

# LE VARIANTI ANTIGENICHE DEL PARVOVIRUS DEL CANE: UN PROBLEMA EMERGENTE?

**PAOLA SAGAZIO, MARIA TEMPESTA, DOMENICO BUONAVOGLIA,  
GIOVANNI NORMANNO, CANIO BUONAVOGLIA**

*Dipartimento di Sanità e benessere degli animali - Sezione Malattie Infettive  
Facoltà di Medicina Veterinaria- Università degli studi di Bari -*

*s.p. per Casamassima km 3 - 70010 Valenzano (Bari) - tel. 080-4679033; fax 4679043 - E-mail: maria.tem@iol.it*

## Riassunto

Sono riportati i risultati di uno studio di tipizzazione antigenica con anticorpi monoclonali (MoAbs) di 28 stipiti CPV isolati da feci di cani con sintomi di gastroenterite emorragica. Venticinque isolati sono risultati CPV-2a e solo 3 CPV-2b. La situazione epidemiologica evidenziata risulta paragonabile a quella del Regno Unito e Australia, ove esiste una prevalenza della variante CPV-2a.

## Summary

*Antigenic characterization, using four monoclonal antibodies, of twenty-eight isolates of canine parvovirus type-2 from dogs with haemorrhagic gastroenteritis is reported.*

*Twenty-five isolates were characterized as CPV-2a and the other 3 viruses were CPV-2b.*

*A similar epidemiological pattern has been reported in the United Kingdom and Australia, where CPV-2a is more prevalent than the CPV-2b variant.*

Il parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) comparve quale nuovo patogeno nel 1978, allorché, quasi contemporaneamente in Europa e Nord America, furono segnalate nei cuccioli forme di miocardite e di gastroenterite emorragica<sup>1-2-3-4</sup>.

L'origine di CPV-2 rimane tutt'ora oscura, anche se la stretta correlazione antigenica e genetica (omologia di sequenza pari al 98%) esistente tra CPV-2 e il virus della panleucopenia felina (FPV) ha fatto ipotizzare che il parvovirus del cane possa essere derivato da FPV per un processo di mutazione naturale<sup>5</sup>.

In base ad altre ipotesi formulate, CPV sarebbe derivato da un parvovirus della volpe blu (*Arctic fox*)<sup>6</sup>, o da una mutante di FPV, presente quale contaminante nelle cellule di cane utilizzate per la produzione di vaccini e quindi successivamente diffuso nella popolazione canina<sup>7</sup>.

Nel 1985 Parrish et al., mediante l'impiego di anticorpi monoclonali (MoAbs) e l'analisi con enzimi di restrizione, hanno dimostrato che l'originale tipo antigenico era stato sostituito, tra il 1979 e il 1981, da una variante antigenica, denominata CPV-2a e che, intorno al 1984, era comparsa una seconda variante antigenica, denominata CPV-2b e diversa dalla precedente per la sostituzione di un amminoacido (Asn→Asp)<sup>8-9-10</sup>.

Nel giro di pochi anni CPV-2a e CPV-2b hanno praticamente sostituito l'originale tipo antigenico (CPV-2), presente ormai solo nei vaccini (Fig. 1)<sup>11</sup>.

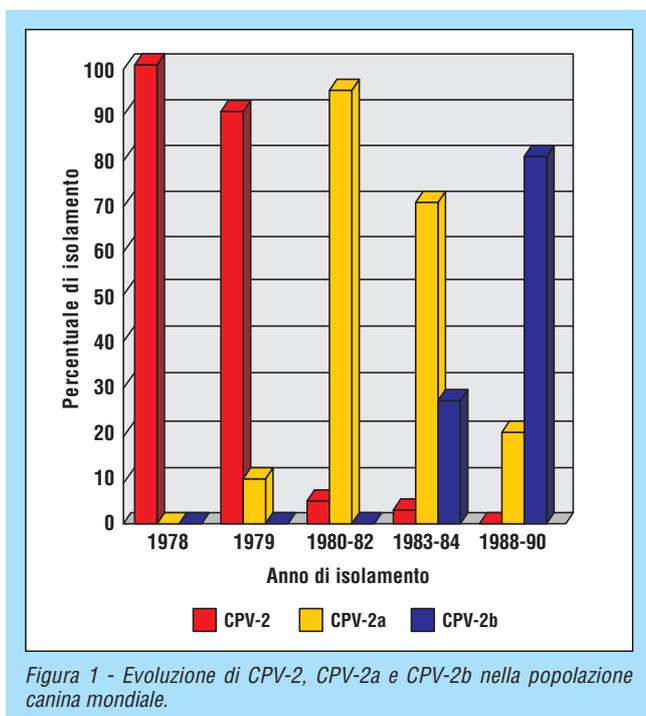
CPV-2a e CPV-2b oltre a presentare differenze antigeniche rispetto allo stipite originale presentano un ampliamento dello spettro d'ospite, potendo infettare anche il gatto, specie non colpita da CPV-2<sup>12</sup>.

La insorgenza di piccole modificazioni antigeniche, rilevabili con l'ausilio di anticorpi monoclonali, costituisce una evenienza abbastanza comune tra i virus, mentre è inusuale la sostituzione, in così breve tempo, di uno stipite originale da parte di varianti antigeniche da esso derivate<sup>8</sup>.

I meccanismi che sono alla base della evoluzione antigenica della maggior parte dei virus sono tutt'ora oscuri, tuttavia è stato ipotizzato che la formazione di CPV-2a e CPV-2b possa essere stata indotta da un processo di selezione immunitaria. Questa teoria trova giustificazione nella constatazione che, a partire dal 1980, la maggior parte della popolazione canina era diventata immune verso CPV-2 ed in tale situazione un virus modificato poteva circolare più facilmente.

La perdita di un epitopo di neutralizzazione nelle due varianti antigeniche confermerebbe tale ipotesi evolutiva<sup>13</sup>.

Secondo altri AA l'evoluzione di CPV-2 potrebbe essere



stata la conseguenza di un tropismo selettivo del virus per le cellule delle cripte intestinali del cane. In effetti l'immunità colostrale verso CPV-2 ha determinato la scomparsa delle forme miocardiche, tipiche dei cuccioli di poche settimane di età e prevalenti negli anni in cui la parvovirosi fece il suo esordio (assenza di immunità colostrale), lasciando al virus l'intestino come principale organo target<sup>14</sup>.

Attualmente CPV-2b è, in generale, prevalente nella popolazione canina mondiale, anche se, nei vari Paesi, esistono differenti situazioni riguardo alla distribuzione delle 2 varianti: negli USA prevale CPV-2b, nel Regno Unito e in Australia domina CPV-2a, mentre in Germania e in Spagna si assiste ad un equilibrio tra le 2 varianti<sup>15-16</sup>.

Nella presente nota gli Autori riportano i risultati di uno studio di tipizzazione antigenica di stipiti CPV isolati da feci di cani della Puglia con sintomi di gastroenterite emorragica.

## MATERIALI e METODI

### Cellule

L'isolamento e la coltivazione degli stipiti virali sono stati realizzati su cellule in linea continua di fibroma di cane A-72 sviluppate in terreno *Dulbecco-Minimal Essential Medium* (D-MEM) arricchito con il 10% di siero fetale bovino.

### Anticorpi monoclonali (MoAbs)

Ciascun virus è stato testato con 4 MoAbs nei confronti di CPV: A4E3, B4A2, C1D1, B4E1, prodotti dal dr. Parrish (Cornell University - Ithaca - New York - USA).

In base al *pattern* di reattività è stato possibile tipizzare gli isolati come CPV-2, CPV-2a e CPV-2b.

## Virus

Sono stati esaminati 28 stipiti patogeni CPV, isolati da cani con gastroenterite emorragica e 1 stipite attenuato vaccinale (Parvovirus-stipite Cornell-Merieux) come variante CPV-2 di controllo.

Per l'isolamento di CPV i campioni fecali sono stati diluiti al 20% in D-MEM e centrifugati a 6.000 r.p.m. x 20'. Il surnatante, dopo filtrazione, è stato utilizzato per infettare le cellule subito dopo la tripsinizzazione.

La crescita del virus è stata valutata con la emoagglutinazione (EA) effettuata sul surnatante delle colture cellulari, utilizzando globuli rossi di suino all'1% e una temperatura di + 4° C. È stato anche allestito il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule sviluppate su vetrini, utilizzando un siero di cane monospecifico per CPV e anti IgG di cane marcate con isotiocianato di fluoresceina.

## Inibizione della emoagglutinazione

La tipizzazione antigenica mediante i MoAbs è stata effettuata sul criolisato del 3° passaggio su cellule di ciascun virus, impiegando la tecnica di inibizione della emoagglutinazione (IEA) con 6 Unità Emoagglutinanti (UEA) di virus.

Il *pattern* di reattività dei MoAbs, in base ai titoli anticorpali, risulta essere il seguente:

- = < 1:5.
- ± = 1:5 / 1:10.
- + = 1:80 / 1:160.
- ++ = 1:640 / 1:1.280.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le prove di isolamento su cellule non hanno evidenziato sostanziali differenze fra gli stipiti CPV-2a e CPV-2b riguardo alla capacità di adattamento alla coltivazione *in vitro*. In tutti i casi l'isolamento di CPV è stato ottenuto al primo passaggio.

In base alla caratterizzazione antigenica effettuata con i quattro anticorpi monoclonali (Tab. 1), 25 stipiti patogeni sono risultati CPV-2a e tre sono stati tipizzati come CPV-2b. Lo stipite vaccinale, come previsto, è risultato CPV-2.

I risultati hanno evidenziato una prevalenza della variante antigenica CPV-2a rispetto alla variante CPV-2b nella popolazione canina presa in esame. Per quanto riguarda l'area geografica considerata (Puglia), si può configurare una situazione epidemiologica sovrapponibile a quella riportata nel Regno Unito e in Australia<sup>15</sup>.

La tipizzazione con MoAbs degli stipiti CPV, oltre alla "curiosità" epidemiologica relativa alla diffusione delle varianti, può fornire utili informazioni per ottimizzare la diagnosi e la profilassi della parvovirosi del cane.

In effetti la possibilità di differenziare gli stipiti CPV-2 vaccinali dagli stipiti patogeni CPV-2a e CPV-2b mediante l'impiego della tecnica IEA con MoAbs può risultare di

**Tabella 1**  
Risultati della tipizzazione con MoAbs di stipiti CPV

		Anticorpi monoclonali				Tipo antigenico
		A4E3	B4A2	C1D1	B4E1	
stipiti CPV patogeni	25	+	+	++	±	CPV-2a
	3	+	-	++	±	CPV-2b
stipite vaccinale	1	+	+	-	++	CPV-2

- = < 1:5  
± = 1:5/1:10  
+ = 1:80/1:160  
++ =

utile impiego allorché, in cuccioli vaccinati da pochi giorni con CPV-2, si sviluppi una forma di enterite non causata da CPV (coronavirosi, salmonellosi, parassitosi, etc.). Nelle feci di questi soggetti potrebbe essere presente lo stipite vaccinale CPV che, come è noto, viene eliminato con le feci, insieme al reale agente patogeno responsabile della enterite. Gli usuali test utilizzati per la diagnosi di parvovirus (emoagglutinazione, immunofluorescenza, ELISA, etc.) non permettono di differenziare lo stipite vaccinale dal patogeno: a fronte di un risultato positivo potrebbe quindi essere formulata una falsa diagnosi di gastroenterite da parvovirus.

La tipizzazione antigenica delle varianti riveste, inoltre, importanti ripercussioni sulla profilassi vaccinale. La notevole plasticità antigenica evidenziata da CPV-2 sin dalla sua comparsa lascia prevedere che, in futuro, possano emergere stipiti CPV talmente modificati sul piano antigenico da non essere più correlati con gli stipiti vaccinali attualmente in commercio. Questo dato avrebbe ripercussioni di natura epidemiologica talmente importanti da suggerire un continuo monitoraggio antigenico degli stipiti patogeni circolanti.

## Parole chiave

*Cane, parvovirus, varianti.*

## Key words

*Dog, parvovirus, variants.*

## Abbreviazioni

CPV-2: Parvovirus del cane tipo-2. FPV: virus della panleucopenia felina.

MoAbs: Anticorpi monoclonali. Asn: asparagina. Asp: acido aspartico. D-MEM: *Dulbecco-Minimal-Essential-Medium*. r.p.m: rotazioni per minuto. EA: Emoagglutinazione. IFI: Immunofluorescenza Indiretta. IgG: Immunoglobuline classe G. IEA: Inibizione della emoagglutinazione. UEA: Unità emoagglutinanti.

## Bibliografia

1. Appel M.J.G., Scott W.F. and Carmichael L.E. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105:156, 1979.
2. Burtonboy G., Coignoul F., Pastoret P.P. and Delferriere N. Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol.* 61:1, 1979.
3. Johnson R.H. and Spradbrow P.B. Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Austr. Vet. J.* 55:151, 1979.
4. Kelly W.R. An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *Austr. Vet. J.* 54:593, 1978.
5. Truyen U., Parrish C.R., Harder T.C. and Kaaden O-R. There is nothing permanent except change. The emergence of new viral diseases (Review). *Vet. Microbiol.* 43:103, 1995.
6. Verijaleinen P. Characterization of biological and antigenic properties of racoon dog and blue fox parvoviruses, A monoclonal antibody study. *Vet. Microbiol.* 16:219, 1988.
7. Siegl G. Canine parvovirus: origin and significance of a "new" pathogen. In K.I. Berns (ed.), *The parvoviruses*. Plenum Press, New York, 1984.
8. Parrish C.R., Have P., Foreyt W.J., Evermann J.F., Senda M. and Carmichael L.E. Natural variation of canine parvovirus. *Science*. 230:1046, 1985.
9. Parrish C.R., O'Connell P.H., Everman J.F. and Carmichael L.E. Global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J.Gen.Virol.* 69:1111, 1988.
10. Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M.L., Everman J.F., Sgro J.-Y. and Mohammed H.O. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Virology*. 129:401, 1991.
11. Carmichael L.E. Comunicazione personale.
12. Truyen, U., Agbandje M. and Parrish C.R. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology*. 200:494, 1994.
13. Strassheim M.L., Gruenberg A., Veijaleinen P., Sgro J.-Y. and Parrish C.R. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*. 198:175, 1994.
14. Greenwood N.M., Chalmers W.S.K., Baxendale W. and Thompson H. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 21:63, 1995.
15. Greenwood N.M., Chalmers W.S.K., Baxendale W. and Thompson H. Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme-analysis. *Vet. Rec.* 138:495, 1996.
16. De Ybanez R.R., Vela C., Cortes E., Simarro I. and Casal J.I. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136:174, 1995.