

GASTROENTERITE IN CUCCIOLI DOPO LA VACCINAZIONE PER LA PARVOVIROSI DEL CANE: UN DILEMMA DIAGNOSTICO

THE DIAGNOSTIC DILEMMA RELATED TO THE ONSET OF GASTROENTERITIS IN PUPS AFTER CANINE PARVOVIRUS VACCINATION

NICOLA DECARO¹, GABRIELLA ELIA¹, COSTANTINA DESARIO¹, MARCO CAMPOLO¹, MARIA LOREDANA COLAIANNI², ALESSANDRA CAVALLI¹, VIVIANA MARI¹, VITO MARTELLA¹, CANIO BUONAVOGLIA¹

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

² Veterinario libero professionista, Bari

Riassunto

L'insorgenza di gastroenterite nei cuccioli nei giorni immediatamente successivi la vaccinazione per il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) è di frequente riscontro nella pratica clinica veterinaria. In simili situazioni si potrebbe ipotizzare l'esistenza di un nesso causale diretto tra somministrazione del vaccino e sviluppo della sintomatologia, sospettando una reversione di patogenicità dello stipite CPV-2 contenuto nel vaccino. Al fine di determinare le cause che portano all'insorgenza di gastroenterite subito dopo la vaccinazione per CPV-2, sono stati analizzati 29 campioni di feci prelevati da cani con gastroenterite post-vaccinazione nel periodo 2004-2006. Mediante l'impiego di nuovi test molecolari che utilizzano la tecnologia delle sonde *minor groove binder* per la discriminazione tra stipiti CPV-2 vaccinali e di campo, è stato possibile identificare stipiti di campo in ben 18 campioni, in 3 dei quali è stata evidenziata la simultanea presenza dello stipite vaccinale somministrato. Ulteriori 8 campioni sono risultati positivi per altri patogeni del cane a tropismo enterico, mentre nei restanti 3 campioni è stato evidenziato il solo virus vaccinale in assenza di stipiti CPV-2 di campo o altri patogeni. Il presente studio dimostra che l'insorgenza di gastroenterite dopo la vaccinazione per CPV-2 è correlata ad infezione da parte di stipiti CPV-2 di campo o altri agenti patogeni piuttosto che a reversione di patogenicità del virus contenuto nei vaccini per la profilassi della parvovirosi.

Summary

The occurrence of gastroenteritis in pups in the first week after canine parvovirus (CPV) vaccination is a frequent finding in the practice, so that a direct association of the onset of clinical signs to the vaccine administration could be hypothesised due to the postulated reversion to virulence of the vaccine strain. In order to investigate the causes responsible for the occurrence of severe enteric symptoms shortly after CPV vaccination, 29 faecal samples collected in years 2004-2006 from dogs displaying post-vaccination gastroenteritis were analysed. The novel molecular tools based on minor groove binder probe technology for discrimination between vaccine and field strains of CPV-2 detected field strains in 18 specimens, with 3 samples showing the co-presence of the vaccine strain administered. Additional 8 samples tested positive for other canine pathogens of the alimentary tract, whereas the remaining 3 samples were found to contain the vaccine strain without evidence of CPV-2 field strains or other pathogens. The present study shows that the occurrence of gastroenteritis shortly after CPV vaccination is mostly caused by field strains of CPV-2 or other pathogens of dogs rather than by a reversion to virulence of the virus contained in CPV vaccines.

INTRODUZIONE

Il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) è responsabile di gastroenterite emorragica in cuccioli di 2-6 mesi di età⁶. CPV-2, identificato per la prima volta alla fine degli anni '70, è stato successivamente rimpiazzato da due varianti antigeniche, CPV-2a e CPV-2b, che sono variamente distribuite

nella popolazione canina mondiale^{5,9,11,13,14,19,23,30,32,33, 36,38,40-42}. Più recentemente, in Italia è stata identificata una terza variante antigenica, CPV-2c⁴, successivamente segnalata anche in altri Paesi, tra cui Vietnam³⁴, Spagna¹⁵, Germania e Regno Unito (N. Decaro, dati non pubblicati). In Italia, questa nuova variante sta rapidamente sostituendo CPV-2b^{8,11,13,14,19,20,30,32}. Il CPV-2 originale da diversi anni non è più circolante nella popolazione canina; viene tuttavia ancora utilizzato per la preparazione dei vaccini. Le varianti CPV-2 differiscono tra di loro per la presenza di sostituzioni aminoacidiche a livello del residuo 426 della proteina capsidi-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione l'11/9/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 14/12/2006”.

dica VP2, dove è possibile osservare la sostituzione Asn → Asp tra CPV-2a e CPV-2b³⁵ e la sostituzione Asp → Glu tra CPV-2b e CPV-2c⁴. Occorre ricordare che a questo livello il tipo originale CPV-2 possiede un residuo Asn esattamente come la variante 2a (Tab. 1). Tale residuo è localizzato in uno dei siti antigenici maggiori (epitopo A), considerato importante dal punto di vista immunologico. È stata infatti dimostrata una cross-reattività unidirezionale tra le varianti antigeniche e il tipo originale CPV-2³⁷, che renderebbe i cuccioli con immunità colostrale nei confronti di una variante (o, più probabilmente, nei confronti di vaccini allestiti con CPV-2) più sensibili ad infezioni sostenute da un'altra variante di CPV-2⁴³. Poiché le differenze antigeniche tra il tipo originale CPV-2 e le varianti potrebbero diminuire l'efficacia protettiva dei vaccini allestiti con CPV-2^{24,37,44}, alcune case farmaceutiche hanno iniziato a commercializzare vaccini contenenti la variante CPV-2b.

La caratterizzazione delle varianti di CPV-2 ha rappresentato un serio problema diagnostico per i laboratori di virologia fino alla messa a punto di test biomolecolari di real-time PCR con sonde *minor groove binder* (MGB), mediante i quali è attualmente possibile ottenere una tipizzazione rapida e precisa^{11,13}. Le sonde MGB rappresentano una evoluzione delle tradizionali sonde TaqMan, in quanto sono oligonucleotidi coniugati con gruppi chimici che hanno la capacità di legarsi al solco minore (*minor groove*) del DNA bicatenario formato dal complesso sonda-DNA target, aumentandone in misura considerevole la stabilità termodinamica¹. La presenza di tali molecole permette una riduzione sostanziale della lunghezza della sonda cui l'MGB è legato, con conseguente incremento della specificità²⁷. L'utilizzo di sonde molto corte permette, infatti, di rilevare con efficacia le variazioni di un singolo nucleotide o *single nucleotide*

polymorphisms (SNP), per cui le sonde MGB sono state utilizzate con successo nella discriminazione allelica e, successivamente, nella genotipizzazione dei virus. Poiché le varianti di CPV-2 differiscono tra di esse per la presenza di SNP a livello del gene della proteina capsidica, sono stati allestiti due test MGB, uno per la discriminazione tra CPV-2a e CPV-2b (test 2a/2b) e l'altro per la discriminazione tra CPV-2b e CPV-2c (test 2b/2c)^{11,13}. L'impiego estensivo di tali metodiche ha permesso di ridurre notevolmente i tempi necessari per la caratterizzazione degli stipti CPV-2 di campo²⁰. Poiché i test 2a/2b e 2b/2c non sono in grado di differenziare gli stipti vaccinali dagli stipti di campo, sono state messe a punto ulteriori metodiche per risolvere questo problema. Uno di questi test (CPV-2/varianti) è in grado di differenziare gli stipti di campo dal tipo originale CPV-2 (vaccino), che viene riconosciuto erroneamente come CPV-2a dal test 2a/2b¹², mentre altri due test (SAH/field e 39/field) sono stati allestiti per discriminare gli stipti di campo CPV-2b da quelli vaccinali della stessa variante¹⁶. Questi test potrebbero essere di valido aiuto nella pratica clinica, allorché, come frequentemente osservato, si abbia l'insorgenza di gastroenterite in cuccioli a distanza di 1-7 giorni dalla somministrazione del vaccino contro la parvovirosi (C. Buonavoglia, osservazioni personali). Poiché anche il virus vaccinale viene eliminato con le feci per 2-8 giorni dopo la vaccinazione, i test diagnostici tradizionali possono evidenziare uno stipte CPV-2 nelle feci dei cani con sintomatologia gastroenterica, ma non sono in grado di determinarne il tipo (vaccinale o di campo). Nel presente studio si riportano i risultati della caratterizzazione di stipti CPV-2 identificati nelle feci di cuccioli che avevano manifestato sintomatologia gastroenterica nei giorni immediatamente successivi alla somministrazione del vaccino della parvovirosi.

Tabella 1
Differenze aminoacidiche a livello della proteina capsidica VP2 tra varianti e stipti CPV-2

Variazioni aminoacidiche a livello di residuo ^a										
... Posizione nucleotidica ... Codone osservato	87 3045-3047 ATG (Met) TTG (Leu)	101 3087-3089 ATT (Ile) ^b ACT (Thr) ^b	297 3675-3677 TCT (Ser) ^c GCT (Ala) ^c	300 3684-3686 GCT (Ala) GGT (Gly)	305 3699-3701 GAT (Asp) TAT (Tyr)	321 3747-3749 AAT (Asn) ^d AAA (Lys) ^d	375 3909-3911 AAT (Asn) GAT (Asp)	426 4062-4064 AAT (Asn) ^e GAT (Asp) ^e GAA (Glu) ^e	555 4449-4451 GTA (Val) ATA (Ile)	570 4494-4496 AAA (Lys) GAA (Glu)
CPV-2	Met	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Asn	Val	Lys
Vecchi CPV-2a	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Lys
Vecchi CPV-2b (stipte CPV-39)	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys
Nuovi CPV-2a	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Lys
Nuovi CPV-2b (stipti di campo)	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Lys
Asp-300 (CPV-2a/CPV-2b)	Leu	Thr	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn/Asp	Val	Lys
CPV-2c	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Lys
CPV-2b stipte SAH	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Lys	Asp	Asp	Val	Glu

^a La posizione è riferita alle sequenze aminoacidiche e nucleotidiche dello stipte CPV-2 CPV-b (numero di accesso M38245).

^b Codone interessato dal SNP utilizzato nel test MGB CPV-2/varianti¹².

^c Codone interessato dal SNP utilizzato nel test MGB 39/field¹⁶.

^d Codone interessato dal SNP utilizzato nel test MGB SAH/field¹⁶.

^e Codone interessato dai SNP utilizzati nei test MGB 2a/2b e 2b/2c¹³.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 29 campioni di feci prelevati, nel periodo 2004-2006, da cuccioli che avevano manifestato segni clinici sovrapponibili a quelli tipici della parvovirosi del cane (vomito, diarrea) nella prima settimana dopo la vaccinazione per CPV-2 (Tab. 2). I soggetti erano stati vaccinati con formulazioni monovalenti o polivalenti contenenti il tipo originale CPV-2 ($n = 22$) o la variante 2b ($n = 4$). Per 3 campioni non è stato possibile conoscere il vaccino somministrato: in un caso il campione di feci era stato inviato da un altro laboratorio diagnostico che non ha fornito tale informazione e negli altri due casi la vaccinazione era stata effettuata da un veterinario diverso da quello che aveva eseguito il campionamento. Sei dei 29 soggetti erano stati importati da Paesi dell'Est europeo, anche se l'intervento vaccinale che aveva preceduto l'insorgenza della sintomatologia era stato effettuato in Italia. In alcuni casi erano in atto controversie legali tra proprietari di cani e veterinari in quanto l'insorgenza della gastroenterite veniva associata alla somministrazione del vaccino.

Estrazione degli acidi nucleici

I campioni di feci sono stati omogeneizzati in tampone fosfato (PBS, pH 7,2) e chiarificati mediante centrifugazione a 1500 x g per 15 min. Il surnatante è stato utilizzato per l'estrazione del DNA di CPV-2 mediante semplice bollitura per 10 min e successivo raffreddamento in ghiaccio, come precedentemente descritto^{14,19,20}. L'estrazione degli acidi nucleici per la ricerca degli altri agenti virali del cane è stata effettuata dal surnatante degli omogenati fecali mediante l'utilizzo di kit commerciali, quali DNeasy Tissue Kit (QIAGEN S.p.A., Milan, Italy) per la purificazione del DNA e QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen S.p.A.) per la purificazione dell'RNA. La procedura utilizzata è stata quella consigliata dalla casa produttrice.

Identificazione di CPV-2 mediante real-time PCR con sonda TaqMan

La ricerca dell'acido nucleico di CPV-2 negli estratti fecali è stata effettuata mediante test real-time PCR con sonda Taq-

Tabella 2
Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati nei test real-time PCR del presente studio

Test	Primer/sonda	Sequenza (5' - 3')	Polarità	Specificità	Posizione	Ampiezza amplificato
Test TaqMan ^a	CPV-For CPV-Rev CPV-Pb	AAACAGGAATTAACATACTAATATATTTA AAATTTGACCAATTTGGATAAACT FAM - TGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACC - TAMRA	+ - +	Tutte le varianti	4104-4135 ^e 4176-4198 ^e 4143-4172 ^e	93 bp
Test MGB 2a/2b ^b	CPVa/b-For CPVa/b-Rev CPVa-Pb CPVb1-Pb	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA CCAATTGGATCTGTGGTAGCAATACA VIC - CTTCTGTAAACAAATGATA - MGB FAM - CTTCTGTAAACAGATGATA - MGB	+ - + +	Tutte le varianti CPV-2a CPV-2b	1719-1744 ^{f,g} 1785-1811 ^{f,g} 1765-1783 ^f 1765-1783 ^g	93 bp
Test MGB 2b/2c ^b	CPVb/c-For CPVb/c-Rev CPVb2-Pb CPVc-Pb	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA ATGCAGTTAAAGGACCATAAGTATTAATATATAGTATAGTTAATTC FAM - CCTGTAACAGATGATAAT - MGB VIC - CCTGTAACAGAAGATAAT - MGB	+ - + +	Tutte le varianti CPV-2b CPV-2c	1721-1748 ^g 1155-1182 ^h 1823-1870 ^g 1257-1304 ^h 1768-1785 ^g 1202-1219 ^h	150 bp
Test MGB CPV-2/varianti ^c	CPV2/v-For CPV2/v-Rev CPV2-Pb CPVv-Pb	GCAGTTAACGGAAACATGGCTTATG TCAACCAATGACCAAGGTGTACAA FAM - TGTGCATGAATATCAT - MGB VIC - TTTGTGCATGAGTATCAT - MGB	+ - + +	Tutte le varianti CPV-2 (tipo originario) Stipiti di campo	3057-3081 ^e 772-796 ^f 3100-3124 ^e 815-839 ^f 3082-3097 ^e 797-814 ^f	68 bp
Test MGB SAH/field ^d	SAH/f-For SAH/f-Rev SAH-Pb CPVf1-Pb	CAACAAGATAAAAAGACGTGGTGAATC CAACCTCAGCTGCTCATAATAGT VIC-AAATGGGAAAAACAACT-MGB FAM-AAATGGGAAAAACAACT-MGB	+ - + +	Tutte le varianti Stipite SAH Stipiti di campo	3711-3738 ^e 1426-1453 ^g 3771-3795 ^e 1486-1510 ^g 1454-1471 ^e 1454-1471 ^g	85 bp
Test MGB 39/field ^d	CPV39/f-For CPV39/f-Rev CPV39-Pb CPVf2-Pb	GCATTGGGCTTACCACCATTCTTAA CCACGTCTTTTATCTGTTGAACCTCTATA VIC-CTTTGCCTCAATCTGAA-MGB FAM- TTTGCCTCAAGCTGAA-MGB	+ - + +	Tutte le varianti Stipite CPV-39 Stipiti di campo	3636-3660 ^g 1351-1375 ^g 3701-3730 ^g 1416-1445 ^g 1379-1395 ^g 1380-1395 ^g	95 bp

^a [14].

^b [13].

^c [12].

^d [16].

^{e,g,h} La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza di ^e CPV-2 (tipo originario) stipite CPV-b (numero di accesso M38245), ^f CPV-2a stipite CPV-15 (M24003), ^g CPV-2b stipite CPV-39 (M74849), ^h CPV-2c stipite 56/00 (AY380577).

Man in grado di identificare tutti gli stipti CPV-2 (tipo originale e varianti antigeniche)¹⁴. La mix per la real-time PCR (25 µl) era costituita da 10 µl di DNA (standard o templat), 12,5 µl di *IQ™ Supermix* (Bio-Rad Laboratories Srl, Milano), 600 nM di ciascun primer, 200 nM di sonda (Tab. 3). Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato il seguente file termico: attivazione della *iTaq DNA* polimerasi a 95°C per 10 min, seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 sec, *annealing* a 52°C per 30 sec ed estensione a 60°C per 1 min.

Caratterizzazione di CPV-2 mediante real-time PCR con sonde MGB

I campioni risultati positivi al test TaqMan sono stati caratterizzati mediante real-time PCR con sonde MGB¹³. Entrambi i test (2a/2b e 2b/2c) sono stati effettuati in un volume di 25 µl costituiti da 10 µl di DNA standard o di DNA estratto da feci, 12,5 µl di *IQ™ Supermix* (Bio-Rad Laboratories Srl), 900 nM di ciascun primer e 200 nM di ciascuna sonda CPVa-Pb e CPVb1-Pb (test 2a/2b) o CPVb2-Pb e CPVc-Pb (test 2b/2c) (Tab. 3). Il protocollo termico utilizzato per entrambi i test MGB è stato il seguente: attivazione della *iTaq DNA* polimerasi a 95°C per 10 min e 45 cicli di denaturazione a 95°C per 30 sec ed un'unica fase di *annealing* ed estensione a 60°C per 1 min.

Discriminazione tra stipti CPV-2 vaccinali e di campo mediante real-time PCR con sonde MGB

I campioni caratterizzati come CPV-2/2a mediante il test 2a/2b sono stati sottoposti al test MGB CPV-2/varianti per differenziare gli stipti vaccinali CPV-2 dagli stipti di campo CPV-2a¹². I campioni positivi per CPV-2b mediante i test 2a/2b e 2b/2c sono stati ulteriormente analizzati con altri due test MGB¹⁶: a) il test SAH/field discrimina gli stipti CPV-2b di campo dallo stipte vaccinale SAH contenuto nei vaccini Duramune® DAPPI+LC (Fort Dodge Animal Health, Wyeth, Inc. Overland Park, KS) e Procyon® Dog DA2PPI/CvL* (Schering-Plough Animal Health, Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK); b) il test 39/field, invece, discrimina gli stipti CPV-2b di campo dallo stipte vaccinale CPV-39 contenuto nel vaccino Virbagen® Puppy 2b* (Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Germany). Le reazioni di amplificazione sono state ottenute utilizzando gli stessi protocolli descritti per la caratterizzazione di CPV-2 e gli oligonucleotidi riportati nella Tabella 3.

Ricerca di altri patogeni responsabili di gastroenterite nel cane

La ricerca di altri agenti virali negli estratti fecali è stata effettuata con metodiche di (RT)-PCR convenzionale o real-time (RT)-PCR con sonde TaqMan. In particolare, sono stati effettuati test molecolari per la ricerca di reovirus^{10,28}, rotavirus²², calicivirus^{26,29}, adenovirus del cane²⁵, virus del cimurro²¹, herpesvirus del cane³⁹, coronavirus del cane^{17,18}. Sui campioni risultati positivi solo per gli stipti vaccinali sono stati effettuati anche esami batteriologici e parassitologici.

* Attualmente questi vaccini sono commercializzati in Italia con le seguenti denominazioni: Quantum Dog DA2PPI/CvL (Schering-Plough Animal Health) e Canigen Puppy 2b (Virbac s.r.l.).

RISULTATI

Il test real-time PCR con sonda TaqMan ha evidenziato la presenza dell'acido nucleico di CPV-2 in tutti i campioni esaminati (Tab. 2). La caratterizzazione effettuata mediante test con sonde MGB ha fornito i seguenti risultati: 23 dei 29 campioni sono risultati positivi per CPV-2/2a, 3 per CPV-2b e 3 per CPV-2c.

Il test CPV-2/varianti ha evidenziato che, dei 23 campioni positivi per CPV-2/2a, 12 contenevano esclusivamente stipti di campo CPV-2a, 8 contenevano esclusivamente stipti vaccinali CPV-2 (in accordo con il tipo di vaccino somministrato, quando noto), mentre in 3 campioni (n. 3, 14, 29) sono stati identificati entrambi gli stipti (vaccinale e di campo). I test SAH/field e 39/field hanno caratterizzato i 3 campioni positivi per CPV-2b (n. 4, 19, 20) come stipti vaccinali SAH. In effetti i 3 cani erano stati vaccinati con Duramune DAPPI+LC (Fort Dodge Animal Health) contenente tale stipte. In questi soggetti non sono stati evidenziati stipti CPV-2b di campo.

In 8 degli 11 campioni risultati positivi esclusivamente per stipti vaccinali (8 positivi per CPV-2 e 3 positivi per CPV-2b SAH) sono stati identificati altri patogeni enterici del cane, ovvero coronavirus del cane tipo I, tipo II o *Iso-spore canis*, mentre solo in 3 campioni (1 positivo per CPV-2 [n. 22] e 2 positivi per CPV-2b SAH [n. 19, 20]) il virus vaccinale non era associato ad altri agenti patogeni di natura virale, batterica o parassitaria. In 2 campioni positivi per CPV-2a (n. 10, 15) è stata accertata una co-infezione sostenuta da reovirus, sebbene la positività sia stata ottenuta solo in nested-PCR, condizione che non ha consentito di caratterizzare gli stipti identificati utilizzando RT-PCR tipo-specifiche¹⁰. Nel campione n. 15 è stato evidenziato anche l'RNA del virus del cimurro mediante real-time RT-PCR²¹. Poiché non era noto il tipo di vaccino somministrato (monovalente o polivalente), è stato amplificato e sequenziato un frammento del gene dell'emagglutinina per escludere l'origine vaccinale di quest'ultimo virus. La successiva analisi di sequenza ha dimostrato che si trattava di uno stipte di campo di virus del cimurro appartenente al *cluster* europeo, secondo quanto descritto da Martella et al.³¹.

DISCUSSIONE

L'insorgenza di gastroenterite, talvolta emorragica, nei giorni immediatamente successivi alla vaccinazione per la parvovirosi del cane è una evenienza abbastanza ricorrente nella pratica clinica, che pone un serio problema diagnostico: la sintomatologia gastroenterica è associata ad una scarsa innocuità del ceppo vaccinale (reversione di patogenicità) oppure il cucciolo, al momento della vaccinazione, aveva in incubazione uno stipte CPV-2 di campo o altri patogeni del cane? I test tradizionali per la diagnosi della parvovirosi, incluso il test immunocromatografico (ICT) utilizzato nella maggior parte degli ambulatori veterinari, possono mettere in evidenza la presenza di uno stipte CPV-2 nelle feci dei cuccioli vaccinati, ma non sono in grado di stabilire l'origine di tale virus (vaccinale o di campo). Lo stipte vaccinale, essendo un virus vivo attenuato, replica nell'organismo del soggetto vaccinato ed è eliminato con le feci, anche se a titoli più bassi e per un periodo più limi-

Tabella 3
Risultati dei test diagnostici effettuati sui campioni fecali di cuccioli con gastroenterite insorta dopo la vaccinazione per CPV-2

Campione	N. Prot.	Origine	Vaccino	Casa farmaceutica	G.p.v.	CPV-2	Altri patogeni
1	120/04	Ungheria	Vanguard 7 ^a	Pfizer	3	2a	Nessuno
2	306/04	Puglia	Vanguard 7 ^a	Pfizer	2	2a	Nessuno
3	326/04	Puglia	Non noto	/	4	2, 2a	Nessuno
4	11/05	Puglia	Duramune DAPPI+LC ^b	Fort Dodge	3	2b SAH	CCoV I, II
5	49/05-C	Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	5	2a	Nessuno
6	112/05	Lazio	Tetradog - CHPL ^a	Merial	7	2c	Nessuno
7	121/05-A	Polonia	Duramune DA2LP+Pv ^a	Fort Dodge	2	2a	CCoV I, II
8	121/05-B	Polonia	Duramune DA2LP+Pv ^a	Fort Dodge	2	2a	CCoV I, II
9	121/05-C	Polonia	Duramune DA2LP+Pv ^a	Fort Dodge	2	2a	CCoV I, II
10	128/05	Ungheria	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	2	2a	MRV
11	159/05-C	Emilia Romagna	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	7	2a	Nessuno
12	160/05	Puglia	Canigen CEPPi/L ^a	Virbac	4	2	CCoV I, II
13	176/05-A	Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	4	2	CCoV I
14	202/05	Lombardia	Primodog ^a	Merial	3	2, 2a	Nessuno
15	206/05	Puglia	Non noto	/	3	2a	CDV, MRV
16	220/05	Veneto	Nobivac CEPPi ^a	Intervet	3	2	CCoV I, II
17	280/05	Puglia	Duramune DAPPI+LC ^b	Fort Dodge	3	2a	CCoV II
18	327/05	Campania	Vanguard 7 ^a	Pfizer	2	2c	Nessuno
19	338/05-2	Lombardia	Duramune DAPPI+LC ^b	Fort Dodge	6	2b SAH	Nessuno
20	338/05-4	Lombardia	Duramune DAPPI+LC ^b	Fort Dodge	7	2b SAH	Nessuno
21	343/05-1	Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	4	2a	Nessuno
22	343/05-8	Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	7	2	Nessuno
23	343/05-9	Piemonte	Nobivac PARVO-c ^a	Intervet	4	2a	Nessuno
24	97/06-3	Regno Unito	Non noto	/	Non noto	2	CCoV I
25	174/06	Ungheria	Nobivac [®] PUPPY CP ^a	Intervet	6	2	CCoV II
26	254/06-11	Puglia	Primodog ^a	Merial	7	2	<i>Isospora canis</i>
27	254/06-12	Puglia	Primodog ^a	Merial	7	2	<i>Isospora canis</i>
28	269/06	Puglia	Tetradog - CHPL ^a	Merial	3	2c	CCoV II
29	291/06	Piemonte	Nobivac PUPPY CP ^a	Intervet	3	2, 2a	Nessuno

^a Vaccini contenenti il tipo originale CPV-2.

^b Vaccini contenenti la variante CPV-2b.

G.p.v., giorno post-vaccinazione in cui è stata osservata l'insorgenza della sintomatologia enterica; CCoV, coronavirus del cane; CDV, virus del cimurro; MRV, reovirus.

tato rispetto agli stipiti patogeni¹³. Se il cucciolo al momento della vaccinazione è già infetto da uno stipite di campo CPV-2, o si infetta immediatamente dopo, nelle feci ci potrà essere la contemporanea presenza dello stipite vaccinale e di quello di campo. In questi casi le tecniche diagnostiche tradizionali possono offrire esclusivamente il risultato di positività per CPV-2. L'inoculazione del campione di feci su colture cellulari può portare all'isolamento del virus presente a più alto titolo (lo stipite di campo) oppure di quello maggiormente adattato alle colture (lo stipite vaccinale). Allo stesso modo, la PCR convenzionale può amplificare selettivamente, o con maggiore efficienza, uno solo dei due virus, per cui anche il successivo sequenziamento del prodotto amplificato potrebbe erroneamente confermare la presenza del virus il cui acido nucleico è stato amplificato

più efficientemente. Al contrario, nel caso in cui la gastroenterite post-vaccinazione sia causata da altri patogeni del cane diversi da CPV-2, la identificazione di uno stipite CPV-2 nelle feci potrebbe far emettere una clamorosa falsa diagnosi, impedendo, probabilmente, di individuare la effettiva causa di gastroenterite. Considerate tutte queste limitazioni delle tecniche tradizionali, i test con sonde MGB recentemente messi a punto rappresentano uno strumento diagnostico rapido ed efficace per differenziare gli stipiti CPV-2 vaccinali da quelli di campo, anche nei casi in cui i due virus sono presenti nello stesso campione e lo stipite vaccinale ha un titolo molto basso^{12,16}.

La reversione di patogenicità degli stipiti vaccinali di CPV-2 è stata spesso ipotizzata ma mai dimostrata dal punto di vista scientifico. Al contrario, numerosi studi hanno con-

fermato che l'attenuazione del potere patogeno di CPV-2 vaccinale è altamente stabile^{2,3,7}. I risultati del presente studio dimostrano che la maggior parte dei casi di gastroenterite post-vaccinale è correlata ad infezione con stipiti CPV-2 di campo. Nei casi in cui i test MGB hanno identificato lo stipite vaccinale nelle feci dei soggetti con diarrea post-vaccinale, è stata accertata quasi sempre la contemporanea presenza di stipiti CPV-2 di campo o di altri patogeni del cane, responsabili della gastroenterite. In soli 3 soggetti il virus vaccinale non era associato a stipiti CPV-2 di campo o ad altri patogeni, ma anche in questi casi più che ipotizzare una rivirulentazione del virus vaccinale, sono state prese in considerazione altre cause infettive meno comuni (non ricercate nel presente studio) oppure cause non infettive (alimentari, ecc.), tenendo presente che la sintomatologia gastroenterica non era associata ad altri sintomi tipici della parvovirosi (leucopenia) né ad elevati titoli di virus nelle feci.

In conclusione si può affermare che i test diagnostici con sonde MGB, oltre che essere di valido ed indispensabile supporto all'attività clinica ambulatoriale, possono risultare estremamente utili per dirimere quei casi in cui, a fronte di una forma gastroenterica insorta immediatamente dopo la vaccinazione nei confronti della parvovirosi, vi siano controversie tra i proprietari dei cani ed i veterinari.

Parole chiave

Cane, parvovirus, gastroenterite post-vaccinazione, sonde MGB.

Key words

Dog, parvovirus, post-vaccination gastroenteritis, MGB probe assays.

Bibliografia

- Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, et al.: Efficient priming of PCR with short oligonucleotide conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25: 2657-2660, 1997.
- Bass EP, Gill MA, Beckenhauer WH: Development of a modified live, canine origin parvovirus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 909-13, 1982.
- Buonavoglia C, Compagnucci M, Orfei Z: Dog response to plaque variant of canine parvovirus. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 30: 526-531, 1983.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al.: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82: 1555-1560, 2001.
- Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, et al.: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23: 93-96, 2000.
- Carmichael LE, Binn LN: New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25: 1-37, 1981.
- Carmichael LE: Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann. Vet. Med.* 135: 459-464, 1994.
- Cavalli A, Martella V, Decaro N, et al.: La variante Glu-426 del parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) è diffusa in Italia. *Veterinaria, Anno 19, n. 1:* 29-33, 2005.
- De Ybanez RR, Vela C, Cortes E, et al.: Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136: 174-175, 1995.
- Decaro N, Campolo M, Desario C, et al.: Virological and molecular characterization of a Mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet. Microbiol.* 109: 19-27, 2005.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, et al.: New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52: 316-319, 2005.
- Decaro N, Elia G, Desario C, et al.: A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 136: 65-70, 2006.
- Decaro N, Elia G, Martella V, et al.: Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods* 133: 92-99, 2006.
- Decaro N, Elia G, Martella V, et al.: A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105: 19-28, 2005.
- Decaro N, Martella V, Desario C, et al.: First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53: 468-472, 2006.
- Decaro N, Martella V, Elia G, et al.: Diagnostic tools based on minor groove binder technology for rapid identification of vaccine and field strains of canine parvovirus type 2b. *J. Virol. Methods* 138: 10-16, 2006.
- Decaro N, Martella V, Ricci D, et al.: Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *J. Virol. Methods* 130: 72-78, 2005.
- Decaro N, Pratelli A, Campolo M, et al.: Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J. Virol. Methods* 119: 145-150, 2004.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, et al.: Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* 121: 179-185, 2005.
- Desario C, Campolo M, Cavalli A, et al.: La diagnosi di infezione da parvovirus del cane tra storia e attualità. *Veterinaria, Anno 20, n. 1:* 55-61, 2006.
- Elia G, Decaro N, Martella V, et al.: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 136: 171-176, 2006.
- Gouvea V, Santos N, Timenetsky M. do C: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1338-1340, 1994.
- Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H: Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction-enzyme analysis. *Vet. Rec.* 138: 495-496, 1996.
- 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.
- Hu RL, Huang G, Qiu W, et al.: Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commun.* 25: 77-84, 2001.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al.: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 83: 145-154, 1999.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Millis A, et al.: 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28: 655-661, 2000.
- Leary PL, Erker JC, Chalmers ML, et al.: Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the I3-encoding L1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1368-1375, 2002.
- Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, Buonavoglia C: Nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.* 105: 1-7, 2005.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, et al.: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1333-1336, 2004.
- Martella V, Cirone F, Elia G, et al.: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116: 301-309, 2006.
- Martella V, Decaro N, Elia N, Buonavoglia C: Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52: 312-315, 2005.
- 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.
- 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.
- Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, et al.: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65: 6544-6552, 1991.
- Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, et al.: Molecular characterisation of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75: 127-133, 2000.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, et al.: Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 612-615, 2001.
- Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, et al.: Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73: 197-200, 1998.
- Schulze C, Baumgartner W: Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for diagnosis of canine herpesvirus infection in puppies. *Vet. Pathol.* 35: 209-217, 1998.
- Steinel A, Venter EH, van Vuuren M, Truyen U: Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65: 239-242, 1998.
- Truyen U, Platzer G, Parrish CR: Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.* 138: 365-366, 1996.
- Truyen U, Steinel A, Bruckner L, et al.: Distribution of antigenic types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142: 115-119, 2000.
- Truyen U: Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13, 2006.
- Yule TD, Roth MB, Dreier K, et al.: Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine* 15: 720-729, 1997.