

UNA NUOVA VARIANTE DEL PARVOVIRUS SI STA DIFFONDENDO NELLA POPOLAZIONE CANINA?

ANNAMARIA PRATELLI, VITO MARTELLA, ALESSANDRA CAVALLI, ANTONELLA TINELLI,
FRANCESCO CIRONE, MARIA TEMPESTA, CANIO BUONAVOGLIA

Dipartimento di Sanità e Benessere Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari

Riassunto

Gli autori descrivono l'isolamento in Italia di due ceppi "atipici" di parvovirus del cane (CPV) da cani con enterite. Entrambi gli isolati sono stati caratterizzati come variante 2b sia attraverso l'analisi antigenica (anticorpi monoclonali) che genomica (PCR). Tuttavia, l'analisi della sequenza del gene che codifica per la proteina capsidica, ha messo in evidenza la sostituzione di un aminoacido in posizione 426 [acido aspartico (Asp) → acido glutammico (Glu)] in un epitopo strategico della proteina. Poiché l'aminoacido in posizione 426 rappresenta un importante segnale del processo di evoluzione antigenica di CPV, entrambi gli stipiti isolati possono essere considerati variante 2c.

Summary

Two strains of canine parvovirus (CPV) were isolated from dogs affected with severe hemorrhagic diarrhoea in Italy. By both antigenic analysis with monoclonal antibodies and PCR characterisation, a type-2b antigenic specificity was predicted. Nevertheless, sequence analysis of the capsid protein-encoding gene revealed one amino acid substitutions, affected position 426 [aspartic acid (Asp) → glutamic acid (Glu)] in a major antigenic site of the viral capsid. Considering that the amino acid in 426-position has a strategic role in CPV2 evolution, the two isolates may be considered as CPV2c variant.

INTRODUZIONE

All'inizio degli anni '70 una nuova malattia infettiva del cane caratterizzata da gastroenterite e miocardite, si diffuse in tutto il mondo. L'osservazione al microscopio elettronico dei campioni di feci e dei tessuti dei cuccioli ammalati, mise in evidenza un parvovirus che, successivamente, fu isolato sia su linee cellulari di gatto che di cane (Kelly, 1978; Appel et al., 1979; Burtonboy et al., 1979; Johnson and Spradbrow, 1979). Il virus, chiamato parvovirus del cane tipo 2 (CPV2) per distinguerlo dal parvovirus tipo 1 (CPV1) o virus minuto del cane (MVC) precedentemente descritto quale patogeno dei cuccioli neonati, risultò antigenicamente e genomicamente non correlato a quest'ultimo (Carmichael and Binn, 1981; Carmichael et al., 1994). L'analisi della sequenza di CPV2 ha messo in evidenza la sua stretta correlazione con il virus della panleucopenia felina (FPLV), dal quale è presumibilmente originato, e con il parvovirus del procione, della volpe artica e del visone (Truyen et al., 1995; Parrish, 1999). CPV è un virus a DNA monocatenario con polarità negativa di circa 5200 nucleotidi, a simmetria icosaedrica, il cui capsidico, di 26 nm di diametro, è rappresentato dalla combinazione di due proteine VP1 e VP2. La fre-

quenza con cui il genoma di CPV va incontro a mutazioni non è stata determinata, tuttavia, poiché il DNA del parvovirus replica utilizzando la DNA polimerasi della cellula ospite (Cotmore and Tattersall, 1987) che ha basse percentuali di errore, le mutazioni del genoma virale che possono alterare le sue proprietà biologiche si verificano piuttosto raramente. Approssimativamente la percentuale temporale di mutazione varia da 1×10^{-4} a 4×10^{-4} /nucleotidi/anno (Parrish et al., 1991; Truyen et al., 1995).

Intorno agli anni 1979-1980, con l'impiego degli anticorpi monoclonali (MoAbs), è stata identificata una variante antigenica di CPV chiamata CPV2a (Parrish et al., 1985; 1991). Verso la metà degli anni '80 il virus ha ulteriormente subito delle modificazioni antigeniche, dando origine alla nuova variante CPV2b (Parrish et al., 1991). Attualmente le varianti CPV2a e CPV2b hanno completamente sostituito l'originale CPV2, distribuendosi in maniera differente nella popolazione canina mondiale (Mochizuki et al., 1993; De Ybanez et al., 1995; Greenwood et al., 1996; Truyen et al., 1996; 2000; Steinel et al., 1998; 2000; Sagazio et al., 1998; Buonavoglia et al., 2000; Pereira et al., 2000). Le varianti antigeniche CPV2a e CPV2b differiscono dall'originale tipo antigenico CPV2 in 5 o 6 aminoacidi della proteina VP2, mentre la variante CPV2b differisce da CPV2a solo in due posizioni aminoacidiche: una in posizione 426 [asparagina (Asn) → acido aspartico (Asp)] e una in posizione 555 [isoleucina (Ile) → valina

(Val)] (Parrish et al., 1991). L'aminoacido 426 è localizzato in uno dei maggiori siti antigenici (epitopo A) e la sostituzione Asn → Asp non solo differenzia CPV2b da CPV2 e CPV2a, ma anche da FPV e MEV. Diversamente l'aminoacido in posizione 555 risiede in un sito antigenico minore e la mutazione Ile → Val rappresenta una reversione verso l'originale tipo antigenico CPV2 (Parrish et al., 1991; Agbandje et al., 1995; Strassheim et al., 1994).

Dopo la rapida diffusione nella popolazione canina delle varianti antigeniche CPV2a e CPV2b, non sono state segnalate ulteriori evoluzioni antigeniche. A parte poche eccezioni (Ikeda et al., 2000; Steinel et al., 2000; Truyen et al., 2000), l'analisi dei ceppi CPV2 isolati negli ultimi 15 anni, tanto dai carnivori domestici quanto dai selvatici, ha dimostrato che sia CPV2a che CPV2b hanno conservato la configurazione antigenica del tipo originale descritto da Parrish et al. (1985; 1991).

Nella presente nota è descritta la caratterizzazione antigenica e genomica di due stipti "atipici" CPV2b isolati in Italia durante l'anno 2000, da campioni di feci di due cani con enterite emorragica.

MATERIALI E METODI

Casi clinici e isolamento virale

Due cani, rispettivamente di 2 anni (56/00) e due mesi (136/00) di età, sono stati sottoposti a visita clinica agli inizi dell'anno 2000 in quanto presentavano una grave gastroenterite emorragica. I campioni di feci di entrambi i soggetti sono stati diluiti 1:10 (p/v) in tampone salino fosfato (pH 7,2), e centrifugati a 3000 rpm per 30' alla temperatura di +4°C. Per la ricerca di CPV2 è stato effettuato il test di emoagglutinazione (EA) utilizzando globuli rossi di suino all'1% a +4°C. Le sospensioni di feci, dopo trattamento con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomina, 10 µg/ml anfotericina) sono state seminate su colture cellulari di cane in linea continua A-72 coltivate in terreno minimo essenziale di Dulbecco (DMEM) arricchito con il 10% di siero fetale bovino. La crescita virale sui monostrati cellulari infetti è stata monitorata con il test EA e il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando un siero di cane positivo per CPV.

Caratterizzazione antigenica

La caratterizzazione antigenica degli isolati è stata effettuata con il test di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) utilizzando un panel di 4 anticorpi monoclonali (A4E3, B4A2, C1D1 e B4E1) gentilmente forniti dal prof. C.R. Parrish (Cornell University, Ithaca, NY). L'analisi con gli anticorpi monoclonali è stata effettuata sia sulla sospensione dei campioni di feci che sui virus isolati dopo 1, 3 e 5 passaggi su cellule.

Caratterizzazione mediante PCR e analisi di sequenza

Per la caratterizzazione antigenica dei due ceppi 56/00 e 136/00 è stata anche eseguita la polymerase chain reaction

(PCR) secondo quanto riportato da Pereira et al. (2000) e Senda et al. (1995). Sono state utilizzate diverse coppie di primers: *Pabs/Pabas*, che riconoscono le varianti CPV2a e CPV2b, *P2s/P2as*, che riconoscono l'originale tipo antigenico CPV2, e *Pbs/Pbas*, che riconoscono selettivamente la variante CPV2b. La PCR è stata effettuata tanto sui campioni di feci che sui virus isolati dopo 1, 3 e 5 passaggi su cellule.

Per l'analisi di sequenza due coppie di primers, *Hfor/Hrev* (5'-CAGGTGATGAATTTGCTACA-3'/5'-CATTGGATAAACTGGTGGT-3') e *555for/555rev* (5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3'/5'-GGTGC-TAGTTGATATGTAATAACA-3'), sono state appositamente selezionate per amplificare un largo frammento del gene che codifica per la proteina capsidica di CPV comprensivo di almeno 6-7 aminoacidi in cui risiedono importanti caratteristiche biologiche del virus, come la specificità antigenica, lo spettro d'ospite *in vitro* e l'attività emoagglutinante. Gli amplificati sono stati quindi purificati su colonnine *Ultrafree* (Amicon, Millipore, Bedford) e sottoposti a sequenziamento diretto per due volte mediante ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, Applied Biosystem, Europe). Per il confronto delle sequenze sono state selezionate, nel database, diverse sequenze di ceppi CPV2 (CPV-b, M38245, CPV-Norden, M19296), CPV2a (CPV-15, M24003, CPV-31, M24000), CPV2b (CPV-39, M74849, CPV-133, M-74852).

Analisi con enzimi di restrizione

Per la rapida identificazione delle varianti 2c senza effettuare il sequenziamento degli amplificati, gli amplificati di 583bp ottenuti con la coppia di primers *555for/555rev*, sono stati sottoposti a digestione con l'endonucleasi di restrizione *MboII* che riconosce selettivamente la sequenza GAAGA(N)₈ presente solo nei ceppi 56/00 e 136/00 in posizione nucleotidica 4062-4066.

RISULTATI

I ceppi 56/00 e 136/00 sono stati caratterizzati come CPV2b sia con il test di IEA che con la PCR. Tuttavia, il confronto con le sequenze dei classici CPV2, CPV2a e CPV2b ha messo in evidenza, in entrambi i ceppi, due variazioni aminoacidiche, una in posizione 297 [serina (Ser) → alanina (Ala)], e l'altra, più importante, in posizione 426 [acido aspartico (Asp) → acido glutammico (Glu)]. Entrambe le variazioni sono il risultato della sostituzione di un unico nucleotide, T in G in posizione 3674 e T in A in posizione 4064. L'analisi comparativa effettuata con FASTA e BLASTA ha messo in evidenza che la sostituzione in posizione 297 (Ser → Ala) è stata recentemente messa in evidenza in ceppi isolati in diverse parti del mondo (Truyen et al., 2000). Diversamente la sostituzione in posizione 426 (Asp → Glu) non è mai stata riportata sia nei ceppi CPV che in altri parvovirus correlati. Inoltre, la Glu in posizione 426 determina la sostituzione di un residuo unico di CPV2b situato in un sito antigenico maggiore (epitopo A) della proteina capsidica (Parrish et al., 1991; Parrish, 1994; Agbandje et al., 1995). La caratterizzazione antigenica e genomica effettuata sui virus dopo passaggi

seriali in colture cellulari, ha confermato le modificazioni osservate sui campioni originali.

Gli amplificati PCR, pari a 583bp, ottenuti con la coppia di primers 555for/555rev e digeriti con l'enzima *MboII* hanno generato due frammenti di 500 e 80bp solo nei ceppi isolati 56/00 e 136/00, permettendo così di distinguere questi dai classici CPV2b.

DISCUSSIONE

I campioni di feci 56/00 e 136/00 sono stati raccolti nell'anno 2000 in tempi diversi e in due differenti cliniche veterinarie. Questo aspetto può far ipotizzare che ceppi CPV con mutazioni simili a quelle osservate nei campioni 56/00 e 136/00 siano circolanti in Italia già dagli inizi del 2000. La sostituzione dell'aminoacido 426-Asp → Glu rappresenta un evento importante nella dinamica evolutiva di CPV e permette di classificare gli stipti 56/00 e 136/00 come variante CPV2c.

Dopo pochi anni dall'identificazione di CPV2, le due varianti antigeniche CPV2a e CPV2b hanno completamente sostituito l'originale tipo antigenico CPV2. Le due varianti attualmente coesistono nella popolazione canina, anche se con una diversa distribuzione nelle diverse nazioni. In Italia la variante CPV2a è prevalente rispetto a CPV2b (Sagazio et al., 1998; Buonavoglia et al., 2000) e, presumibilmente, anche la nuova variante CPV2c coesiste con le altre varianti antigeniche.

L'aspetto di maggior interesse è che tutti i test diagnostici correntemente utilizzati in laboratorio per differenziare gli stipti CPV, non riescono a mettere in evidenza la variante CPV2c con la sostituzione dell'aminoacido in posizione 426. La differenziazione tra CPV2a e CPV2b con i MoAbs si basa infatti su un unico MoAb (B4A2) che riconosce solo CPV2a, dal momento che la sostituzione 426-Asp → Glu altera l'epitopo riconosciuto da quel MoAb (Parrish et al., 1991). La tipizzazione come 2b è quindi fornita da una mancata reattività del MoAb. Questo dato può spiegare perché, al momento, non si hanno altre segnalazioni di isolamento di variante CPV con la sostituzione dell'aminoacido 426-Asn → Asp e permette di ipotizzare che, mediante analisi di sequenza o esami con l'enzima di restrizione *MboII*, stipti CPV recentemente isolati e caratterizzati come 2b con i MoAbs e la PCR, possano risultare variante 2c, confermando una più ampia distribuzione della stessa.

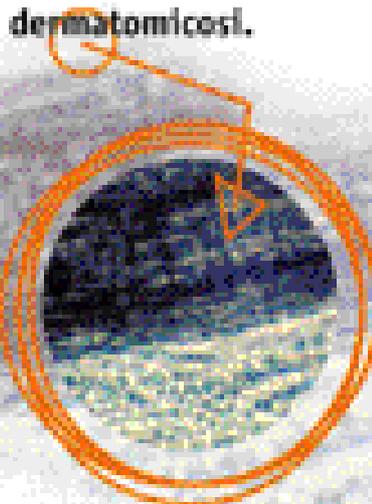
L'evoluzione antigenica di CPV2 pone diversi intriganti quesiti sul ruolo patogeno delle varianti (modificazioni dello spettro d'ospite, aumentata virulenza, ecc.) e, soprattutto, sulla capacità dei "vecchi" vaccini, preparati cioè con lo stipte originale CPV2, di assicurare una buona protezione anche nei confronti delle varianti.

Questo aspetto è stato molto dibattuto e, a fronte di posizioni scientifiche che sostenevano la perfetta capacità dei vaccini di conferire protezione anche nei confronti delle varianti (Appel and Carmichael, 1987; Greenwood et al., 1995), recentemente (Pratelli et al., 2000) è stato dimostrato che cuccioli vaccinati con lo stipte originale (attualmente in uso) sviluppano un alto grado di immunità solo nei confronti del virus omologo (vaccinale). In altri termini, i titoli anticorpali nei confronti della variante CPV2b

Il trattamento delle dermatomicosi

Soluzione antimicotica

Indicato per il trattamento ed il controllo delle dermatomicosi.



Disponibile in farmacia

confezione da 100 ml



marchio registrato

Imaverol

 JANSSEN-CILAG LAB

Milano

Via Michelangelo Buonarroti, 23 • 20093
Cologno Monzese • Tel. 0225103 • Fax 0226708196

sono significativamente inferiori rispetto a quelli verso il virus presente nel vaccino.

Tenendo presente che lo stipo originale CPV2 non circola più nella popolazione canina, questi dati hanno sollevato serie perplessità circa la reale capacità protettiva dei vaccini tradizionali nei confronti delle varianti.

In effetti in USA sono da tempo in commercio vaccini per la parvovirosi del cane allestiti con le varianti 2a e 2b.

L'isolamento di due stipiti con le caratteristiche genomiche ulteriormente modificate, amplia il dibattito scientifico sulle capacità di evoluzione genetica del parvovirus del cane e sul significato biologico, patogenetico ed immunologico che può assumere una nuova variante antigenica.

Riveste quindi particolare importanza conoscere la reale diffusione della nuova variante nella popolazione canina e valutare le sue caratteristiche biologiche ed antigeniche con particolare riferimento allo spettro d'ospite e alle correlazioni immunologiche con gli stipiti vaccinali attualmente in uso.

Parole chiave

Parvovirus, cane, variante.

Key words

Parvovirus, dog, variant.

Bibliografia

- Kelly WR: An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.* 54: 593, 1978.
- Appel MJG, Scott WF, Carmichael LE: Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105: 156-159, 1979.
- Burtonboy G, Coignoul F, Pastoret PP, Delferriere N: Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol.* 61: 1-11, 1979.
- Johnson RH, Spradbrow PB: Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.* 55: 151, 1979.
- Carmichael LE, Binn LN: New enteric diseases in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25: 1-37, 1981.
- Carmichael LE, Schlafler DH, Hashimoto A: Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 165-174, 1994.
- Truyen U, Grunberg A, Chang SF, et al: Evolution of the feline-subgroup of parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69: 4702-4710, 1995.
- Parrish CR: Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69: 29-40, 1999.
- Cotmore SF, Tattersall P: The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33: 91-174, 1987.
- 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.
- Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE: Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230: 1046-1048, 1985.
- Mochizuki M, Harasawa R, Nakatani H: Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38: 1-10, 1993.
- De Ybanez RR, Vela C, Cortes E, et al: Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136: 174-175, 1995.
- Greenwood NM, Chalmers WSK, Baxendale W, Thompson H: Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme-analysis. *Vet. Rec.* 138: 495-496, 1996.
- 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 antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz Arch. Tierheilkd* 142: 115-119, 2000.
- Steinel A, Venter EH, Van Vuuren M, et al: Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65: 239-242, 1998.
- Steinel A, Munson L, van Vuuren M, Truyen U: Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J. Gen. Virol.* 81: 345-350, 2000.
- Sagazio P, Tempesta M, Buonavoglia D, et al: Antigenic characterisation of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73: 197-200, 1998.
- Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, et al: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Microbiologica* 23: 93-96, 2000.
- 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.
- Agbandje M, Parrish CR, Rossmann MG: The recognition of parvovirus capsids by antibodies. *Semin. Virol.* 6: 219-231, 1995.
- Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, et al: Two dominant neutralizing antigen determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184, 1994.
- Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, et al: Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278: 13-19, 2000.
- Senda M, Parrish CR, Harasawa R, et al: Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 33: 110-113, 1995.
- Parrish CR: The emergence and evolution of canine parvovirus of canine parvovirus - an example of recent host range mutations. *Semin. Virol.* 5: 121-132, 1994.
- Appel MJG, Carmichael LE: Can a commercial vaccine protect pups against a recent isolate of canine parvovirus? *Vet. Med.* 10: 1091-1093, 1987.
- Greenwood NM, Chalmers WS, Baxendale W, et al: Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 136: 63-67, 1995.
- 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 vaccines. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (3): 612-615, 2001.