

LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA PARVOVIRUS DEL CANE TRA STORIA E ATTUALITÀ

COSTANTINA DESARIO¹, MARCO CAMPOLO¹, ALESSANDRA CAVALLI¹,
ELEONORA LORUSSO¹, DONATO NARCISI¹, GABRIELLA ELIA¹, ALESSIO LORUSSO¹,
VITO MARTELLA¹, NICOLA DECARO¹, CANIO BUONAVOGLIA¹

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

Riassunto

Si riportano i risultati del confronto tra metodiche tradizionali ed innovative per la identificazione e la caratterizzazione del parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2). Campioni di feci raccolti da cani con diarrea sono stati analizzati mediante test immunocromatografico (IC), emoagglutinazione (EA), isolamento su cellule, *polymerase chain reaction* (PCR) e real-time PCR con sonda TaqMan. Degli 89 campioni testati, 41 sono risultati positivi al test IC, 50 in EA, 54 mediante isolamento su cellule, 68 in PCR e 73 in real-time PCR. La caratterizzazione degli stipti CPV-2 è stata effettuata mediante inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) con anticorpi monoclonali, analisi di restrizione dei prodotti PCR (PCR-RFLP), analisi di sequenza e real-time PCR con sonde basate sulla tecnologia *minor groove binder* (MGB). I test real-time con sonde MGB si sono dimostrati molto affidabili (concordanza del 100% rispetto ai risultati combinati delle altre tecniche di tipizzazione), permettendo una caratterizzazione rapida ed altamente specifica delle varianti CPV-2. Mediante analisi con sonde MGB dei 68 campioni risultati positivi in PCR, 26 campioni sono stati caratterizzati come CPV-2a, 18 come CPV-2b e 24 come CPV-2c. Inoltre, dei 5 campioni risultati negativi in PCR e positivi al test real-time PCR con sonda TaqMan, 3 sono risultati stipti 2a e 2 sono stati tipizzati come 2c.

Summary

Conventional and innovative methods were employed for the detection and characterization of canine parvovirus type 2 (CPV-2). Fecal samples collected from dogs with diarrhea were analyzed by immunochromatographic (IC) test, hemagglutination (HA), virus isolation on cell cultures, polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan real-time PCR. Out of 89 specimens tested, 41, 50, 54, 68 and 73 samples tested positive by IC test, HA, virus isolation, PCR and TaqMan real-time PCR, respectively. CPV-2 characterization was carried out by means of hemagglutination inhibition (HI) with monoclonal antibodies, PCR-restriction fragment polymorphism length (PCR-RFLP) and real-time PCR using minor groove binder (MGB) probe technology. The MGB probe assay were found highly reliable (100% concordance with the results of the combined conventional methods), allowing rapid and unambiguous typing of the CPV-2 variants. By MGB probe assay carried out on the 68 PCR-positive specimens, 26 samples were characterized as type 2a, 18 as type 2b and 24 as type 2c. MGB analysis of the 5 samples tested negative by conventional PCR and positive by TaqMan PCR showed that 3 samples contained type-2a DNA and 2 samples contained type-2c DNA.

INTRODUZIONE

A circa 30 anni dalle prime segnalazioni la parvovirosi rappresenta, ancora oggi, una delle più importanti infezioni virali del cane. Caratterizzata da una grave sintomatologia gastroenterica^{1,2,3}, si osserva più frequentemente in cuccioli di età compresa tra 45 giorni e 3 mesi.

L'agente eziologico è il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2), antigenicamente non correlato al parvovirus del cane tipo 1 (CPV-1) o virus minuto del cane (MVC), isolato da

Binn nel 1970⁴. CPV-2 è un virus a DNA monocatenario, privo di envelope e molto resistente nell'ambiente. Il capsido, a simmetria icosaedrica, è costituito da una combinazione di due proteine, VP1 e VP2, prodotte mediante *splicing* alternato a partire dallo stesso mRNA⁵.

CPV-2 è strettamente correlato ad altri parvovirus dei carnivori, come il parvovirus della panleucopenia felina (FPLV), il parvovirus dell'enterite del visone (MEV)⁶ il parvovirus del procione (RPV) e, insieme a questi, è stato inserito nel sottogruppo dei parvovirus felini (FPV)⁷.

Circa l'origine di CPV-2 sono state avanzate diverse ipotesi, ma la più accreditata ipotizza che CPV-2 derivi da un processo di mutazione naturale di FPLV attraverso un passaggio intermedio in carnivori selvatici⁸.

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 6/11/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 2/3/2006.

CPV-2 è un patogeno in continua evoluzione antigenica. Infatti, nel 1985 Parrish⁹, mediante l'impiego di anticorpi monoclonali (MoAbs) e l'analisi con gli enzimi di restrizione, ha dimostrato che l'originale tipo antigenico era stato sostituito, tra il 1979 e il 1981, da una variante antigenica, definita CVP-2a, e che, intorno al 1984, era comparsa una seconda variante antigenica, denominata CPV-2b, diversa dalla precedente per la sostituzione di un aminoacido in posizione 426 della proteina VP2 (Asn → Asp, Tab. 1). Queste nuove varianti, a differenza del ceppo originario, hanno acquisito la capacità di replicare e indurre malattia anche nel gatto^{10,11,12}.

Attualmente il tipo originario CPV-2 non circola più nella popolazione canina, ma è presente solo nei vaccini. Le due varianti sono invece variamente distribuite su scala mondiale^{13,14,15,16,17,18,19,20}.

Nel 2001 è stata identificata in Italia una nuova variante che differisce dagli stipiti "classici" 2b per la sostituzione del residuo Asp-426 con Glu (Tab. 1)²¹. Questa variante, designata come CPV-2 mutante Glu-426, è stata ripetutamente segnalata in Italia^{22,23,24,25} e, recentemente, è stata anche identificata in Vietnam²⁶. La messa a punto di MoAbs in grado di differenziare gli stipiti Glu-426 dai classici stipiti CPV-2b²⁶ ha permesso di definire questa mutante come nuova variante antigenica, per la quale è stata proposta la denominazione di CPV-2c^{27,28}.

La diagnosi clinica di parvovirosi del cane non è sempre facile da formulare, tenendo presente che altre patologie di origine virale o batterica possono determinare sintomi più o meno sovrapponibili.

A questo si aggiunge che, molto spesso, i cani possono presentare forme subcliniche o completamente asintomatiche, pur eliminando il virus con le feci. La diagnosi di laboratorio è quindi indispensabile come supporto alla diagnosi clinica, ma anche come strumento per poter monitorare eventuali evoluzioni genomiche del virus importanti da un punto di vista epidemiologico, patogenetico e immunologico.

Nella presente nota vengono descritte e messe a confronto le metodiche diagnostiche tradizionali ed innovative utilizzate per la diagnosi e la caratterizzazione degli stipiti CPV-2 in campioni di feci di cani.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

Sono stati esaminati 89 campioni di feci diarroiche di cuccioli, di età compresa tra 45 giorni e 7 mesi, provenienti da diverse regioni d'Italia. Ciascun campione è stato omogenato al 10% (p/v) in soluzione salina tamponata (PBS, pH 7,2) e centrifugato a 1500 x g per 15 min. Il surnatante è stato utilizzato per i test diagnostici.

Tecniche per la identificazione di CPV-2

Test immunocromatografico (IC test)

Il test IC è stato eseguito utilizzando un kit commerciale (SNAP® Canine Parvovirus Antigen Test, IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

Emoagglutinazione (EA)

Il test EA è stato allestito in piastre a 96 pozzetti con fondo a V, effettuando diluizioni per raddoppio del surnatante di ciascun omogenato di feci, a partire dalla diluizione 1:2. In ciascun pozzetto è stato aggiunto un eguale volume di una sospensione di globuli rossi di suino allo 0,8% contenente l'1% di siero fetale bovino (SFB).

La lettura dei risultati è stata effettuata dopo due ore d'incubazione a +4°C.

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

...Posizione nucleotidica ..Codone osservato	Variazioni aminoacidiche al residuo ^a							
	87	101	297	300	305	375	426	555
	3045-3047	3087-3089	3675-3677	3684-3686	3699-3701	3909-3911	4062-4064 ^b	4449-4451 ^b
	ATG (Met)	ATT (Ile)	TCT (Ser)	GCT (Ala)	GAT (Asp)	AAT (Asn)	AAT (Asn)	GTA (Val)
	TTG (Leu)	ACT (Thr)	GCT (Ala)	GGT (Gly)	TAT (Tyr)	GAT (Asp)	GAT (Asp)	ATA (Ile)
							GAA (Glu)	
CPV-2	Met	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val
CPV-2a	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asn	Ile
CPV-2b	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
Nuovi CPV-2b	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
Nuovi CPV-2a	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Asn	Val
Asp-300 (CPV-2a/CPV-2b)	Leu	Thr	Ala	Asp	Tyr	Asp	Asn	Val
							Asp	
CPV-2c	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Glu	Val

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

^b Nucleotidi inclusi nel frammento amplificato dai primer 555for/555rev e dalle sonde MGB tipo-specifiche.

Isolamento su cellule

Per le prove di isolamento *in vitro*, il surnatante di ciascun campione è stato trattato con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 µg/ml streptomina, 10 µg/ml amfotericina B) per 30 min a 37°C ed inoculato su cellule A-72 (fibroma di cane) appena tripsinizzate, coltivate in terreno minimo essenziale di Dulbecco (D-MEM) con l'aggiunta del 5% di SFB. Dopo 5 giorni di incubazione a 37°C, le cellule inoculate sono state tripsinizzate e rimesse in coltura, allestendo, in parallelo, vetrini per le prove di immunofluorescenza indiretta (IFI).

Il test IFI è stato eseguito dopo ulteriori 5 giorni di incubazione a 37°C, utilizzando un siero di cane positivo per CPV-2 ed un siero anti-IgG di cane marcato con isotiocianato di fluorosceina (Sigma Aldrich srl, Milano).

I campioni positivi sono stati amplificati su cellule in modo da ottenere uno stock virus da utilizzare nelle altre prove diagnostiche.

Polymerase chain reaction (PCR)

Per le prove di PCR, il DNA virale è stato estratto mediante bollitura per 10 min del surnatante di ciascun campione, in modo da inattivare gli inibitori della DNA polimerasi eventualmente presenti nelle feci²⁹.

Gli estratti sono stati diluiti ulteriormente 1:10 in acqua bidistillata sterile per ridurre gli eventuali residui di inibitori a concentrazioni inefficaci²³.

La PCR è stata eseguita con la coppia di *primer* 555for/555rev²¹, in grado di amplificare un frammento di 583 bp del gene della proteina capsidica di CPV-2 (Tab. 2).

Real-time PCR con sonda TaqMan

Gli stessi estratti utilizzati per le prove PCR sono stati analizzati in un test di real-time PCR in grado di riconoscere tutte le varianti di CPV-2, in quanto sia i *primer* che la sonda TaqMan si legano ad una regione molto conservata del genoma virale²³.

Come DNA standard è stato utilizzato il plasmide pGEM®-3Z (Promega U.S., Madison, WI, USA) contenente quasi l'intero genoma (5076 nucleotidi) di uno stipite CPV-2, gentilmente fornito da C. R. Parrish (Cornell University, Ithaca, NY, USA). In ciascuna reazione sono stati analizzati, simultaneamente ed in duplicato, le diluizioni logaritmiche del DNA standard (contenenti da 10⁹ a 10² copie di DNA plasmidico/10 µl) ed i DNA estratti dai campioni fecali, in modo da assicurare una corretta quantificazione del DNA virale.

Un controllo interno esogeno, costituito da 5000 copie del DNA dell'herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2)³⁰ per ml di sospensione fecale, è stato aggiunto a ciascun campione prima della estrazione del DNA virale ed è stato amplificato utilizzando il protocollo messo a punto da Hüseyin et al.³¹

l'otologico
di
prima
scelta

MARCHIO REGISTRATO

● **Potente azione
antimicotica e
battericida su
gram + e gram -**

● **Basso rischio
di resistenza
e non ototossico**

● **Attività acaricida**

● **Azione rapida:
remissione dei
sintomi in soli
7 giorni**



Via M. Buonarroti, 23
Cologno Monzese - MI

JANSSEN
Divisione della Janssen-Cilag SpA

Tabella 2
Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati nel presente studio

Test	Primer/sonda	Sequenza (5'-3')	Polarità	Specificità	Posizione	Ampiezza amplificata
PCR convenzionale ^a	555-for 555-rev	CAGGAAGATATCCAGAAGGA GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA	+ -	Tutte le varianti	4003-4022 ^d 4561-4585 ^d	583 bp
Real-time PCR con sonda TaqMan ^b	CPV-For CPV-Rev CPV-Pb	AAACAGGAATTAACATACTAATATATTTA AAATTTGACCATTGGGATAAACT FAM - TGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTACC - TAMRA	+ - +	Tutte le varianti	4104-4135 ^d 4176-4198 ^d 4143-4172 ^d	93 bp
Test MGB specifico per le varianti 2a/2b ^c	CPVa/b-For CPVa/b-Rev CPVa-Pb CPVb1-Pb	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA CCAATTGGATCTGTTGGTAGCAATACA VIC - CTTCCTGTAACAAATGATA - MGB FAM - CTTCCTGTAACAGATGATA - MGB	+ - + +	Tutte le varianti CPV-2a CPV-2b	1719-1744 ^{e,f} 1785-1811 ^{e,f} 1765-1783 ^e 1765-1783 ⁱ	93 bp
Test MGB specifico per le varianti 2b/2c ^c	CPVb/c-For CPVb/c-Rev CPVb2-Pb CPVc-Pb	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA ATGCAGTTAAAGGACCATAAGTATTAATATATTAGTAGTTAATTC FAM - CCTGTAACAGATGATAAT - MGB VIC - CCTGTAACAGAAGATAAT - MGB	+ - + +	Tutte le varianti CPV-2b CPV-2c	1721-1748 ⁱ 1155-1182 ^g 1823-1870 ^f 1257-1304 ^g 1768-1785 ⁱ 1202-1219 ^g	150 bp

^a Amplificazione per il test PCR-RFLP.

^b 23.

^c 27,28.

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

Tecniche per la caratterizzazione di CPV-2

Caratterizzazione antigenica

Gli stipiti CPV-2 con titolo EA $\geq 1:64$ (surnatante dell'omogenato del campione di feci o surnatante delle colture cellulari inoculate) sono stati sottoposti a tipizzazione antigenica utilizzando il test di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) mediante impiego di un panel di 5 MoAbs (A4E3, B4A2, C1D1, B4E1, 21C3)^{6,26}. In base alla reattività di ciascun MoAb, è stato possibile tipizzare gli stipiti virali come CPV-2, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c.

Analisi di restrizione e di sequenza

Tutti i campioni risultati positivi in PCR e negativi o con basso titolo in EA ($\leq 1:32$), pertanto non tipizzabili con MoAbs, sono stati sottoposti ad analisi genetica mediante tecnica PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), secondo quanto descritto in precedenza^{21,22}. Gli amplificati ottenuti con la coppia di primer 555for/555rev sono stati tagliati con l'enzima di restrizione *Mbo*II, che riconosce selettivamente la sequenza GAAGA (nucleotidi 4062-4066) presente solo nella variante CPV-2c. Gli amplificati digeriti generano due frammenti di 500 e 80 bp solo nei ceppi 2c^{21,22} che possiedono, nel tratto di genoma amplificato, il sito di taglio per l'enzima.

I campioni non riconosciuti come CPV-2c mediante PCR-RFLP sono stati sottoposti ad analisi di sequenza in modo da stabilire la specificità 2a o 2b. Gli amplificati PCR sono stati purificati su colonnine DA (Amicon, Milli-

pore, Bedford, USA) e sottoposti a sequenziamento diretto (Genome Express, Meylan, Francia). Le sequenze ottenute sono state confrontate con analoghe sequenze di stipiti CPV-2 disponibili in banche dati accessibili on-line.

Real-time PCR con sonde MGB

Gli estratti DNA sono stati anche analizzati mediante due test real-time PCR basati sulla tecnologia *minor groove binder* (MGB), recentemente messi a punto da Decaro et al.^{27,28} per la caratterizzazione degli stipiti CPV-2. Le sonde MGB sono sonde TaqMan costituite da sequenze oligonucleotidiche molto corte in modo da aumentare la specificità, consentendo l'appaiamento solo su sequenze nucleotidiche perfettamente complementari. L'aggiunta di un gruppo chimico MGB a tali sonde assicura una maggiore stabilità termodinamica del complesso sonda-target, riducendo la dissociazione della sonda dalla sequenza complementare, che sarebbe altrimenti inevitabile³². Le sonde MGB, contrariamente alle sonde TaqMan tradizionali, permettono la discriminazione dei *single nucleotide polymorphism* (SNP), per cui, pur essendo originariamente destinate alla discriminazione allelica, trovano una buona applicazione nella genotipizzazione dei virus. Utilizzando primer comuni e sonde genotipo-specifiche marcate con differenti fluorofori (FAM e VIC) è possibile valutare (ed eventualmente quantificare) la presenza dell'acido nucleico di due differenti genotipi virali nei campioni biologici.

Due diversi test MGB sono stati messi a punto utilizzando primer e sonda specifici per le varianti 2a e 2b (test 2a/2b) o per le varianti 2b e 2c (test 2b/2c). I DNA stan-

dard per le varianti 2a, 2b e 2c sono stati ottenuti da campioni di campo contenenti elevati titoli di DNA virale (circa 10^{10} - 10^{11} copie di DNA/mg di feci).

RISULTATI

I risultati ottenuti con i 5 test utilizzati per la ricerca di CPV-2 nei campioni fecali sono riassunti nella Tabella 3. Degli 89 campioni testati, 41 sono risultati positivi al test IC e 9 ulteriori campioni (in totale 50) sono risultati positivi al test EA, 33 con titoli $\geq 1:64$ e 17 con titoli $\leq 1:32$. Le prove su cellule hanno permesso di isolare CPV-2 da 54 campioni di cui 50 erano risultati positivi al test EA e 4 campioni erano risultati negativi.

Mediante PCR convenzionale, sono risultati positivi per CPV-2 68 campioni comprendenti i 54 campioni risultati positivi alle prove di isolamento. In real-time PCR sono risultati positivi 73 degli 89 campioni esaminati. Nei campioni con elevato titolo EA sono state evidenziate quantità di DNA virale comprese tra $1,63 \times 10^7$ e $7,43 \times 10^{11}$ copie/mg di feci. Come già dimostrato²³, non si è avuta alcuna inibizione dell'amplificazione durante la reazione di real-time PCR, poiché tutti i campioni nei quali era stato aggiunto il controllo interno prima dell'amplificazione, hanno prodotto valori di C_T inferiori al valore soglia di 34,25.

I risultati delle metodiche classiche ed innovative utilizzate per la tipizzazione degli stipiti CPV-2 sono riassunti nella Tabella 4. La caratterizzazione mediante MoAbs, eseguita su un totale di 54 campioni, ha fornito i seguenti risultati: 24 campioni sono stati caratterizzati come CPV-2a, 16 come CPV-2b e 14 come CPV-2c.

Mediante PCR-RFLP eseguita sui 14 campioni risultati negativi in EA e alle prove di isolamento, ma positivi in PCR, 10 campioni sono stati tagliati dall'enzima *MboII* e sono stati caratterizzati come CPV-2c, mentre, con l'analisi di sequenza degli amplificati non digeriti dall'enzima, 2 sono stati tipizzati come CPV-2b e 2 come CPV-2a.

Il test con sonde MGB effettuato sui 68 campioni PCR positivi ha identificato 26 stipiti 2a, 18 stipiti 2b e 24 stipiti 2c, mostrando una concordanza del 100% rispetto ai risultati combinati dei tre test classici (IEA con MoAbs, PCR-RFLP ed analisi di sequenza). Inoltre, dei 5 campioni risultati negativi in PCR e positivi al test real-time PCR con sonda TaqMan, 3 sono risultati stipiti 2a e 2 sono stati

Tabella 3
Risultati dei 5 test diagnostici utilizzati per la ricerca di CPV-2 in 89 campioni fecali

Campioni	IC	EA	VI	PCR ^a	Real-time ^b
Positivi	41	50	54	68	73
Negativi	48	39	35	21	16

^a 11.

^b 23.

IC, test immunocromatografico; EA, emoagglutinazione; VI, isolamento su colture cellulari.

tipizzati come 2c. In totale, mediante analisi con sonde MGB dei 73 campioni, nei quali il DNA di CPV-2 è stato evidenziato con sonda TaqMan PCR, 29 sono stati riconosciuti come CPV-2a, 18 come CPV-2b e 26 come CPV-2c.

DISCUSSIONE

Una diagnosi rapida e affidabile di infezione da CPV-2 è importante specialmente nei canili e negli allevamenti in quanto si ha la possibilità di isolare i soggetti infetti limitando la diffusione dell'infezione. I risultati del presente studio hanno evidenziato che non sempre è facile ottenere questo risultato poiché molti test attualmente utilizzati hanno bassa sensibilità.

L'IC è un test rapido, di facile esecuzione e viene comunemente utilizzato nella pratica clinica³³; la positività al test è tuttavia fortemente legata al titolo virale presente nel campione di feci. L'EA e le prove di isolamento *in vitro* presentano un grosso limite in quanto possono essere eseguite solo in laboratori specializzati. L'approvvigionamento di eritrociti freschi richiede la disponibilità di suini donatori, con tutte le difficoltà connesse al mantenimento di questi animali. Inoltre, per una precisa lettura del test EA occorre impiegare eritrociti di buona qualità, prelevati da maiali in ottimo stato di salute. Se si considera che talvolta circolano ceppi CPV-2 non emoagglutinanti^{34,35}, aumentano le possibilità di avere risultati falsi negativi. Nonostante ciò, il test è di facile esecuzione, permette di processare più campioni contemporaneamente e di ottenere i risultati in tempi rapidi (2-4 ore).

Tabella 4
Caratterizzazione dei ceppi CPV-2 mediante MoAbs, RFLP, analisi di sequenza e real-time PCR con sonde MGB

Specificità	MoAbs (54) ^a	PCR-RFLP ^b (14) ^a	Analisi di sequenza (4) ^{a,c}	Test MGB su campioni PCR+ (68) ^a	Test MGB su campioni real-time + (73) ^a
CPV-2a	24	NA	2	26	29
CPV-2b	16	NA	2	18	18
CPV-2c	14	10	NE	24	26

^a In parentesi è indicato il numero di campioni testati.

^b Campioni negativi al test EA o con titoli EA $\leq 1:32$.

^c Campioni non tipizzati con PCR-RFLP.

NA, non applicabile; NE, non effettuata.

L'isolamento su colture cellulari richiede personale specializzato, disponibilità di colture cellulari sensibili e, soprattutto, tempi piuttosto lunghi (5-10 giorni) in contrasto con la necessità di dare una risposta diagnostica rapida.

Il più significativo limite delle metodiche tradizionali (test IC, EA, isolamento virale) è rappresentato dalla bassa sensibilità dovuta non solo alla scarsa quantità di virus in alcuni campioni fecali, ma anche alla presenza di elevati titoli anticorpali nel lume intestinale dei cani infetti. Tali anticorpi, complessando il virus, interferiscono con la reazione di EA ed impediscono il legame del virus ai recettori cellulari nelle prove di isolamento. È stato dimostrato, infatti, che in corso di infezione sia naturale³⁶ che sperimentale³⁷, CPV-2 è evidenziabile mediante test EA e/o isolamento su cellule solo per pochi giorni dopo l'infezione. Indagini condotte in precedenza^{23,25}, confermate nel presente studio, hanno infatti evidenziato la bassa correlazione tra EA e real-time PCR: campioni con titoli EA bassi risultano avere titoli di DNA virale elevati e campioni risultati negativi sia al test EA che al test IC possono risultare positivi in real-time PCR.

Tutto ciò permette di affermare che le metodiche di biologia molecolare, messe a punto per la diagnosi di CPV-2, risultano molto più sensibili dei test tradizionali. In particolare la real-time-PCR, caratterizzata da elevata sensibilità, specificità e riproducibilità, rappresenta il *gold test* per la diagnosi di questa infezione^{23,25}.

L'identificazione delle varianti CPV-2 è spesso ardua e richiede l'utilizzo contemporaneo di molteplici test²⁵. La caratterizzazione mediante MoAbs può essere eseguita solo su campioni con titolo emoagglutinante $\geq 1:64$ o su ceppi isolati su cellule. Tuttavia, solo pochi campioni risultati negativi o debolmente positivi al test EA vengono isolati su cellule rendendo così attuabile la caratterizzazione antigenica con i MoAbs. A tale proposito bisogna sottolineare che la non reattività del MoAb B4A2 verso la variante 2b permette di differenziare la stessa dalla variante 2a. Infatti, un epitopo specifico di CPV-2a è riconosciuto dal MoAb B4A2, che però non reagisce con le varianti 2b in quanto queste presentano la sostituzione di Asn-426 con Asp³⁸. La ulteriore mutazione nel residuo 426 (Asp-426 \rightarrow Glu) non permette reattività con lo stesso MoAbs e pertanto gli stipiti 2c vengono erroneamente considerati come CPV-2b²¹. Il nuovo MoAb 21C3²⁶ permette di distinguere la variante 2b dalla variante 2c.

Una strategia alternativa che è stata proposta per la tipizzazione molecolare degli stipiti CPV-2 si basa sull'impiego di set di *primer* tipo-specifici¹⁹. Tuttavia, è già stato osservato³⁹ che tale sistema di genotipizzazione non è attualmente in grado di discriminare tra varianti 2a e 2b, in quanto gli stipiti 2a in circolazione (555-Val)^{20,39} sarebbero caratterizzati erroneamente come 2b (Tab. 1). Inoltre, mediante questa strategia gli stipiti 2c sono riconosciuti come 2b²¹. Per ovviare a questi problemi di caratterizzazione è stato messo a punto un test PCR-RFLP per la differenziazione tra CPV-2b e CPV-2c²¹, ma tale metodica non è in grado di differenziare tra le varianti 2a e 2b, poiché in entrambi i casi i prodotti PCR non sono tagliati dall'enzima *Mbo*II. Pertanto, solo l'analisi di sequenza può individuare in maniera chiara e definitiva la specificità 2a o 2b per quei campioni risultati negativi ai test di EA e PCR-RFLP, con notevole incremento di costi e tempo.

Per superare tali difficoltà sono stati messi a punto due test real-time PCR con sonde MGB, capaci di determinare la specificità di CPV-2 in poche ore e con costi accettabili. D'altronde, l'elevato numero di campioni che possono essere processati contemporaneamente con questo test, compensa i costi accessori e determina un notevole risparmio di tempo e di lavoro e, allo stesso tempo, una riduzione delle cross-contaminazioni conseguenti alle manipolazioni post-PCR.

I numerosi studi condotti su CPV-2 hanno permesso di acquisire molte informazioni sulle caratteristiche genomiche e biologiche di questo virus. Tuttavia, a distanza di circa 30 anni dalla sua scoperta, restano ancora poco chiari alcuni aspetti relativi alla diagnosi e alla patogenesi di questa infezione. La diagnosi di infezione da CPV-2 effettuata con metodiche sensibili e specifiche è diventata ormai un indispensabile supporto per il medico veterinario. Occorre, però, sottolineare che tali metodiche, parallelamente, permettono di effettuare un accurato e costante monitoraggio sulla circolazione delle varianti antigeni che di CPV-2 nella popolazione canina. Si potrà in tal modo valutare l'evoluzione antigenica del virus e le eventuali ripercussioni sulla patogenesi e sulla immunità.

Parole chiave

Parvovirus del cane tipo 2, varianti antigeniche, diagnosi, caratterizzazione.

Key words

Canine parvovirus type 2, antigenic variants, diagnosis, characterization.

Bibliografia

- Kelly WR: An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *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.
- Carmichael LE, Binn LN: New enteric virus in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25: 1-27, 1981.
- Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima A: Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.* 1: 503-508, 1970.
- Reed AP, Jones EV, Miller TJ: Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62: 266-276, 1988.
- Parrish CR, Carmichael LE: Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. *Virology.* 129: 401-414, 1983.
- Berns KI, Bergoin M, Bloom M et al.: Family Parvoviridae. In: *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eds. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM et al. Academic Press, New York, 2000, pp. 311-323.
- Truyen U: Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69: 47-50, 1999.
- Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE: Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230: 1046-1048, 1985.
- Truyen U, Platzer G, Parrish CR: Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec.* 138: 365-366, 1996.
- Sakamoto M, Ishiguro S, Mochizuki M: Experimental infection of canine parvoviruses in cats. *J Jpn Vet Med Assoc* 52: 305-309, 1999.
- Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, et al.: Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 663-668, 2001.

13. 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.
14. De Ybanez RR, Vela C, Cortes E et al: Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136: 174-175, 1995.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A et al.: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23: 93-96, 2000.
19. 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.
20. Wang HC, Chen WD, Lin SL et al.: Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in Taiwan. *Virus Genes* 31: 171-174, 2005.
21. 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.
22. Martella V, Cavalli A, Pratelli A et al.: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1333-1336, 2004.
23. 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.
24. 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* 19:29-33, 2005.
25. Desario C, Decaro N, Campolo M et al.: Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* 121: 179-185, 2005.
26. 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.
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* 52: 316-319, 2005.
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* 133: 92-99, 2006.
29. Schunck B, Kraft W, Truyen U: A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods* 55: 427-433, 1995.
30. Decaro N, Tinelli A, Pratelli A et al.: First two confirmed cases of malignant catarrhal fever in Italy. *New Microbiol.* 26: 339-344, 2003.
31. Hussy D, Stauber N, Leutenegger CM et al.: Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *J. Clin. Microbiol.* 8: 123-128, 2001.
32. 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.
33. Esfandiari J, Klingeborn B: A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J. Vet. Med. B.* 47: 145-153, 2000.
34. Parrish CR, Burtonboy G, Carmichael LE: Characterization of a nonhemagglutination mutant of canine parvovirus. *Virology* 163: 230-232, 1988.
35. Cavalli A, Bozzo G, Decaro N et al.: Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* 24: 239-242, 2001.
36. 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.* 17: 133-138, 2005.
37. Decaro N, Campolo M, Desario C et al.: Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33: 259-265, 2005.
38. 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.
39. Martella V, Decaro N, Buonavoglia C: Genetic and antigenic variation of CPV-2 and implication in antigenic/genetic characterization. *Virus Genes.* In corso di pubblicazione.