultare pienamente suscettibili all'infezione⁴⁴.

Per aggirare l'ostacolo degli MDA all'immunizzazione attiva del cucciolo, è stato proposto di impiegare vaccini ad "alto titolo" o di effettuare la vaccinazione per via intranasale.

I vaccini CPV-2 ad alto titolo (10^7 TCID₅₀/dose) somministrati per via parenterale sono risultati in grado di indurre una buona risposta immune anche in presenza di alti livelli di MDA (titoli $\leq 1:80$)^{44,45,46}. Sorprendentemente, prove di vaccinazione intranasale con un vaccino CPV-2 "normale" ($10^{5.50}$ TCID₅₀/dose), in cuccioli con MDA, hanno dimostrato efficacia analoga o superiore. Infatti, il vaccino, pur avendo un titolo virale per dose inferiore di log₁₀ 1,50 rispetto al vaccino somministrato per via parenterale, è riuscito a superare in maniera efficace l'interferenza dell'immunità materna⁴⁷ (Tab. 2c).

Oggi il mercato offre una vasta gamma di vaccini per la profilassi della parvovirosi, ma l'attenzione dei ricercatori è principalmente focalizzata sull'efficacia dei nuovi vaccini CPV-2b. È stato dimostrato⁴⁸ che la inoculazione per via parenterale di un vaccino ML CPV-2b con titolo virale pari a $10^{4.50}$ TCID₅₀/dose, è in grado di indurre immunizzazione attiva in cuccioli con alti livelli di MDA (Tab. 2a).

Nel presente studio sono state effettuate prove di vaccinazione per via intranasale in cuccioli con MDA, utilizzando un vaccino CPV-2b con lo scopo di valutare se la somministrazione intranasale è in grado di aumentare la percentuale di risposta attiva nei cuccioli con MDA.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati utilizzati 78 cuccioli di 5-7 settimane di età, provenienti da 16 diverse cucciolate e nati da madri vaccinate con un vaccino ML CPV-2 prima dell'accoppiamento. I cuccioli sono stati raggruppati in base al titolo anticorpale valutato prima della vaccinazione.

Vaccino

È stato utilizzato un vaccino sperimentale, vivo-modificato CPV-2b (stipite 29/97)⁴⁹, attenuato mediante 68 passaggi seriali su cellule in linea continua Crandell-Rees Feline Kidney Cell line (CRFK). Il titolo infettante del vaccino per dose era pari a $10^{4.50}$ TCID₅₀/ml.

Schema sperimentale

L'esperimento è stato condotto nell'ambito dell'autorizzazione del Ministero della Salute n° 148/2005-c del 18/10/2005. Il vaccino è stato somministrato mediante instillazione nasale alla dose di 0,5 ml per narice. Tutti i cuccioli sono stati vaccinati a 5 settimane di età. Gli animali che non avevano presentato sierconversione in seguito alla prima somministrazione del vaccino, sono stati sottoposti ad una seconda vaccinazione a 7 settimane di età.

Per la ricerca degli anticorpi, campioni di sangue sono stati prelevati da tutti i cuccioli al momento della vaccinazione e a distanza di 15 giorni dalla stessa. La risposta sierologica è stata considerata positiva nei cuccioli che, 15 giorni dopo la vaccinazione, avevano evidenziato un incremento dei titoli IEA maggiore o pari a 3 diluizioni per raddoppio.

Test sierologico

I sieri sono stati titolati mediante il test di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) eseguito a +4°C, utilizzando 8 unità emoagglutinanti del virus CPV-2b e globuli rossi di suino all'1%.

I titoli IEA sono stati espressi come reciproco della più alta diluizione dei sieri in grado di inibire completamente l'emoagglutinazione.

Analisi di sequenza della proteina VP2

È stata analizzata l'intera sequenza della ORF2 dello stipo 29/97-68°p., che codifica per le proteine VP1 e VP2. Il DNA virale è stato amplificato utilizzando TaKaRa LA Taq (*Takara Shuzo, Biomedical, Japan*) ed il prodotto ottenuto è stato utilizzato per il sequenziamento diretto utilizzando primers interni disegnati per sovrapposizione mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 377 (*Perkin Elmer, Applied Biosystem, Europe*), usando la metodica *big-dye-termination* (*Perkin Elmer, Applied Biosystem, Europe*). Sono state inoltre determinate le sequenze di stipiti

Tabella 2

Valutazione della risposta anticorpale attiva, mediante test di IEA, in seguito a vaccinazione con CPV-2. Confronto tra i risultati ottenuti nel presente studio (b) e quelli riportati in letteratura (a, c, d, e, f, g). I cuccioli sono stati raggruppati in base al titolo anticorpale valutato prima della vaccinazione. I risultati riportati in tab. a, b, d, c, sono stati ottenuti nello stesso laboratorio. La diversa standardizzazione delle metodiche di laboratorio può avere in parte influenzato i risultati ottenuti dalle altre prove di vaccinazione (tab. e, f, g).

	Tabella 2a	Tabella 2b
	<i>Pratelli et al., 2000</i>	<i>Presente studio</i>
Titoli IEA	CPV-2b stipite 29/97 40° passaggio Parenterale, titolo 4.5 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati	CPV-2b stipite 29/97 68° passaggio Intranasale, titolo 4.5 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati
10	1/1 (100%)	2/2 (100%)
20	4/4 (100%)	8/8 (100%)
40	12/12 (100%)	20/20 (100%)
80	10/12 (83%)	13/13 (100%)
160	4/7 (57%)	10/15 (66.6%)
320	3/5 (60%)	6/16 (37.5%)
640	ND*	0/4 (0%)
	Tabella 2d	Tabella 2c
	<i>Buonavoglia et al., 1992</i>	<i>Buonavoglia et al., 1994</i>
Titoli IEA	CPV-2 stipite 17-80 ISS > 60° passaggio Parenterale, titolo 7.0 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati	CPV-2 stipite 17-80 ISS > 60° passaggio Intranasale, titolo 5.5 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati
10	ND*	ND*
20	ND*	ND*
40	72/78 (92.3%)	14/14 (100%)
80		8/11 (72.7%)
160	0/128 (0%)	3/17 (17.6%)
320		0/6 (0%)
640		0/11 (0%)
	Tabella 2e	
	<i>Carmichael et al., 1983</i>	
Titoli IEA	CPV2 stipite A 100-115° passaggio Parenterale, titolo 5.5 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati	
10	98%	
20	50%	
40	-	
80	0%	
	Tabella 2f	Tabella 2g
	<i>Burtonboy et al., 1991</i>	<i>Hoare et al., 1997</i>
Titoli IEA	CPV-2 stipite NL-35-D 37° passaggio Parenterale, titolo 7.0 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati	CPV-2 stipite NL-35-D 13° passaggio Parenterale, titolo 7.0 TCID ₅₀ risposta attiva/cuccioli vaccinati
<8	1/1 (100%)	28/29 (96.5%)
8	19/20 (95%)	16/17 (94.1%)
16	24/27 (89%)	45/45 (100%)
32	18/22 (82%)	31/33 (93.9%)
64	2/5 (40%)	13/13 (100%)
128	2/3 (66%)	2/3 (66%)
256	0/1 (0%)	6/6 (100%)
* ND, non determinato.		

CPV-2 utilizzati in vaccini commerciali (vaccino A e B). Per il sequenziamento, sono stati analizzati quattro distinti amplificati PCR del campione ed è stata realizzata una sequenza *consensus*.

RISULTATI

Nessun cucciolo ha evidenziato reazione locale e/o sistemica in seguito alla somministrazione del vaccino. Solo

3 cuccioli di 5 settimane di età hanno presentato lievi sintomi enterici, il terzo giorno dopo la vaccinazione. Come riportato nella tabella 2b, a 15 giorni dalla vaccinazione, hanno sierconvertito tutti i cuccioli con titoli IEA di MDA compresi tra 1:10 e 1:80, nonché il 66,6% (10 animali su 15) dei cuccioli con titoli 1:160 ed il 37,5% (6 su 16) dei cuccioli con titoli 1:320. Nessun cucciolo con titolo 1:640 ha sierconvertito dopo la vaccinazione.

L'analisi di sequenza ha evidenziato la presenza di diverse mutazioni nella ORF2 dello stipite vaccinale 29/97-68°

p. A monte della regione intronica, posta in prossimità della terminazione 5' della ORF2 è presente un codone di stop addizionale TAA. Sono inoltre presenti mutazioni nucleotidiche non silenti 569-C→T (23-Ser→Phe) nella *disordered region* della VP2 ed un poliallismo C/G a livello del nucleotide 1076, responsabile della coesistenza dei residui Ser e Cys in posizione 192. Altre mutazioni sono presenti in posizione 1556-C→T (352-Pro→Leu) e 1490-T→G (297-Ser→Ala). La mutazione 352-Leu è presente in altri stipiti CPV isolati in Italia (dato non pubblicato) mentre la mutazione 297-Ala è presente in stipiti CPV-2a/2b di recente isolamento in diverse parti del mondo. Nella tabella 1 sono riportate le principali differenze aminoacidiche nella proteina capsidica VP2, tra lo stipite vaccinale CPV-2b 29/97-68°, CPV-2 vaccinale (A e B) ed altri parvovirus del sottogruppo felino.

DISCUSSIONE

L'ostacolo principale allo sviluppo di immunità attiva post-vaccinale verso CPV-2 è rappresentato dal ruolo interferente degli MDA che possono persistere nel cucciolo fino a 12 settimane di età. Altri fattori, tuttavia, possono influenzare l'efficacia della risposta immunitaria post-vaccinale: il titolo virale per dose (TCID₅₀/ml.) del vaccino, le caratteristiche antigeniche dello stipite virale utilizzato, il grado di attenuazione (numero di passaggi seriali su cellule), ed infine la via di somministrazione.

In uno studio precedente⁴⁸, un vaccino ML CPV-2b (stipite 29/97-40°p) a basso titolo (10^{4.50} TCID₅₀/dose), somministrato per via parenterale a cuccioli con MDA, ha indotto sieroconversione attiva nel 100%, 83% e 57% dei cuccioli con titoli IEA pari, rispettivamente, a 1:10-1:40, 1:80 e 1:160, ed anche nel 60% dei cuccioli con titoli 1:320 (Tab. 2a). Una possibile spiegazione potrebbe essere rappresentata da una intrinseca maggiore immunogenicità dello stipite vaccinale utilizzato. Tuttavia non è da escludere che, in base alle differenze antigeniche esistenti tra CPV-2 e le varianti, ci sia stato solo un blocco parziale del vaccino 2b da parte degli MDA diretti verso CPV-2 utilizzato per la immunizzazione delle madri⁵⁰. È noto infatti che una delle principali strategie utilizzate da CPV per eludere le difese immunitarie dell'ospite è rappresentata dalla continua modificazione della propria struttura antigenica. In effetti l'analisi di sequenza della VP2 ha evidenziato almeno 6 differenze aminoacidiche (nei residui 87, 101, 297, 300, 305 e 426) tra il vaccino CPV-2b 29/97-68°p. e lo stipite CPV-2.

Nella parvovirosi del cane, gli studi delle interazioni virus/ospite sono sempre stati incentrati sullo stipite originale CPV-2. L'insorgenza delle nuove varianti, richiede necessariamente una rivalutazione dei parametri immunologici indicativi di protezione nei confronti dell'infezione. Risultati di recenti ricerche indicano che, nei cuccioli nati da madri vaccinate con CPV-2, il livello di MDA necessario a prevenire l'infezione sostenuta dalle varianti, deve essere superiore al valore fino ad oggi considerato protettivo (1:80)⁵¹.

I dati riportati in Tabella 2a, evidenziano la maggiore efficacia dei vaccini ML CPV-2b rispetto ai vaccini CPV-2 ad alto titolo (Tab. 2d). Inoltre, il vaccino ML CPV-2b

29/97 somministrato per via intranasale, a fronte del maggior grado di attenuazione (68 passaggi su colture cellulari) è risultato immunogeno quanto il vaccino ML CPV-2b 29/97 (40° passaggio) somministrato per via parenterale (Tab. 2 a, b). Questo dato è in apparente contrasto con precedenti esperimenti sulla vaccinazione parenterale con vaccini CPV-2 ad alto titolo, in cui era stato evidenziato che un elevato numero di passaggi in vitro dello stipite vaccinale conferisce maggiore attenuazione del potere patogeno, ma ne riduce l'immunogenicità^{45,46} (Tab. 2 f, g).

I risultati del presente studio evidenziano, inoltre, una correlazione tra efficacia del vaccino e via di somministrazione. Questo dato conferma i risultati ottenuti in precedenti prove di vaccinazione, in cui il vaccino CPV-2 somministrato per via nasale era risultato più efficace⁴⁷, pur avendo un titolo virale per dose inferiore di log 1,50 rispetto allo stesso vaccino somministrato per via parenterale (Tab. 2 d, c).

La maggiore efficacia della vaccinazione intranasale nei cuccioli con MDA è probabilmente legata alla presenza di bassi livelli di protezione mucosale specifica nel distretto oro-nasale. In queste condizioni, la replicazione del virus vaccinale verrebbe contrastata in misura inferiore e si avrebbe l'induzione di una migliore risposta immunitaria attiva. A ciò si aggiunga che il distretto oronasale è la naturale porta di ingresso di CPV e quindi la vaccinazione intranasale riproduce, in qualche misura, quanto avviene in corso di infezione naturale. In campo veterinario, la somministrazione intranasale dei vaccini è stata già impiegata per le stesse finalità (aggirare l'ostacolo degli MDA) anche in altre infezioni virali, (malattia di Aujeszky del suino) risultando efficace anche in animali con alti livelli di MDA^{52,53,54,55,56}.

In conclusione, i risultati del presente studio indicano che i vaccini ML allestiti con la variante CPV-2b e somministrati per via intranasale sono protettivi nei confronti dell'infezione da CPV e possono contribuire ad aumentare le percentuali di immunizzazione attiva anche in cuccioli con alti livelli di MDA.

La vaccinazione endonasale con CPV-2b può quindi essere particolarmente indicata nelle situazioni ad alto rischio epidemiologico (canili, allevamenti, pet-shop ecc.) quando è necessario immunizzare cuccioli molto giovani e con titoli di MDA ancora elevati.

Tuttavia, i vaccini attualmente disponibili sul mercato (CPV-2, CPV-2b), sono autorizzati solo per la somministrazione parenterale. È auspicabile pertanto che le ditte produttrici di tali vaccini, acquisiscano ulteriori dati sull'immunogenicità ed efficacia degli stessi dopo somministrazione per via endonasale e aggiungano nel foglietto illustrativo anche questa modalità di impiego.

Parole chiave

CPV-2, cane, vaccinazione intranasale.

Key words

CPV-2, dog, intranasal vaccination.

Bibliografia

- Kelly WR: An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.* 54:593, 1978.
- Appel MJG, Scott WF, Carmichael LE: Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105:156-159, 1979.
- Burtonboy G, Coignoul F, Pastoret PP, Delferriere N: Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol. Suppl.* 61:1-11, 1979.
- Johnson RH, Spradbrow PB: Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.* 55:151, 1979.
- Carmichael LE, Binn LN: New enteric diseases in the dog. *Adv Vet Sci Comp.* 25:1-37, 1981.
- Carmichael LE, Schlafler DH, Hashimoto A: Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:165-174, 1994.
- Schwartz D, Green B, Carmichael LE, Parrish CR: The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology* 302: 219-223, 2002.
- Parrish CR, Carmichael LE: Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. *Virology.* 129:401-414, 1983.
- Steinel A, Munson L, Van Vuuren M, Truyen U: Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J. Gen. Virol.* 81: 345-350, 2000.
- Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE: Natural variation of canine parvovirus. *Science.* 230:1046-48, 1985.
- Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, et al: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65:6544-52, 1991.
- Mochizuki M, Harasawa R, Nakatani H: Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38:1-10, 1993.
- De Ybanez RR, Vela C, Cortes E, Simarro I et al: Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136:174-75, 1995.
- Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H: Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme-analysis. *Vet. Rec.* 138:495-96, 1996.
- Truyen U, Platzer G, Parrish CR: Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.* 138: 365-66, 1996b.
- Truyen U, Steinel A, Bruckner L, Lutz H et al: Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142: 115-19, 2000.
- Steinel A, Venter EH, Van Vuuren M, Parrish CR et al: Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65: 239-242, 1998.
- Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U: Parvovirus infections in wild carnivores. *J. Wildl. Dis.* 37:594-607, 2001.
- Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, Cirone F et al: Antigenic characterisation of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73: 197-200, 1998.
- Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, Martella V et al: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Microbiologica.* 23: 93-96, 2000.
- Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M et al: Molecular characterisation of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75:127-33, 2000.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M et al: Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82: 3021-3025, 2001.
- Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K 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.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G et al: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1333-36, 2004.
- Cavalli A, Martella V, Decaro N, Elia G et al: La variante glu-426 del parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) è diffusa in Italia. *Veterinaria* 19:29-33, 2005
- Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T et al.: A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149: 2261-2269, 2004.
- Truyen U, Parrish CR: Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 66:5399-5408, 1992.
- Pollock RV, Carmichael LE: Use of modified live feline panleukopenia virus vaccine to immunize dogs against canine parvovirus. *Am. J. vet. Res.* 44:169-75, 1983.
- Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR: Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215:186-89, 1996a.
- Parker JSL, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ et al: Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter and infect cells. *J. Virol.* 75:3896-3902, 2001.
- Hueffer K, Parker JSL, Weichert W, Geisel RE et al: The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77:1718-26, 2003.
- Murray RW: A comparative study of the effectiveness of four combined vaccines for dogs. *Austr. Vet. Practit.* 15:151-55, 1985.
- Carmichael LE, Pollock RVH, Joubert JC: Response of puppies to canine origin parvovirus vaccines. *Mod. vet. Pract.* 65:99-102, 1984.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH: A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response. *Cornell Vet.* 71:408-427, 1983a.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH: A modified live canine parvovirus vaccine. II Immune response. *Cornell Vet.* 73:13-29, 1983b.
- Buonavoglia C, Compagnucci M, Orfei Z: Dog response to plaque variant of canine parvovirus. *J. Vet. Med. B.* 30:526-31, 1983.
- Buonavoglia C: Parvovirosi del cane. *Manuale di malattie infettive del cane e del gatto. Stato dell'arte delle malattie infettive del cane e del gatto Capitolo 3:66-71.* Edizioni SCIVAC –Cremona 2005.
- Truyen U: Evolution of canine parvovirus – a need for new vaccines?. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.003 in press.
- Carmichael LE: Canine parvovirus type-2 an evolving pathogen of dogs. *Annales de Médecine Vétérinaire.* 138:459-464, 1994.
- Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H: Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 136:63-67, 1995.
- Yule TD, Roth MB, Dreier K, Johnson AF et al: Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine.* 15:720-29, 1997.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M et al: Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 8:612-15, 2001.
- Pollock RVH, Carmichael LE: Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180:37-42, 1982.
- Buonavoglia C, Tollis E, Buonavoglia D, Puccini A: Response of pups with maternally derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15:281-83, 1992.
- Burtonboy S, Charlier P, Hertoghs J, Lobmann M et al: Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody. *Vet. Rec.* 128:377-81, 1991.
- Hoare CM, DeBouck P, Wiesman A: Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Vaccine* 15:273-75, 1997.
- Buonavoglia C, Cavalli A, Gravino E, Voigt V et al: Intranasal vaccination of pups with maternally derived antibodies with a modified live canine parvovirus. *J. Vet. Med. B.* 41:3-8, 1994.
- Pratelli A, Cavalli A, Normanno G, De Palma MG et al: Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b). *J. Vet. Med. B* 47:273-76, 2000.
- Buonavoglia C, Pratelli A, Tempesta M, Martella V et al: Valutazione delle caratteristiche di innocuità e immunogenicità di una variante 2b di parvovirus del cane (CPV 2b). *Veterinaria.* 12: 55-58, 1998.
- Martella V, Cavalli A, Decaro N, Elia G et al: Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(10):1243-5, 2005.
- Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, et al: Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33: 261-267, 2005.
- De Leeuw PW, Wijsmuller JM, Zantinga JW, Tielen MJ: Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. Comparison of intranasal and parenteral vaccination with an attenuated vaccine in 12-week-old pigs from immunized dams. *Vet. Q.* 4:49-56, 1982.
- Pensaert M, Maes L: Parenteral and intranasal vaccination of fattening pigs against Aujeszky's disease (pseudorabies). *J. Vet. Med. B.* 31(9):682-9, 1984.
- De Leeuw PW, Van Oirschot JT: Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titres. *Res. Vet. Sci.* 39:34-8, 1985.
- Van Oirschot JT, De Leeuw PW: Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titres. *Vet. Microbiol.* 10:401-8, 1985.
- Van Oirschot JT: Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: protective immunity at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination in pigs with maternal antibodies. *Vet. Microbiol.* 27:103-13, 1991.