

Tre casi clinici di panleucopenia felina causata dalle varianti del parvovirus del cane

RIASSUNTO

Nella presente nota si riportano i risultati delle analisi ematologiche, virologiche e molecolari condotte su tre gatti con sintomatologia clinica riferibile a panleucopenia felina. In tutti i casi sono stati identificati, mediante isolamento virale e/o real-time PCR con sonda TaqMan, stipiti di parvovirus, i quali sono stati successivamente caratterizzati mediante metodiche molecolari (test MGB e/o analisi di sequenza del gene VP2) come varianti antigeniche 2a o 2c del parvovirus del cane. I risultati di questo studio pongono interrogativi riguardo la efficacia dei vaccini disponibili in commercio per la profilassi della panleucopenia felina verso le varianti del parvovirus del cane, le quali sono sempre più frequentemente associate a forme di malattia nella specie felina.

INTRODUZIONE

La panleucopenia felina (FPL) è la prima malattia del gatto domestico di cui è stata riconosciuta l'eziologia virale.¹ L'agente eziologico, virus della panleucopenia felina (FPLV), appartiene alla famiglia *Parvoviridae*, sottofamiglia *Parvovirinae*, genere *Parvovirus*, sottogruppo dei parvovirus felini² di cui è il capostipite. I virus di tale sottogruppo, tra cui il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2), il parvovirus dell'enterite del visone ed il parvovirus del procione, sono stati recentemente inclusi in una sola specie virale, virus della panleucopenia felina³. FPLV è un piccolo virus a DNA monocatenario, con un diametro di circa 26 nm, simmetria icosaedrica, sprovvisto di envelope⁴. Studi condotti sull'interazione esistente tra i virus FPLV e CPV ed il recettore cellulare transferina (TfR)⁵ hanno dimostrato che FPLV 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. Specifiche mutazioni a livello dei residui 87, 300 e 305 della VP2 hanno permesso alle varianti CPV-2a e CPV-2b di acquisire la capacità di infettare i felini *in vivo*^{6,7,8,9}. Il gatto è sensibile, pertanto, oltre che a FPLV anche alle varianti antigeniche di CPV (2a,2b,2c) e sviluppa una malattia indistinguibile dalla "classica" panleucopenia⁶. Da indagini effettuate in Giappone e negli Stati Uniti è emerso che circa il 10% dei parvovirus isolati dai gatti sono CPV-like^{10,7}. Il parvovirus del cane è stato isolato anche nei felidi selvatici in Africa² e, da recenti indagini effettuate in Vietnam e Taiwan, è emerso che più dell'80% dei parvovirus isolati da gatti domestici e selvatici erano varianti di CPV-2⁸. L'estensione dello spettro d'ospite dei nuovi tipi antigenici di CPV-2 al gatto potrebbe giustificare il successo evolutivo delle nuove varianti che coesistono a livello mondiale in proporzione variabile.

Nel 2001 è stata identificata in Italia una nuova variante, CPV-2c, che differisce dagli stipiti "classici" 2b per la sostituzione di due aminoacidi nei residui 297 (Ser → Ala) e 426 (Asp → Glu) della proteina VP2¹¹. Questa variante è stata ripetutamente segnalata nel cane in Italia^{12,13,14,15,16,17}, in altri Paesi europei^{18,19}, in Vietnam²⁰, Stati Uniti²¹ e Sud America²².

**Francesco Cirone,
Maria Loredana Colaiani,
Francesca Amorisco, Michele Losurdo,
Nicola Decaro, Costantina Desario,
Canio Buonavoglia**

Dispez- Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Bari

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 17/11/2011 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 07/02/2012”.

Nella presente nota vengono descritti casi di panleucopenia felina nel gatto sostenuti dalla variante CPV-2.

MATERIALI E METODI

Descrizione dei casi clinici

Caso n.1 (11/08). Gatto di razza persiana di 3 mesi di età proveniente da un pet-shop in Puglia che importava cani e gatti dall'Europa dell'Est. Al momento dell'ospedalizzazione il gatto presentava perdita di peso, diarrea emorragica, ipertermia (39.8°C), depressione del sensorio, anoressia, ulcere buccali e gengivite. L'animale aveva completato la profilassi vaccinale nei confronti dei seguenti patogeni: FPLV, herpesvirus felino (FeHV-1), calicivirus felino (FCV) e *Chlamydomphila felis*. Al gatto erano stati somministrati fluido-terapia di supporto e 10 mg/kg di amoxicillina-acido clavulanico (Synulox[®], Pfizer) intramuscolo, una volta al giorno. A distanza di 8 giorni dalla comparsa della sintomatologia il gatto è deceduto. Il campione di sangue prelevato per gli esami ematologici 3 giorni prima del decesso aveva evidenziato lieve calo del numero dei leucociti (5.2×10^9 WBC/l), marcata linfopenia (0.8×10^9 cellule/l) e numero di neutrofili nella norma (3.9×10^9 cellule/l). Era stata, inoltre, evidenziata anemia con valori di emoglobina pari a 6.7 g/l, numero di globuli rossi (GR) pari a 3.4×10^{12} /l e un ematocrito di 28.2%. L'esame anatomico-patologico aveva evidenziato la presenza di ulcere sia sulla mucosa buccale che in quella faringea, enterite emorragica (Foto 1), focoli

lai necrotici sul fegato, splenomegalia, linfonodi mesenterici aumentati di volume ed emorragici (Foto 2 e 3). Sono stati prelevati campioni di ulcere buccali ed il contenuto intestinale per gli esami virologici.

Alcuni giorni prima, nel pet-shop di provenienza del gatto, erano stati registrati due casi di gastroenterite acuta con vomito e diarrea non emorragica in un mastino napoletano di 1 mese e mezzo, nato e allevato in Italia e in un Germanspitz di 3 mesi importato dalla Romania. Dagli stessi sono stati prelevati tamponi rettali 4 giorni dopo la comparsa dei sintomi.

I suddetti cani avevano ricevuto rispettivamente una e due dosi di vaccino tetravalente per parvovirus, cimurro, epatite infettiva e leptospirosi. Nell'arco di 8-10 giorni i cani, comunque, erano completamente guariti.

Caso n. 2 (234/08). Gatto europeo a pelo corto di 2 mesi e mezzo di età sottoposto a visita veterinaria per comparsa di diarrea non emorragica, depressione e perdita di appetito. Il gatto viveva in casa con possibilità di aggirarsi nel vicinato durante il giorno. Aveva ricevuto 2 dosi di vaccino per FPLV, FeHV-1, FCV e *C. felis*. L'animale era stato sottoposto a fluido-terapia e a somministrazione di 7 mg/kg di amoxicillina (Clamoxyl[®], Pfizer) intramuscolo, una volta al giorno, per circa una settimana fino alla guarigione clinica. I parametri ematologici erano tutti nella norma, inclusi la conta totale e differenziale dei WBC. Erano stati prelevati campioni di feci per gli esami virologici.

Caso n. 3 (300/10). Gatto europeo randagio a pelo corto, di 3 mesi di età, giunto con un leggero edema sottocutaneo alla testa, da cui fuoriusciva materiale purulento. Del gatto non si aveva alcuna informazione, neanche quelle inerenti la sua storia vaccinale. Alla visita clinica, veniva evidenziata un'area alopecica di circa 4 cm di diametro, in corrispondenza dell'edema sottocutaneo. Le condizioni generali dell'animale erano abbastanza buone e, nonostante la presenza di febbre (39.8°C), l'appetito era conservato. Il gatto veniva, quindi sottoposto a un protocollo terapeutico a base di amoxicillina-acido clavulanico, 25 mg/kg, 2 volte al giorno.

Il giorno seguente lo stesso veniva nuovamente sottoposto a visita medica per la comparsa di sintomi neurologici, quali atassia e difficoltà nella stazione e deambulazione. All'esame neurologico si evidenziava una riduzione dei riflessi posturali a carico di tutti gli arti, mentre i riflessi vestibolo-oculari e spinali, la risposta al dolore e la funzionalità degli sfinteri erano mantenuti. Si provvedeva, pertanto, alla raccolta di tamponi rettali e campioni di sangue e per gli esami ematologici, per la ricerca del virus della leucemia felina (FeLV), e del virus dell'immunodeficienza felina (FIV).

Gli esami ematologici avevano evidenziato una marcata alterazione della conta totale dei bianchi

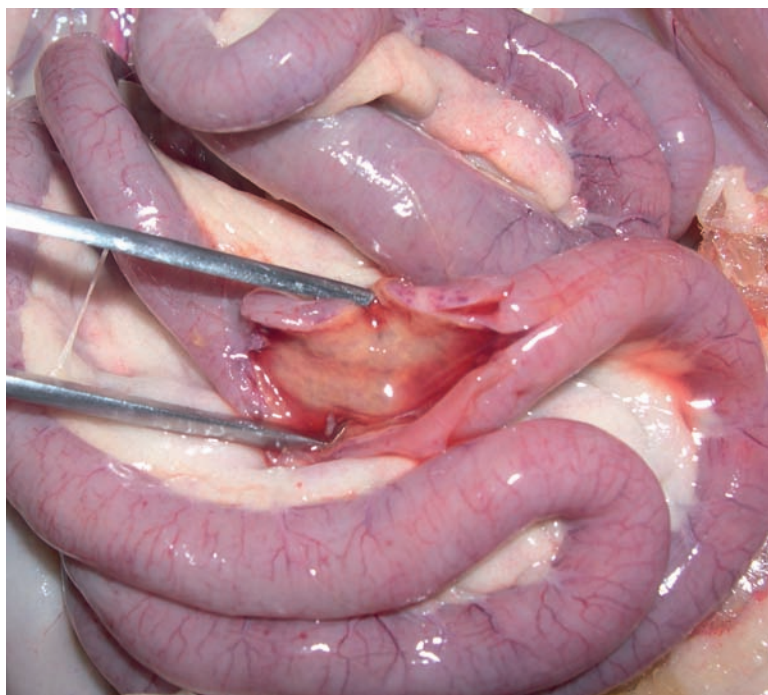


FOTO 1 - Grave enterite emorragica.

con valori pari a 28.5×10^9 cellule/l, con linfopenia (0.5×10^9 cellule/l) ed aumento dei neutrofilii (23.9×10^9 cellule/l). Era evidente anche una riduzione dei valori dell'ematokrito (23.9%) e delle piastrine (79×10^9 cellule/l).

Il profilo elettroforetico delle proteine sieriche non aveva evidenziato particolari anomalie; il test FIV/FeLV effettuato sul sangue era risultato negativo, mentre lo SNAP® test per CPV/FPLV eseguito sulle feci aveva dato esito positivo. Tale test, pur essendo stato standardizzato per la diagnosi di parvovirus del cane, si è mostrato capace di rilevare anche stipiti FPLV nella specie felina²³. Nei giorni successivi il gatto aveva presentato un miglioramento del quadro clinico generale con la comparsa di appetito, temperatura rettale nella norma e attenuazione, fino alla scomparsa, dei sintomi neurologici. Cinque giorni dopo il gatto presentava sintomi riferibili a diarrea e anoressia; quindi gli veniva somministrata sulfametopirazina (30 mg/kg due volte al giorno).

Dopo circa quattro giorni comparivano anche più di 10 crisi convulsive al giorno e, sottoposto a TAC (tomografia assiale computerizzata) si evidenziava la presenza di un ascesso nella regione parietale sinistra in prossimità dell'ascesso sottocutaneo. Era inoltre evidente un alone di edema, riduzione del terzo ventricolo e deviazione dell'asse cerebrale. Di contro, non erano presenti anomalie cerebellari né segni, più o meno recenti, di fratture delle ossa craniche. La somministrazione di fenobarbitale (2.5 mg/kg, 2 volte al giorno) aveva rapidamente risolto le crisi neurologiche, mentre il progressivo assorbimento degli ascessi aveva permesso una guarigione completa dell'animale.

Indagini virologiche e molecolari

Per le indagini virologiche e molecolari sono stati processati i seguenti campioni: intestino e ulcere buccali del gatto 11/08 e tamponi rettali dei cani 12/08 A-B (caso n. 1); tamponi rettali del gatto 234/08 (caso n. 2); tamponi nasali, rettali e sangue intero del gatto 300/10 (caso n. 3).

Real-time PCR

Dai campioni raccolti sono stati estratti sia DNA che RNA mediante DNeasyTissue Kit e QIAampViral RNA Mini Kit (QIAGEN S.p.A., Milano, Italia), seguendo le relative istruzioni. Sugli estratti così ottenuti sono stati eseguiti i seguenti test real-time PCR:

- 1) Test real-time PCR con sonda TaqMan per la identificazione di CPV-2/FPLV²⁴ con amplificazione simultanea di controllo interno²⁵;
- 2) Test real-time PCR con sonde minor groove binder (MGB) per la discriminazione tra CPV-2 e FPLV²⁶;
- 3) Test real-time PCR con sonde MGB per la caratterizzazione delle varianti di CPV-2^{27,28}.



FOTO 2 - Enterite ed ingrossamento dei linfonodi.

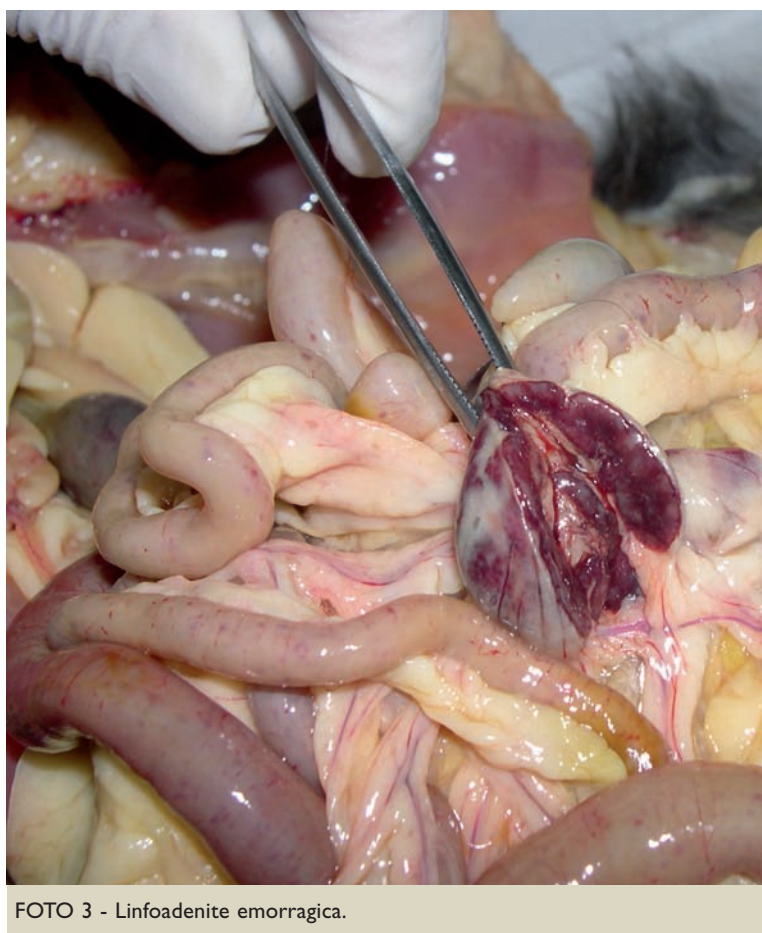


FOTO 3 - Linfadenite emorragica.

Tutte le prove in real-time PCR sono state eseguite in un i-CycleriQ™ Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories Srl) ed i dati sono stati analizzati dal software fornito in dotazione (versione 3.0). Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati nei test real-time PCR con sonde MGB sono riportate nella Tabella 1.

TABELLA I
Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati nel presente studio

Test	Primer/sonda	Sequenza (5'- 3')	Polarità	Specificità	Posizione amplificato	Ampiezza
Real-time PCR con sonda TaqMan	CPV-For	AAACAGGAATTAACATACTAATATATTTA	+	Tutte le varianti	4104-4135 ^a	93 bp
	CPV-Rev	AAATTTGACCATTGGATAAACT	-		4176-4198 ^a	
	CPV-Pb	FAM - TGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACC - TAMRA	+		4143-4172 ^a	
Test MGB discriminante tre CPV e FPLV	FPV/CPV-For	ACAAGATAAAAGACGTGGTGAACCTCAAATGGGAAATACAGACTATAT	+	CPV/FPLV	3713-3760 ^a	83 bp
	FPV/CPV-Rev	CAACCTCAGCTGGTCTCATAATAGT	-		3771-3795 ^a	
	FPV-Pb	VIC - ATGGGAAATACAGACTATAT - MGB	+	FPLV	3741-3760 ^a	
	CPV-Pb	FAM - ATGGGAAATACAACTATAT - MGB	+	CPV	3741-3760 ^a	
Test MGB specifico per le varianti 2a/2b	CPVa/b-For	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA	+	Tutte le varianti	1719-1744 ^{b,c}	93 bp
	CPVa/b-Rev	CCAATTGGATCTGTTGGTAGCAATACA	-		1785-1811 ^{b,c}	
	CPVa-Pb	VIC - CTTCTGTAAACAAATGATA - MGB	+	CPV-2a	1765-1783 ^b	
	CPVb1-Pb	FAM - CTTCTGTAAACAGATGATA - MGB	+	CPV-2b	1765-1783 ^c	
Test MGB specifico per le varianti 2b/2c	CPVb/c-For	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA	+	Tutte le varianti	1721-1748 ^c	150 bp
	CPVb/c-Rev	ATGCAGTTAAAGACCATAAGTATTAATATATTAGTATAGTTAATTC	-	Tutte le varianti	1155-1182 ^d	
	CPVb2-Pb	FAM - CCTGTAACAGATGATAAT - MGB	+	CPV-2b	1823-1870 ^c	
	CPVc-Pb	VIC - CCTGTAACAGAAGATAAT - MGB	+	CPV-2c	1257-1304 ^d	

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

Isolamento su cellule

I campioni risultati positivi a CPV-2 sono stati sottoposti a prove di isolamento in vitro, utilizzando cellule CrFK e A-72, sviluppate in piastra e su vetrini per le prove di immunofluorescenza (IF)¹⁷.

Screening per la ricerca di altri patogeni

Tutti gli estratti RNA sono stati testati mediante real-time o semplice RT-PCR per la ricerca di coronavirus dei carnivori²⁹ e calicivirus^{30,31}. Il campione di sangue intero del gatto 300/10 è stato utilizzato anche per la ricerca del DNA provirale di FIV³² e FeLV³³ e del DNA dell'anaplasma felino³⁴, mentre sui tamponi nasali del medesimo gatto è stata effettuata la ricerca dell'herpesvirus felino e di *C. felis*³⁵. Il DNA e l'RNA estratto dai tamponi rettali dei cuccioli 12/08 A-B sono stati testati rispettivamente per la ricerca di adenovirus del cane tipo 1 e 2³⁶ e per la ricerca del virus del cimurro (CDV)³⁷. Non è stato, invece, possibile eseguire l'esame batteriologico sul materiale purulento del gatto 300/10, in quanto tale campione non è stato inviato ai nostri laboratori.

Analisi di sequenza e filogenesi

L'intera sequenza della VP2 dei campioni positivi per CPV è stata ottenuta mediante PCR, secondo la metodica precedentemente descritta^{38,39}. I prodotti PCR sono stati sottoposti a sequenziamento diretto e le sequenze ottenute sono state assemblate ed analizzate usando il software BioEdit⁴⁰. L'analisi di se-

quenza è stata effettuata utilizzando gli strumenti dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e dell'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>). L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il software MEGA3⁴¹. Gli alberi filogenetici costruiti sul gene della proteina VP2 degli stipiti sequenziati e di stipiti parvovirus di riferimento, disponibili nelle banche dati consultabili on-line, sono stati elaborati usando i metodi neighbor-joining e massima parsimonia, fornendo un supporto statistico mediante bootstrapping pari a 1000.

RISULTATI

Il contenuto intestinale ed i tamponi rettali sia dei gatti che dei cuccioli di cane sono risultati positivi al test real-time PCR per CPV-2/FPLV, con titoli virali compresi tra 1.24×10^2 e 8.09×10^7 copie di DNA per mg di feci (Tabella 2). Anche il campione di sangue intero del gatto 300/10 ha dato segnale positivo per CPV2/FPL con titoli di 2.50×10^4 copie di DNA per ml. Il test real-time PCR con sonde MGB per la discriminazione tra FPLV e CPV-2 ha, inoltre, permesso di caratterizzare come ceppi CPV tutti i virus, sia provenienti dai gatti che dai due cani.

Il virus del gatto 11/08 e dei cuccioli che vivevano nel medesimo pet-shop (caso n. 1) è stato caratterizzato come CPV-2a, mentre il campione prelevato dal gatto 234/08 (caso n. 2) è risultato positivo per CPV-2c. Non è stato invece possibile ca-

ratterizzare completamente il ceppo CPV del gatto 300/10 (caso n. 3) a causa della mancata reattività con le sonde MGB tipo-specifiche 2a/2b e 2b/2c. I titoli virali piuttosto bassi riscontrati sia nelle feci che nel sangue del medesimo gatto non hanno permesso l'isolamento su cellule del virus che, invece, è risultato positivo sia su cellule A-72 che CrFK inoculate con campioni fecali degli altri due gatti (caso n. 1 e caso n. 2). Le cellule hanno mostrato effetto citopatico a partire dal terzo o quarto passaggio e sono risultate positive al test IFI (Foto 4). Le sonde MGB hanno confermato la caratterizzazione come CPV- 2a e CPV-2c degli isolati relativi, rispettivamente, al caso n.1 e n. 2.

Le prove effettuate per la ricerca di altri patogeni hanno permesso di evidenziare un calicivirus felino nelle ulcere buccali del gatto 11/08 ed un ceppo CCoV, successivamente genotipizzato come tipo I, nei tamponi fecali dei cani 12/08 A-B. Negli altri due gatti infetti non sono stati riscontrati altri patogeni.

L'analisi di sequenza dell'intero gene VP2 ha confermato i risultati della caratterizzazione mediante MGB. In particolare, tutti gli stipiti felini hanno mostrato residui tipici di CPV, quali Leu-87, Thr-101, Gly-300, Tyr-305, and Asp-375. In posizione 1276-1278 del gene VP2, lo stipite CPV-2a felino 11/08 e quelli canini 12/08-A e 12/08-B presentavano il codone AAT (residuo Asn-426), mentre nello stipite CPV-2c felino 234/08 e nello stipite felino non caratterizzato 300/10 era presente il codone GAA (residuo Glu-426), tipico dei ceppi CPV-2c. Inoltre, lo stipite 300/10 presentava anche la mutazione nucleotidica A1275G nel sito di legame della sonda specifica per CPV-2c, la quale giustificava l'assenza di fluorescenza VIC nel test MGB 2b/2c. Tale mutazione, tuttavia, non era responsabile di alcuna sostituzione aminoacidica nel relativo residuo 425 della proteina VP2.

Mediante allineamenti multipli il ceppo CPV-2a 11/08 è risultato identico agli stipiti canini 12/08-A e 12/08-B, mentre lo stipite 234/08 ha mostrato una identità nucleotidica del 100% rispetto al ceppo di cane 127/08-B identificato di recente in Italia³⁹. Infine, lo stipite 300/10 ha evidenziato la più elevata identità nucleotidica (>99%) nei confronti di stipiti CPV-2c italiani caratterizzati dalla stessa mutazione silente a livello di codone 425³⁹. Mediante analisi filogenetica ottenuta con il metodo neighbor-joining, gli stipiti 11/08 (felino) e 12/08-A e 12/08-B (canini) sono stati raggruppati con altri stipiti CPV-2a identificati in Italia, mentre lo stipite 234/08 è risultato cadere nello stesso cluster di virus CPV-2c di origine italiana, tedesca e belga. Infine, il ceppo 300/100 ha clusterizzato con gli altri CPV-2c caratterizzati dalla mutazione silente a livello di codone 425 (Fig. 1). Il metodo della massima parsimonia ha confermato la topologia dell'albero ottenuta mediante neighbor-joining (dati non mostrati).

TABELLA 2
Risultati delle indagini virologiche effettuate su campioni di gatto e cane

No. identificativo	Animale	Campione	Titolo virale ^a	Ceppo CPV
11/08	Gatto	Contenuto intestinale	8.09×10^7	2a
12/08-A	Cane	Tampone rettale	1.24×10^2	2a
12/08-B	Cane	Tampone rettale	4.72×10^6	2a
234/08	Gatto	Tampone rettale	6.74×10^6	2c
300/10	Gatto	Tampone rettale	7.43×10^3	2c
300/10	Gatto	Sangue	2.5×10^4	2c

^aI titoli virali sono espressi per mg di feci o ml di sangue.

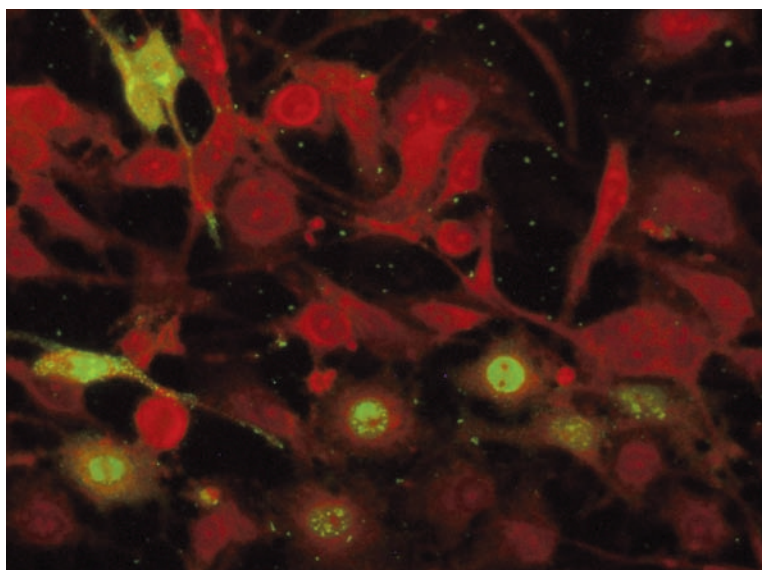


FOTO 4 - Cellule A-72 infette: tipica fluorescenza intranucleare (verde) nelle cellule positive. Le cellule negative appaiono colorate in rosso.

DISCUSSIONE

Negli ultimi tempi è stato dimostrato che il gatto non è recettivo esclusivamente al parvovirus tipico del gatto, FPLV. Le nuove varianti antigeniche del parvovirus canino hanno, infatti, esteso lo spettro d'ospite a tale specie animale, determinando una malattia del tutto simile alla panleucopenia^{7,8,42}. Casi di panleucopenia felina da CPV-2a e -2b in felidi selvatici e domestici sono stati segnalati in diverse parti del mondo: Germania, Africa, Stati Uniti^{7,2}, Giappone^{43,44}, Vietnam e Taiwan⁸, Italia⁴². L'infezione di gatti con la variante CPV-2c è stata segnalata solo di recente in Italia⁴², ma con una limitata descrizione dei sintomi, dei parametri ematologici e dell'evoluzione clinica della malattia. Nella presente nota sono stati descritti dettagliatamente 3 casi clinici di infezione da variante CPV-2a e CPV-2c nei gatti. La caratterizzazione è stata ottenuta mediante sonde MGB in real-time PCR e analisi di sequenza del gene per la VP2. Nel caso n. 1 il gatto infetto da CPV-2a aveva con ogni probabilità contratto l'infezione da un cucciolo del me-

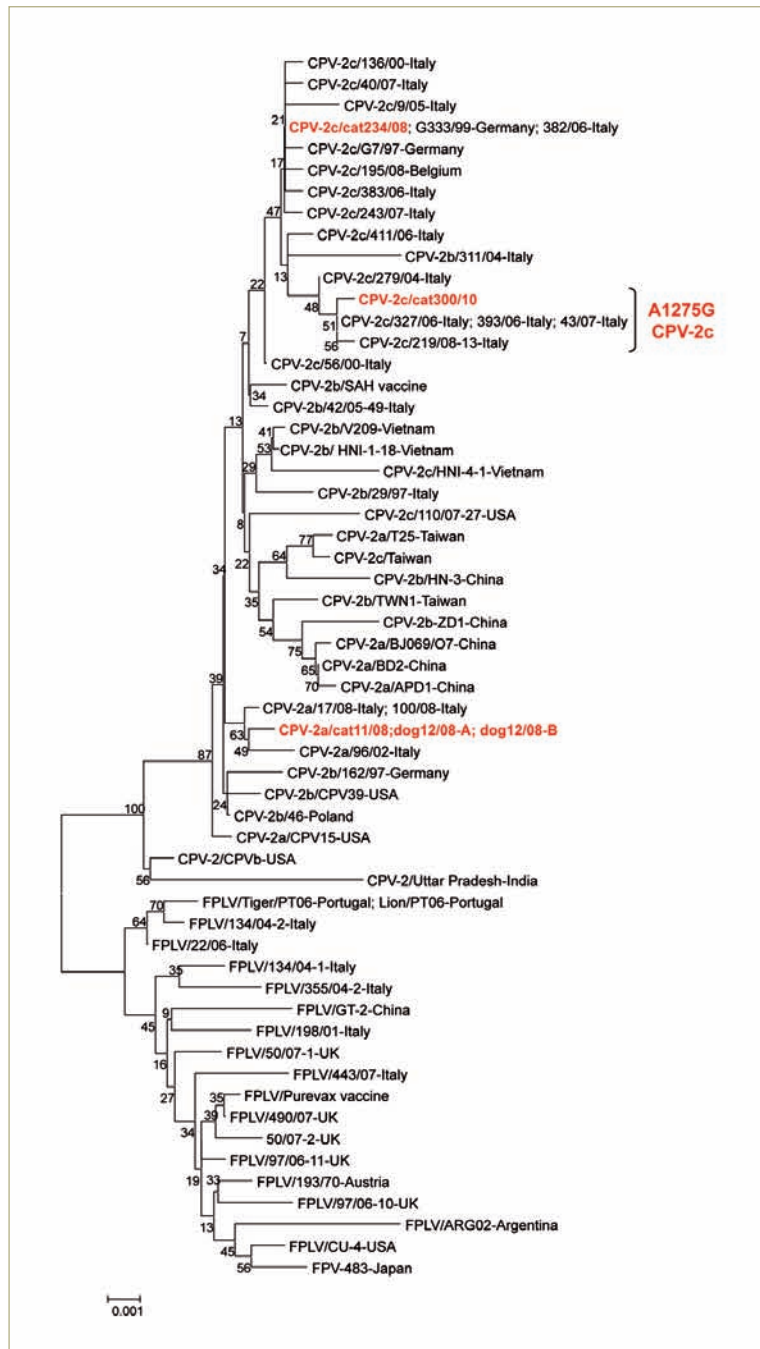


FIGURA 1 - Albero filogenetico costruito con il metodo neighbor-joining sulla sequenza completa del gene VP2 (1.755 nucleotidi) di stipti parvovirus di origine felina e canina. I numeri di accesso degli stipti di riferimento sono riportati in precedenti lavori^{38,39}. È stato fornito un supporto statistico mediante *bootstrap* pari a 1000. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche stimate per sito.

desimo pet shop importato dall'Est Europa. A supporto di tale ipotesi va considerato che la variante 2a è epidemiologicamente predominante nella popolazione canina dell'Europa dell'Est, piuttosto che in Italia dove, invece, appare più frequente la variante 2c^{12,19}. D'altro canto è noto che l'importazione, spesso non controllata, di cuccioli dai Paesi dell'Est è alla base della introduzione o reintroduzione di nuovi e vecchi patogeni, come l'adenovirus del cane tipo I⁴⁵ o ceppi artici del virus del cimurro⁴⁶. In quest'ottica si può fortemente ipo-

tizzare che il virus CPV-2a, riscontrato sia nel gatto I1/08 che nei cuccioli I2/08 A e B, sia stato originariamente introdotto nel pet shop attraverso animali importati dalla Romania.

Nel caso n. 2 si è osservata una forma benigna di malattia, con assenza di leucopenia evidente e sintomi clinici molto attenuati rispetto alle forme classiche di FPLV. Considerata l'età del soggetto colpito, il decorso benigno dell'infezione potrebbe essere dovuto ad una immunità colostrale residua, che potrebbe aver anche interferito con la vaccinazione, oppure ad una risposta individuale dello stesso soggetto particolarmente efficace nel contrastare l'infezione.

Analogamente il gatto 300/10 (caso n. 3) non ha presentato un quadro ematologico tipico della panleucopenia felina: a parte la marcata linfopenia, la conta totale dei globuli bianchi ed i neutrofilii risultavano aumentati come probabile conseguenza del concomitante ascesso. È stata esclusa, invece, una risposta leucocitaria cortisolo-indotta, in quanto non risulta che al gatto fossero stati somministrati cortisonici.

Di notevole rilievo in questo gatto è stato il coinvolgimento neurologico con la comparsa di atassia e convulsioni. È nota la possibilità di osservare disturbi neurologici in corso di panleucopenia, ma esclusivamente in gattini appena nati, a seguito della replicazione del virus nelle cellule di Purkinje del cervelletto. Questo comporta ipoplasia cerebellare e successiva atassia. Nel caso descritto, l'atassia si è manifestata solo nel primo stadio della malattia; successivamente sono comparse convulsioni. Questo dato, insieme al rilevamento mediante TAC di un ascesso parietale con assenza di lesioni al cervelletto, lasciano supporre che la sintomatologia nervosa sia stata diretta conseguenza del processo suppurativo piuttosto che dell'infezione virale. Tuttavia la successiva guarigione del gatto e la mancanza di esami sul liquido cerebrospinale non hanno permesso una diagnosi definitiva del quadro neurologico. Pur non conoscendo la storia clinica e vaccinale del gatto, i bassi titoli virali riscontrati nelle feci e nel sangue lasciano supporre che i sintomi neurologici erano comparsi quando il gatto era in fase di guarigione eziologica. In quest'ottica si può ipotizzare che l'immunosoppressione del gatto indotta da CPV-2c abbia favorito la colonizzazione batterica a livello cerebrale. La varietà delle forme cliniche osservate nei gatti infetti dalle varianti di CPV-2 potrebbe essere dovuta alle diverse condizioni individuali dei soggetti colpiti, quali coinfezioni con altri patogeni (calicivirus) o presenza di immunità materna residua.

Negli ultimi anni sono stati registrati diversi casi di panleucopenia felina causati dalle varianti di CPV-2. Dal punto di vista clinico, sarebbe opportuno valutare le interazioni ed i possibili rischi per la circolazione di questi virus tra cani e gatti. Alleva-

tori, veterinari e titolari di pet-shop dovrebbero essere adeguatamente informati su tali rischi in modo da evitare di mantenere cani e gatti negli stessi ambienti, soprattutto in presenza di sintomatologia gastroenterica in soggetti di una delle due specie animali.

L'osservazione di casi di panleucopenia felina causati dalle varianti di CPV-2 ha messo in discussione l'efficacia dei vaccini allestiti con FPLV nei confronti di possibili infezioni da varianti del CPV-2. Nel presente studio i gatti I1/08 e 234/08 (caso n. 1 e n. 2), pur avendo completato la profilassi vaccinale nei confronti della FPL, sono stati infettati dalle varianti rispettivamente 2a e 2c, con conseguente comparsa di sintomatologia clinica. Per il gatto 300/10 non è stato possibile accertare questo dato per la mancanza di qualsiasi anamnesi, trattandosi di un gatto randagio. Uno studio piuttosto recente¹⁹ ha dimostrato che vaccini allestiti con FPLV sono protettivi nei confronti del *challenge* con un ceppo CPV-2b. Tuttavia in tale studio sono stati utilizzati solo 2 gatti ed il *challenge* è stato effettuato a breve distanza dalla seconda somministrazione del vaccino. Tale condizione non corrisponde a quanto avviene sul territorio.

Inoltre, prove di cross-neutralizzazione effettuate tra il virus vaccinale FPLV e le varianti di CPV-2 lasciano ipotizzare delle differenze antigeniche ancora più marcate, quale probabile conseguenza del numero di mutazioni presenti a carico della proteina VP2 del capsido^{48,49}. Partendo da queste considerazioni il Comitato Consultivo Europeo sulle malattie dei gatti (European Advisory Board on Cat Diseases, ABCD)⁵⁰ ha sottolineato la necessità di valutare se e in che misura i vaccini allestiti con FPLV siano efficaci nei confronti delle varianti di CPV-2. I dati raccolti nel presente studio ribadiscono questa necessità e supportano ampiamente

l'ipotesi che le varianti di CPV-2, inclusa la nuova variante 2c, rappresentano un reale pericolo per la popolazione felina.

Il presente lavoro è stato realizzato con il finanziamento dell'Università degli Studi di Bari, contributo al PRIN08, progetto "Epidemiologia molecolare dei parvovirus dei carnivori". Si ringraziano il Dr. Gianfranco Pastorelli (Clinica Veterinaria Santa Fara, Bari) per i dati anamnestici ed i campioni clinici e la Dr.ssa Alice Casali (Ospedale Veterinario Pingry, Bari) per la tomografia computerizzata.

Parole chiave

Gatto; Panleucopenia felina; Parvovirus del cane.

■ Three cases of feline panleukopenia associated to canine parvovirus variants

Summary

In this study, the results of haematological, virological and molecular analyses carried out on three cats with clinical signs of feline panleukopenia are reported. Parvovirus strains were detected in clinical samples of all cats by means of virus isolation and/or real-time PCR using a TaqMan probe. Unexpectedly, these feline strains were characterised as canine parvovirus variants 2a or 2c by MGB assays and/or sequence analysis of the VP2 gene. The detection of canine parvovirus strains in cats with overt disease poses some concerns about the efficacy of commercially-available feline panleukopenia vaccines against the canine viruses that have been repeatedly reported in cats.

Key words

Cat; Feline panleukopenia; Canine parvovirus.

BIBLIOGRAFIA

1. Verge J., Cristoforoni N.: La gastroenterite infectieuse des chats est elle due a un virus filtrable? C. R. Soc. Biol. 1928; 99: 312-314.
2. Steinel A., Munson L., Van Vuuren L. et al.: Genetic Characterization of feline parvovirus sequence from various carnivores. J. Gen. Virol. 2000; 81: 345-350.
3. Tattersall P., Bergoin M., Bloom M.E., et al.: Family Parvoviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds), Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005 Elsevier Academic Press.
4. Appel M.J.G., Parrish C.R.: Canine parvovirus type 2. In: Appel M.J.G. (ed), 1987. Virus Infection of Carnivores. Elsevier, Amsterdam: pp. 69-92.
5. Parker J.S.L., Murphy W.J., Wang D., et al.: Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. J. Virol. 2001; 75: 3896-3902.
6. Truyen U., Evermann J.F., Vieler E., et al.: Evolution of feline-subgroup Parvovirus and the control of canine host range in vivo. J. Virol. 1996; 63: 4702-4710.
7. Truyen U., Evermann J.F., Vieler E., et al.: Evolution of canine Parvovirus involved loss and gain of feline host range. Virology. 1996; 215: 186-189.
8. Ikeda Y., Mochizuchi M., Naito R., et al.: Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat population and emerge of new antigenic types of CPV in cats. Virology 2000; 72: 13-19.
9. Mochizuchi M., Horiuchi M., Hiragi H., et al.: Isolation of canine Parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. J. Clinical. Microbiol. 1996; 34: 2101-2105.
10. Mochizuki M., Harasawa R., Nakatani H.: Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. Vet. Microbiol. 1993; 38: 1-10.
11. Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., et al.: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. J. Gen. Virol. 2001; 82: 1555-1560.
12. Martella V., Cavalli A., Pratelli A., et al.: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 1333-1336.
13. Martella V., Decaro N., Elia G., et al.: Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. J. Vet. Med. 2005; 52: 312-315.

14. 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.* 2005; 109: 19-27.
15. Decaro N., Desario C., Campolo M., et al.: Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005; 17: 133-138.
16. 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.* 2005; Anno 19, 1: 29-33.
17. Desario C., Decaro N., Campolo M., et al.: Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.* 2005; 121: 179-185.
18. 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* 2006; 53: 468-472.
19. Decaro N., Desario C., Addie D.D., et al.: Molecular epidemiology of canine parvovirus in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13: 1222-1224.
20. Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., et al.: A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 2004; 149: 2261-2269.
21. Hong C., Decaro N., Desario C., et al.: Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19: 535-539.
22. Pérez R., Francia L., Romero V., et al.: First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 2007; 124: 147-152.
23. Neuerer, F.F., Horlacher, K., Truyen, U., et al.: Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline. Med. Surg.* 2008; 10: 247-251.
24. 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.* 2005; 105: 19-28.
25. Hüseyin D., Stäuber N., Leutenegger C.M., et al.: Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 8: 123-128.
26. Decaro N., Desario C., Lucente, M.S., et al.: Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes. *J. Virol. Method* 2008; 147: 67-71.
27. Decaro N., Elia G., Campolo M., et al.: New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J. Vet. Med. B.* 2005; 52: 316-319.
28. 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.* 2006; 133: 92-99.
29. Gut M., Leutenegger C.M., Huder J.B., et al.: One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J. Virol. Methods.* 1999; 77: 37-46.
30. Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M., et al.: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 1999; 83: 145-154.
31. Marsilio F., Di Martino B., Decaro N., et al.: Nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.* 2005; 105: 1-7.
32. Stiles J., Bienzle D., Render J.A., et al.: Use of nested polymerase chain reaction (PCR) for detection of retroviruses from formalin-fixed, paraffin-embedded uveal melanomas in cats. *Vet. Ophthalmol.* 1999; 2: 113-116.
33. Quackenbush S.L., Dean G.A., Mullins J.I., et al.: Analysis of FeLV-FAIDS provirus burden and productive infection in lymphocyte subsets in vivo. *Virology* 1996; 223: 1-9.
34. Tasker S., Binns S.H., Day M.J., et al.: Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidate *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec* 2003; 152: 193-198.
35. Marsilio F., Di Martino B., Di Francesco C.: Use of a duplex-PCR assay to screen for Feline Herpesvirus-1 and *Chlamydia* spp. in mucosal swabs from cats. *New Microbiol.* 2004; 27: 287-292.
36. Hu, R.L., Huang, G., Qiu, W., et al.: Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commun.* 2001; 25: 77-84.
37. Elia G., Decaro N., Martella V., et al.: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006; 136: 171-176.
38. Decaro N., Desario C., Miccolupo A., et al.: Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2280-2289.
39. Decaro N., Desario C., Parisi A., et al.: Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology.* 2009; 385: 5-10.
40. Hall T.A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999; 41: 95-98.
41. Kumar S., Tamura K., Nei M.: MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004; 5: 150-163.
42. Battilani M., Bassani M., Forti D., et al.: Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). *Vet. Res. Commun.* 2006; 30: 223-226.
43. Mochizuki M., San Gabriel M.V., Nakatani H., et al.: Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.* 1993b; 55: 60-63.
44. Gamoh K., Shimazaki Y., Senda M., et al.: Antigenic type distribution of parvovirus isolated from domestic cats in Japan. *Vet. Rec.* 2003; 153: 751-752.
45. Decaro N., Campolo M., Elia G., et al.: Infectious canine hepatitis: An "old" disease reemerging in Italy. *Res. Vet. Sci.* 2007; 83: 269-273.
46. Martella V., Cirone F., Elia G., et al.: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 2006; 116: 301-309.
47. Gamoh K., Senda M., Inoue Y., et al.: Efficacy of an inactivated feline panleukopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat. *Vet. Rec.* 2005; 157: 285-287.
48. Parrish C.R.: Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology.* 1991; 183: 195-205.
49. Nakamura K., Ikeda Y., Miyazawa T., et al.: Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses. *Res. Vet. Sci.* 2001; 71: 219-22.
50. Truyen U., Addie D., Belák S., et al.: Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Fel. Med. Surg.* 2009; 11: 538-546.