

# Indagine sulla diffusione delle nuove varianti del *parvovirus canino tipo 2* in Abruzzo

## RIASSUNTO

**Obiettivi** - In questo studio vengono riportati i risultati delle indagini diagnostiche condotte in cani con gastroenterite emorragica al fine di valutare la presenza e la diffusione delle diverse varianti di *canine parvovirus tipo 2* (CPV-2) in Abruzzo.

**Materiali e metodi** - Sono stati prelevati n. 104 campioni fecali dai quali è stata eseguita la ricerca e la tipizzazione delle varianti di CPV-2 mediante PCR convenzionale e real-time PCR con sonde *minor groove binder* (MGB).

**Risultati** - Complessivamente sono risultati positivi per CPV-2 n. 55 campioni (52,8%). Da questi, la tipizzazione virale mediante sonde specifiche MGB ha permesso di caratterizzare n. 31 ceppi (56,3%) come CPV-2a, n. 1 ceppo (1,8%) come CPV-2b e n. 23 (41,8%) come CPV-2c. Rispetto all'anno di campionamento, la distribuzione di CPV-2 risulta differente in base alla variante considerata.

**Conclusioni** - La parvovirosi del cane rappresenta una patologia di interesse nella popolazione canina in Abruzzo. Nonostante CPV-2a sia prevalente nel campione in esame, la circolazione della nuova variante CPV-2c risulta in rapido aumento, mentre la variante CPV-2b sembra destinata a scomparire. In tal senso, il monitoraggio continuo nei confronti della parvovirosi risulta essenziale per evidenziare eventuali cambiamenti nella distribuzione geografica delle varianti di CPV-2 nel tempo e le possibili ripercussioni sull'efficacia degli interventi di profilassi adottati.

Cristina E. Di Francesco<sup>1</sup>,  
Barbara Di Martino<sup>1</sup>, Roberto Speranza<sup>1</sup>,  
Gabriella Andrenacci<sup>1</sup>, Nicola Decaro<sup>2</sup>,  
Costantina Desario<sup>2</sup>, Fulvio Marsilio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche Compare,  
Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo

<sup>2</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia,  
Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

## INTRODUZIONE

*Canine parvovirus* (CPV-2) è l'agente eziologico della gastroenterite emorragica del cane, malattia infettiva caratterizzata da febbre, vomito, diarrea, prevalentemente emorragica, associata a leucopenia che si osserva di norma nei cuccioli di 6-12 settimane di età<sup>1,2</sup>. CPV-2 è stato segnalato per la prima volta alla fine degli anni '70 in Europa e Nord America in cuccioli con gastroenterite emorragica e miocardite<sup>3,4</sup>. Nel corso degli anni il virus ha subito modificazioni genetiche che hanno determinato la comparsa di nuove varianti, indicate come CPV-2a, -2b e 2c, le quali hanno completamente sostituito il ceppo originale, presente attualmente solo nelle formulazioni vaccinali<sup>5,6,7,8,9</sup>.

Dal momento che i sintomi della parvovirosi non sono differenziabili dalle altre forme di enterite, le indagini di laboratorio risultano essenziali per confermare il sospetto clinico. In particolare, negli ultimi anni l'avvento della biologia molecolare ha reso disponibili sistemi diagnostici per la parvovirosi, basati sia su protocolli convenzionali di PCR che su metodiche di tipo quantitativo (real-time PCR), più sensibili e specifici rispetto alle tecniche tradizionali<sup>7,10,11</sup>. La metodica di real-time PCR, inoltre, risulta ancora più sensibile delle tecniche di PCR convenzionale, riuscendo a evidenziare quantità inferiori a 10<sup>2</sup> copie di DNA virale, oltre a fornire il vantaggio di poter processare un numero maggiore di campioni contemporaneamente e in tempi più brevi<sup>12,13</sup>. Un'ulteriore evoluzione delle tecniche di real-time PCR, basate sull'impiego di sonde *minor groove binder* (MGB)<sup>14</sup>, ha permesso di mettere a punto nuove metodiche più rapide e precise per la caratterizzazione delle varianti antigeniche di CPV-2, in precedenza identificabili solo mediante l'impiego combinato di anticorpi monoclonali e tecniche genetiche di analisi di restrizione<sup>7,5,15,16</sup>. Il test di real-time PCR con sonde MGB, inoltre, permette non solo di identificare le diverse varianti del virus associate all'infezione ma anche di differenziare quest'ultime dagli stipti vaccinali CPV-2<sup>17</sup>.

In Italia, la parvovirosi rappresenta ancora una patologia molto diffusa nella popolazione canina, nonostante l'impiego della vaccinazione, e le indagini condotte finora hanno evidenziato come la maggior parte dei focolai sia associata alla presenza delle varianti CPV-2a e CPV-2c. Quest'ultima è stata identificata per la prima volta in Puglia nel 2000 e da allora la sua diffusione nel corso degli anni sembra aumentare progressivamente<sup>7,18</sup>. Al contrario, la variante CPV-2b è scarsamente rappresentata e la sua diffusione sta gradualmente diminuendo<sup>8,19,20,21</sup>. In Abruzzo, in particolare, i dati disponibili sono frammentari e relativi alla sola circolazione di stipti CPV-2a mentre non esistono segnalazioni relative alla presenza di CPV-2b e CPV-2c<sup>18</sup>.

Scopo del presente lavoro, pertanto, è stato quello di valutare la presenza e la diffusione delle varianti di CPV-2 nella popolazione canina presente nella regione Abruzzo in corso di focolai sospetti di gastroenterite emorragica.

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 03/09/2009 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 19/11/2009”.

### MATERIALI E METODI

#### Raccolta dei campioni

Nel periodo compreso tra gennaio 2004 e dicembre 2008 sono stati raccolti n. 96 campioni di feci, n. 6 tamponi rettali da cani con sintomatologia riferibile a infezione da CPV-2 e n. 2 porzioni di intestino tenue prelevate da soggetti deceduti in seguito a sintomi gastroenterici, per un numero complessivo di n. 104 campioni.

I prelievi sono stati effettuati presso canili, cliniche e ambulatori veterinari della regione Abruzzo in cui gli animali erano stati ricoverati o portati a visita in seguito all'insorgenza dei sintomi.

Per ogni soggetto, quando possibile, sono state raccolte le informazioni relative all'età, alle vaccinazioni eseguite e alla sintomatologia osservata (Tab. 1). I campioni sono stati trasportati e conservati alla temperatura di +4°C fino al momento del loro conferimento in laboratorio. Successivamente, tutti i campioni sono stati omogenati al 10% (p/v) in soluzione salina tamponata (PBS, pH 7,2) e centrifugati a 2000 rpm per 20 minuti, in modo da eliminare i detriti più grossolani. Il surnatante così ottenuto è stato conservato alla temperatura di -20°C fino al momento dell'esecuzione delle prove di laboratorio.

#### PCR

Per l'esecuzione della prova, i surnatanti dei campioni in esame sono stati sottoposti a estrazione degli acidi nucleici utilizzando il kit Spin Cells (Spin Cells Mini kit: INVITECK, Germania) che permette di estrarre il DNA totale a partire da campioni di cellule, tamponi, sieri e plasma.

La sequenza target per la reazione di PCR è rappresentata da un frammento di 583 bp del gene che codifica per la proteina VP2, conservato in tutte le varianti antigeniche del virus, delimitato dai primers 555 For e 555 Rev<sup>7</sup>. Ciascuna prova è stata eseguita in 25 µl di volume totale contenente 4 µl di DNA, 12,5 µl di Go Taq® Green Master Mix 2X (Promega, Italia) e 50 picomol di ogni primer secondo il protocollo descritto in precedenza<sup>7</sup>.

Età	0-6m	> 6m	n.d.
Vaccinati	7	37	1
Non vaccinati	25	10	-
n.d.	9	7	8
<b>Totale</b>	<b>41 (39,4%)</b>	<b>54 (51,9%)</b>	<b>9 (8,6%)</b>

*n.d.* = non disponibile; m = mesi.

Per ciascuna reazione è stato aggiunto un controllo positivo, rappresentato da un estratto di cellule A72 infettate con un ceppo di CPV-2, ed un controllo negativo, costituito da un campione di feci di un cane adulto non infetto.

Al termine della reazione, il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a elettroforesi in gel di agarosio all'1% e visualizzato alla luce UV mediante transilluminatore.

#### Quantificazione e tipizzazione virale

Tutti i campioni in esame sono stati analizzati in real-time PCR con sonda TaqMan tradizionale, secondo il protocollo descritto in precedenza<sup>11</sup>, al fine di confermare e verificare i risultati ottenuti in PCR convenzionale. I risultati della prova sono stati espressi come valori di Ct. I ceppi di CPV-2 così identificati sono stati sottoposti a tipizzazione virale mediante real-time PCR con sonda MGB secondo quanto descritto da Decaro *et al.*<sup>14,17</sup>. Per entrambe le prove sono stati impiegati i surnatanti dei campioni sottoposti a bollitura per 10 minuti e successivamente diluiti 1:10 in acqua distillata sterile.

### RISULTATI

Complessivamente sono risultati positivi alla prova di PCR convenzionale n. 38 campioni (36,5%), la totalità dei quali confermati in real-time PCR con sonda TaqMan. La prova di real-time PCR con sonda TaqMan ha identificato n. 17 ulteriori campioni positivi per un numero complessivo di n. 55 ceppi di CPV-2 (52,8%), con valori di Ct variabili tra un minimo di 10,1 ad un massimo di 38,2.

La tipizzazione virale, eseguita mediante sonde specifiche MGB, ha permesso di caratterizzare n. 31 ceppi (56,3%) come CPV-2a, n. 1 ceppo (1,8%) come CPV-2b e n. 23 (41,8%) come CPV-2c. In base ai dati raccolti relativi all'età e alla vaccinazione degli animali risultati positivi, n. 31 soggetti (56,3%) erano di età inferiore a 6 mesi e n. 17 (30,9%) erano stati sottoposti a regolare vaccinazione (Grafici 1 e 2). In relazione alle varianti virali identificate, il 70,9% dei ceppi CPV-2a e il 78,3% dei ceppi CPV-2c sono risultati distribuiti nella fascia di età di 0-12 mesi (Grafico 3).

Rispetto all'anno di campionamento i ceppi identificati sono variamente distribuiti nel tempo con il 52% dei ceppi CPV-2a presenti nei campioni prelevati nel 2004, e il 70% della variante CPV-2c presente tra gli anni 2007 e 2008 (Grafico 4).

### DISCUSSIONE

L'indagine condotta in questo studio ha permesso di evidenziare come la parvovirus del cane rappresenti anche in Abruzzo un problema sanitario

importante nonostante l'uso, ormai diffuso, della vaccinazione. Infatti, su un campione di n. 104 soggetti con sintomi gastroenterici, indipendentemente dalla variante antigenica tipizzata, la presenza di CPV-2 è stata dimostrata nel 52,8% dei casi per un numero complessivo di 55 animali.

In base ai dati raccolti relativi all'età degli animali oggetto di studio è stato possibile osservare come l'infezione da CPV-2, indipendentemente dalla variante identificata, sia più frequente nei soggetti con età inferiore ai 12 mesi, in accordo con quanto precedentemente riportato da altri Autori<sup>1,2</sup>. Rispetto alla storia vaccinale degli animali, nonostante in alcuni casi non sia stato possibile ottenere informazioni in tal senso, è interessante sottolineare come il 30% dei soggetti positivi sia stato comunque sottoposto a regolare vaccinazione. Questo dato solleva interessanti interrogativi sulla reale efficacia dei protocolli vaccinali adottati e sulla possibilità che altri fattori, come l'età troppo precoce del soggetto, patologie immunodepressive concomitanti o la conservazione non corretta dei vaccini, possano impedire l'instaurarsi di una protezione immunitaria duratura nei confronti della parvovirosi, in seguito all'intervento vaccinale. L'impiego di vaccini allestiti solo con il ceppo originale CPV-2 o, comunque, con varianti non presenti in un determinato territorio, potrebbe essere considerato un altro fattore in grado di influenzare la capacità di proteggere gli animali nei confronti dei nuovi stipiti virali. Nel nostro studio i dati raccolti non permettono di dimostrare alcuna relazione tra le varianti di CPV-2 individuate, associate all'infezione, e il tipo di vaccino impiegato per la profilassi immunizzante dei cani. Inoltre, gli studi condotti finora in tal senso non forniscono risultati univoci anche se è stato evidenziato come cani vaccinati con il ceppo originale CPV-2 abbiano titoli anticorpali più elevati nei confronti del virus omologo piuttosto che della variante antigenica CPV-2b<sup>22</sup>. Tuttavia, è possibile affermare che nonostante sia auspicabile adeguare i presidi immunizzanti alla reale distribuzione delle varianti di CPV-2 nel territorio, i vaccini disponibili in commercio, se impiegati in maniera corretta, sono comunque efficaci nel proteggere i cani dalla parvovirosi<sup>23,24,25</sup>.

La tipizzazione dei ceppi effettuata mediante real-time PCR con sonda MGB dimostra come la variante antigenica CPV-2a sia quella prevalente nel campione oggetto di studio. Indagini condotte negli anni precedenti al 2004, su n. 157 cani provenienti dalla stessa area geografica, avevano già indicato questa variante come quella più diffusa mentre CPV-2c era stato identificato in un solo campione<sup>26</sup>. Tuttavia, rispetto al passato, i dati ottenuti in questo studio indicano come la diffusione di entrambe le varianti abbia subito delle modificazioni nel corso degli anni. Infatti, la presenza di CPV-2a, identificato nella totalità dei campioni positivi pre-

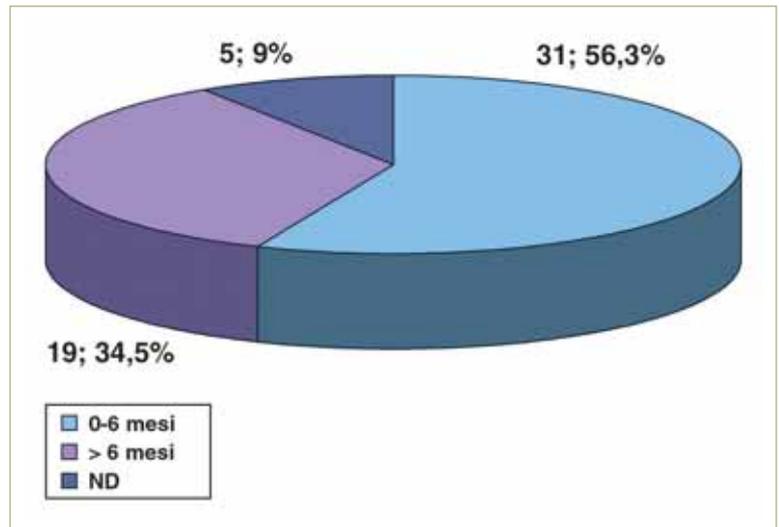


GRAFICO 1 - Classi di età degli animali risultati positivi per CPV.

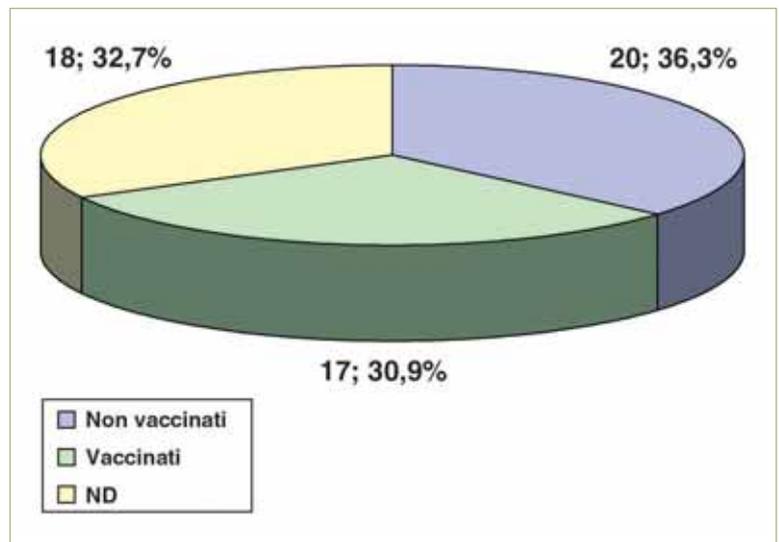


GRAFICO 2 - Stato vaccinale degli animali risultati positivi per CPV-2.

levati nel 2004, si riduce negli anni successivi a favore della variante CPV-2c la cui circolazione sembra aumentare gradualmente. Infine, il rilevamento di un solo stipite della variante CPV-2b nei campioni esaminati rinforza l'ipotesi che la diffusione di tale ceppo stia progressivamente diminuendo<sup>8,18,19</sup>.

Le prove di laboratorio rappresentano uno strumento indispensabile per confermare il sospetto clinico di parvovirosi, dal momento che i sintomi gastroenterici non sono specifici per CPV-2 ma possono essere riscontrati anche in corso di altre patologie a diversa eziologia. In questo lavoro, sono state impiegate tecniche molecolari sia in PCR convenzionale che con metodiche di tipo quantitativo. Pur essendo entrambi più specifici rispetto alle prove tradizionali i due test hanno tuttavia fornito prestazioni differenti in termini di sensibilità, confermando come la prova di real-time PCR con

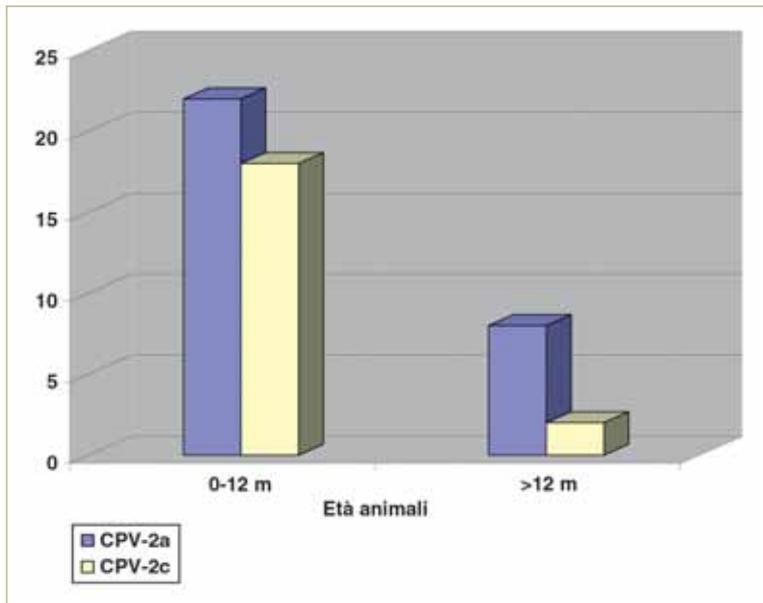


GRAFICO 3 - Distribuzione delle varianti antigeniche di CPV-2 identificate rispetto alla fascia di età degli animali risultati positivi.

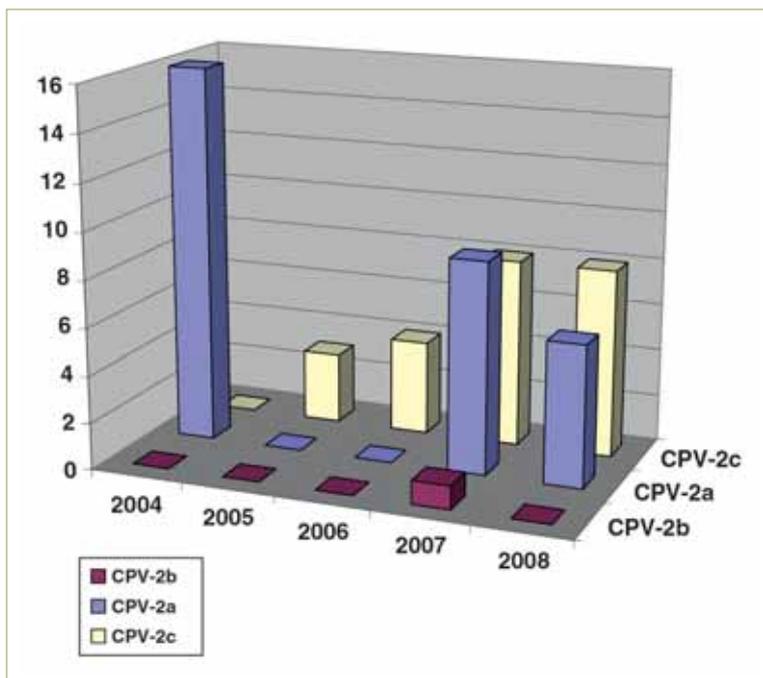


GRAFICO 4 - Distribuzione delle varianti antigeniche di CPV-2 identificate rispetto all'anno di prelievo dei campioni.

sonda TaqMan permetta di identificare un maggior numero di campioni positivi. È probabile che questo risultato sia stato influenzato anche dal momento del prelievo delle feci. Infatti, in corso di infezione, l'eliminazione del virus attraverso le feci raggiunge valori elevati ancora prima della comparsa della sintomatologia, per poi decrescere pro-

gressivamente<sup>2</sup>. Ne consegue che, se si interviene nelle fasi più precoci dell'infezione, la probabilità di ottenere un risultato positivo è molto elevata sia in PCR convenzionale che con sonda TaqMan, mentre con il progredire della malattia il virus può essere evidenziato solo con quest'ultima<sup>27</sup>.

In conclusione, il monitoraggio condotto finora nei confronti della parvovirus rappresenta uno strumento utile non solo per conoscere la reale diffusione dell'infezione nel territorio ma anche per evidenziare eventuali cambiamenti nella distribuzione delle varianti di CPV-2 nel tempo. In particolare, la conoscenza della reale distribuzione delle nuove varianti di CPV-2 risulta di notevole interesse per monitorare l'effettiva efficacia della vaccinazione e verificare l'opportunità di allestire nuovi vaccini con i ceppi realmente presenti nel territorio.

**Parole chiave**

Cane, gastroenterite emorragica, CPV-2, PCR, varianti.

**Occurrence of canine parvovirus-2 variants in Abruzzo region**

**Summary**

**Aim of the study** - The diagnostic investigation results for canine parvovirus type 2 (CPV-2) infection in symptomatic dogs are reported, in order to evaluate the presence and the distribution of the viral variants in the canine population of Abruzzo region.

**Materials and methods** - One hundred and four faecal samples were analyzed by conventional and real-time PCR with minor groove binder (MGB) probes.

**Results** - CPV-2 DNA was detected in 55 (52,8%) samples and 31 (56,3%) CPV-2a, 1 (1,8%) CPV-2b and 23 (41,8%) CPV-2c strains were identified by real-time PCR with MGB probes. The distribution of CPV-2 over the sampling years appears different in relation to each variant.

**Conclusions** - CPV-2 is an important causative agent of gastroenteritis in dogs of the Abruzzo region and the CPV-2a was the most prevalent variant. However, it appears that the CPV-2c occurrence is growing, while CPV-2b is poorly widespread. In conclusion, the monitoring of the parvovirus infection in dogs population is useful to verify the evolution of the geographic distribution of the CPV-2 variants and to evaluate the efficacy of the prophylactic measures performed to control the disease.

**Key words**

Dog, haemorrhagic enteritis, CPV-2, PCR, variants.

BIBLIOGRAFIA

- Hoskins JO: Canine viral enteritis. In: Infection disease of the dog and the cat. Philadelphia (USA), Greene C.E. (Ed), WB Saunders, 1998, pp 40-48.
- Buonavoglia C: Parvovirus del cane. In: Manuale di malattie infettive del cane e del gatto. SCIVAC Ed, 2005, pp 66-71.
- Kelly W.R: 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 a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. Vet. Rec. 105: 156-159, 1979.
- Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF et al.: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. Virology 129: 401-414, 1991.
- Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, Martella V et al.: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. New Microbiol. 23: 93-96, 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.
- 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 (1): 29-33, 2005.
- Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M et al.: Evaluation of the antigenic relationships among the canine parvovirus (CPV-2) variants. Clin. Vaccine Immunol. 15 (3): 534-9, 2008.
- 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 (2): 127-133, 2000.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C et al.: A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. Vet. Microbiol. 105 (1): 19-28, 2005.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A et al.: Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? Journal of Virological Methods 126: 179-185, 2005.
- Desario C, Campolo M, Cavalli A, Lorusso E et al.: La diagnosi di infezione da Parvovirus del cane tra storia e attualità. Veterinaria 20 (2): 55-61, 2006.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M et al.: Characterisation of the canine parvovirus type variants using minor groove binder probe technology. J. Virol. Methods 133: 92-99, 2006.
- Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE: Natural variation of canine parvovirus. Science 230: 1046-1048, 1985.
- Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H: Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction-enzyme analysis. Vet. Rec. 136: 63-67, 1996.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C 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.
- Martella V, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C: Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. J. Vet. Med. B. 52, 312-315, 2005.
- Battilani M, Ciulli S, Tisato E, Prosperi S: Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. Virus Research 83, 149-157, 2002.
- Martella V, Decaro N, Buonavoglia C: Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. Virus Genes 33:11-13, 2006.
- Decaro N, Elia G, Desario C, Campolo M et al.: Gastroenterite in cucciolo dopo la vaccinazione per la parvovirus del cane: un dilemma diagnostico. Veterinaria. 21: 23-28, 2007.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M et al.: Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. Cl. Diagn. Lab. Immunol. 8 (3): 612-615, 2001.
- Truyen U: Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? Vet. Microbiol. 117 (1): 9-13, 2006.
- Larson LJ, Schultz RD: Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? Vet. Ther. 9 (2): 94-101, 2008.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WS et al.: Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. Vet. Microbiol. 128, (1-2): 48-55, 2008.
- Campanella R: Indagine sulla prevalenza di canine parvovirus type 2 in Abruzzo. Tesi di Laurea, Anno Accademico 2003-2004.
- Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G: Clinical and virological finding in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. J. Vet. Diagn. Invest. 17: 133-138, 2005.



In cooperation with



Facoltà di Medicina Veterinaria  
Università degli Studi di Bologna

# WORLD VETERINARY ORTHOPEDIC CONGRESS

## Bologna (Italy) - September 15<sup>th</sup> - 18<sup>th</sup>, 2010

organizzato da  Soc. Cons. a r.l.

Azienda con sistema qualità certificato ISO 9001:2008