

SUMMARY

The antigenic relationships among the original canine parvovirus type 2 (CPV-2) and the variants CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c were evaluated by hemagglutination-inhibition (HI) and sero-neutralization (SN) using the sera of immune dogs and rabbits. Marked differences between the homologous and heterologous antibody titres were appreciated only when using SN. Dogs inoculated with CPV-2, which is still largely employed in vaccine formulations, developed relatively low SN antibody titres against the variants CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. These results were confirmed by cross-neutralization assays with mono-specific sera raised in immunized rabbits.

The results suggest that the vaccines based on the original type-2 of CPV are not able to elicit a strong protection against the new variants and that the vaccines should be updated taking into account the current epidemiology of CPV-2.

Key words: *Canine parvovirus; antigenic variants; protection*

INTRODUZIONE

Il parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) è responsabile di una grave gastroenterite altamente contagiosa che colpisce i cuccioli di cane. La malattia è comparsa per la prima volta, quasi contemporaneamente in Europa e Nord America verso la fine degli anni 70 ed è oggi diffusa in tutto il mondo.^(1,6,17,19)

Mediante analisi di sequenza è stato dimostrato che CPV-2, insieme ad altri parvovirus isolati da procione, visone e volpe artica, è strettamente correlato al parvovirus felino (FPV)^(25,34) con il quale ha una omologia di sequenza pari al 95%. Verso la metà degli anni 80, due nuove varianti antigeniche, denominate CPV-2a e CPV-2b, hanno completamente sostituito, nella popolazione canina mondiale, lo stivite originario CPV-2 che è ormai presente solo in alcune formulazioni vaccinali. Le differenze tra FPV e CPV-2 sono legate alla sostituzione di 6 o 7 aminoacidi nella sequenza della VP2, mentre CPV-2 si differenzia dalle varianti 2a/2b per altre 5 o 6 sostituzioni.^(26,27)

Le varianti CPV-2a e CPV-2b si differenziano tra loro per un singolo aminoacido Asn→Asp localizzato in posizione 426, nel sito antigenico principale (Tab. 1).^(26,27) Dopo la comparsa di CPV-2a e CPV-2b, ulteriori mutazioni sono state osservate a livello di importanti residui della VP2 (Tab. 1), mettendo in evidenza che il virus è tuttora in continua evoluzione.^(4,16,35)

LE VARIANTI ANTIGENICHE DEL PARVOVIRUS DEL CANE TIPO 2 (CPV-2) TRA PRESENTE E FUTURO DELLA PROFILASSI VACCINALE

Virus	Origine, anno	Stipite	Ospite	Residuo															
				80	87	93	101	232	265	297	300	305	323	426	555	564	568		
FPV	USA, 1967	FPV-b	Gatto	Lys	-	Lys	-	Val	-	-	-	-	Asp	-	-	Asn	Ala		
MEV	USA, 1975	MEV-b	Visone	Lys	-	Lys	-	Val	-	-	-	-	Asp	-	-	Asn	Ala		
CPV-2	USA, 1978	CPV-b	Cane	Arg	Met	Asn	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Ser	Gly		
CPV-2	USA, 1978	CPV-Norden	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2	USA	Cornell	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2	USA	780916	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2	USA	154	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2a	USA, 1984	CPV-15	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	-	Ile	-	-		
CPV-2a	USA, 1983	CPV-31	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	-	Ile	-	-		
CPV-2b	USA, 1984	CPV-39	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-		
CPV-2b	USA, 1990	CPV-133	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	-	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-		
CPV-2c	Italia, 2000	56/00	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	Glu	-	-	-		
Asp-300 ^b	Vietnam, 2000	LCPV-V203	Leop-	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Asp	Tyr	-	Asp	-	-	-		
Asp-300 ^b	Vietnam, 2000	LCPV-V140	ardo	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Asp	Tyr	-	-	-	-	-		
Pro-265 ^b	Italia, 2000	CPV-616	Leop-	-	Leu	-	Thr	-	Pro	-	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-		
CPV-2	Italia, 1980	17/80 ISS ^a	Cane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CPV-2a	Italia, 1998	192-98 ^a	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	-	-	-	-		
CPV-2b	Italia, 1997	29/97 ^a	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	Asp	-	-	-		
CPV-2c	Italia, 2000	136/00 ^a	Cane	-	Leu	-	Thr	-	-	Ala	Gly	Tyr	-	Glu	-	-	-		

^a Stipiti utilizzati nel presente studio.
^b Stipiti CPV-2 identificati sporadicamente e di scarsa importanza epidemiologica.

Tab. 1. Differenze aminoacidiche nella proteina capsidica VP2 tra gli stipiti FPV, MEV, CPV-2, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c

In particolare una nuova variante denominata inizialmente Glu-426 e, successivamente, CPV-2c è stata isolata in Italia nel 2000 e poi in molti Paesi in Europa^(12,20), Asia e USA.^(14,23,29)

Le minime variazioni di sequenza esistenti nelle proteine capsidiche di FPV, CPV-2 e CPV-2a/b sono responsabili di drastiche modificazioni delle caratteristiche antigeniche e biologiche di questi virus, come lo spettro d'ospite in vivo e in vitro,^(30,36,37) le interazioni con il recettore cellulare transferrina^(15,24) e la virulenza.⁽⁷⁾

Esiste pertanto il fondato sospetto che i vaccini correntemente in uso per la profilassi dell'infezione da CPV-2, possano risultare scarsamente protettivi nei confronti delle nuove varianti del virus.⁽³³⁾

In effetti, la maggior parte dei vaccini commerciali sono ancora oggi allestiti con lo stipite originario CPV-2 che è ormai scomparso da molti anni dalla popolazione canina.

Uno studio fatto su due gruppi di cani vaccinati con CPV-2 e con CPV-2b ha effettivamente messo in evidenza che i titoli degli anticorpi neutralizzanti indotti dal CPV-2 sono significativamente inferiori nei confronti di CPV-2b rispetto ai titoli nei confronti del virus omologo. In pratica i vecchi vaccini, preparati con la variante CPV-2, inducono buoni livelli di anticorpi

neutralizzanti solo nei confronti del virus non più circolante nella popolazione canina.⁽³¹⁾

Altri autori^(7,13,32,38) tuttavia, hanno riportato che i vaccini CPV-2 sono pienamente protettivi nei confronti delle varianti. Tali conclusioni sono state formulate effettuando prove di infezione di cani dopo un brevissimo periodo (20-30 giorni) dalla vaccinazione.

Volendo apportare un ulteriore contributo su questo importante e delicato aspetto della profilassi vaccinale della parvovirosi del cane, nella presente nota vengono riportati i risultati di prove sierologiche crociate effettuate sui sieri di cani e di conigli vaccinati o infetti con le singole varianti di CPV-2.

MATERIALE E METHODS

Cellule

Per la coltivazione degli stipiti virali e per le prove di neutralizzazione (SN) sono state utilizzate cellule di cane in linea continua A-72 coltivate in terreno di Dulbecco (D-MEM) con il 10% di siero fetale bovino (SFB).

Virus

Sono stati utilizzati 4 stipiti virali CPV-2. Lo stipite

17/80 ISS⁽³⁾, con titolo pari a 3.2×10^5 dosi citopatiche medie per tessuto colture (TCID₅₀/50µl), è stato utilizzato come prototipo del virus originario CPV-2. Come variante CPV-2a è stato invece utilizzato lo stipo 192/98 (3.2×10^3 TCID₅₀/50µl) isolato a Bari nel 1998, dalle feci di un cucciolo morto.

Gli stipiti 29/97 (3.2×10^4 TCID₅₀/50µl)^(2, 5) e 136/00 (3.2×10^3 TCID₅₀/50µl)⁽⁴⁾ sono stati infine utilizzati rispettivamente come stipiti prototipi CPV-2b e CPV-2c.

In Tabella 1 sono riportate le differenze aminoacidiche nella proteina capsidica VP2, tra i 4 stipiti CPV-2 utilizzati nel presente studio.

La titolazione di ciascun virus è stata effettuata su cellule A-72 in micropiastre a 96 pozzetti inoculando 4 pozzetti con ciascuna diluizione log₁₀ del virus. Dopo 4 giorni di incubazione a 37°C, le piastre sono state congelate e scongelate 3 volte e il criolisato non diluito di ciascun pozzetto è stato saggiato in prove di emoagglutinazione (EA) con emazie di suino all'1%. Il titolo virale è stato espresso, usando la formula di Karber, come la più alta diluizione del virus che evidenzia attività EA nel 50% dei pozzetti inoculati.

Sieri di cane

Sono stati esaminati 21 sieri prelevati da cani padronali appartenenti a diverse razze e suddivisi in 3 gruppi diversi. Nel Gruppo A sono stati inclusi 8 sieri prelevati da 8 soggetti inoculati per via sottocutanea con 1 ml di CPV-2 (17/80 ISS) vivo modificato (ML) non diluito. Da ciascun soggetto è stato effettuato, 30 giorni dopo la vaccinazione (T₁), un prelievo di sangue per la determinazione del titolo anticorpale. Nel Gruppo B sono stati inclusi 9 sieri prelevati, 30 giorni dopo la vaccinazione (T₁), da 9 cani inoculati con 1 ml di CPV-2b (29/97) ML non diluito. Nel Gruppo C sono stati inclusi 4 sieri prelevati da 4 cani non vaccinati, 30 giorni dopo l'insorgenza (T₁) di un episodio di infezione naturale da CPV-2c. I cani dei gruppi A e B sono risultati negativi sia ai test di IEA e SN effettuati sui sieri prelevati al momento della vaccinazione (T₀), sia alla real-time PCR⁽¹¹⁾ eseguita sui campioni di feci raccolti per 7 giorni consecutivi, prima della vaccinazione (T₀).

Non è stato possibile reperire sieri di cane contenenti anticorpi monospecifici diretti esclusivamente contro la variante CPV-2a.

Sieri di coniglio

Otto conigli di razza New Zeland del peso di 2.5 Kg

sono stati utilizzati (2 soggetti per virus) per la produzione di antisieri monospecifici nei confronti di CPV-2, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c.

L'antigene utilizzato per l'immunizzazione dei conigli è stato preparato su cellule A-72. Il surnatante di ciascuna coltura infetta è stato centrifugato a 5000 x g x 20 min e quindi emulsionato con adiuvante MONTANIDE ISA 740 (Seppic, France) nel rapporto di 2:3 (v/v) ed utilizzato per inoculare due conigli (CPV-2 nei conigli A₁, A₂; CPV-2a nei conigli B₁, B₂; CPV-2b nei conigli C₁, C₂; CPV-2c nei conigli D₁, D₂). A ciascun soggetto sono stati inoculati per via sottocutanea 3 ml di virus in 3 punti diversi. Dopo 30, 50 e 70 giorni dalla prima inoculazione sono state effettuate ulteriori inoculazioni di richiamo utilizzando lo stesso protocollo. Da ciascun soggetto sono stati prelevati campioni di sangue per la determinazione dei titoli anticorpali, al momento della prima inoculazione (T₀) nonché 30 giorni (T₁) e 80 giorni (T₂) dopo T₀. Al tempo T₀, tutti i conigli sono risultati sieronegativi nelle prove di IEA e SN per le varianti CPV (2, 2a, 2b, 2c). Al termine della sperimentazione i conigli sono stati sottoposti ad eutanasia.

PROVE SIEROLOGICHE

I sieri di cane e di coniglio sono stati utilizzati in prove sierologiche crociate di IEA e SN nei confronti delle quattro varianti CPV (CPV-2, 2a, 2b, e 2c).

1) Inibizione dell'emoagglutinazione (IEA)

È stata eseguita a 4°C utilizzando diluizioni seriali per raddoppio in PBS di ciascun siero, eritrociti di suino all'1% e 10 unità EA di ciascuna variante CPV. Il titolo IEA è stato espresso come reciproco della massima diluizione del siero in grado di inibire completamente l'attività EA del virus.

2) Sieroneutralizzazione (SN)

È stata eseguita in micrometodo, utilizzando diluizioni per raddoppio dei sieri in DMEM (partendo da 1:10), 100 TCID₅₀/50µl di ogni singola variante e cellule A-72. Dopo 4 giorni di incubazione a 37°C, le piastre sono state congelate ed il criolisato non diluito di ciascun pozzetto è stato utilizzato in prove di EA per monitorare la crescita virale. Il titolo neutralizzante dei sieri è stato espresso come il reciproco della più alta diluizione in grado di neutralizzare completamente il virus (assenza di attività HA) nel 50% dei pozzetti inoculati.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata realizzata utilizzando il sof-

ware Statistical Analysis System (SAS release 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). I risultati sono stati presentati come medie quadratiche dei titoli anticorpali diretti verso le quattro varianti del virus e la variabilità dei dati è stata espressa come errore standard della media.

Sono stati ritenuti significativi valori di $P \leq 0.05$.

È stato effettuato un confronto tra le medie dei titoli IEA ed SN diretti verso il virus omologo e i virus eterologhi per valutare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa.

RISULTATI

Sieri di cane.

In Tabella 2 sono riportati i valori delle medie quadratiche e geometriche dei titoli anticorpali valutati mediante IEA e SN e diretti contro le quattro varianti, nei cani vaccinati/infetti con CPV-2, CPV-2b e CPV-2c.

Nei cani immunizzati con CPV-2 (gruppo A), le medie quadratiche dei titoli IEA hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il titolo omologo e i titoli eterologhi diretti verso CPV-2b e CPV-2c. Nelle prove di SN, la media geometrica dei titoli omologhi, è risultata pari a 18780, mentre i titoli SN eterologhi diretti verso CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c sono risultati statisticamente inferiori ($P < 0.001$), 354, 842 e 348, rispettivamente.

Nei cani immunizzati con CPV-2b (gruppo B), il titolo

GRUPPO DI CANI		CPV-2	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
A (CPV-2)	IEA	11.82±0.39 (3620)	10.82±0.39 (1810) (P=ns)	10.48±0.37 (1234) (P=0.019)*	10.32±0.42 (1395) (P=0.014)**
	SN	14.20±0.44 (18780)	8.44±0.45 (354) (P<0.001)***	9.54±0.42 (842) (P<0.001)***	8.46±0.48 (348) (P<0.001)***
B (CPV-2b)	IEA	10.21±0.22 (1185) (P<0.001)***	11.32±0.22 (2593) (P=ns)	11.37±0.21 (2677)	11.20±0.23 (2370) (P=ns)
	SN	10.76±0.54 (1741) (P=ns)	9.60±0.53 (766) (P=ns)	11.02±0.52 (2282)	9.38±0.58 (723) (P=0.042)*
C (CPV-2c)	IEA	11.57±0.34 (3044) (P=ns)	12.20±0.35 (4764) (P=ns)	11.52±0.31 (2560) (P=ns)	11.32±0.40 (3044)
	SN	13.82±0.42 (14481) (P<0.001)***	10.57±0.43 (1522) (P=ns)	11.92±0.39 (5120) (P=0.026)*	10.32±0.50 (1280)

ns = non significativa
* = significativa
** / *** = altamente significativa

Tab. 2. Medie quadratiche dei titoli IEA ed SN nei sieri di cane prelevati 30 giorni (T_1) dopo la vaccinazione o l'infezione con CPV-2 (gruppo A), CPV-2b (gruppo B) e CPV-2c (gruppo C). In parentesi sono indicate le medie geometriche. Le medie dei titoli omologhi sono riportate in grassetto. È riportata anche la significatività statistica delle differenze tra titolo omologo e titoli eterologhi (valore di P)

IEA è risultato statisticamente diverso solo da quello ottenuto verso CPV-2 ($P < 0.001$), mentre il titolo anticorpale SN è risultato significativamente diverso da quello ottenuto verso CPV-2c ($P = 0.042$).

I cani con infezione naturale da CPV-2c (gruppo C), nelle prove di IEA non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa tra il titolo omologo e i titoli eterologhi. Nelle prove di SN le differenze nei confronti di CPV-2 ($P < 0.001$) e di CPV-2b ($P = 0.026$), sono risultate statisticamente significative.

Sieri di coniglio.

Nelle Tabelle 3 e 4, sono riportati i risultati ottenuti dalle prove sierologiche crociate effettuate rispettivamente sui sieri prelevati al tempo T_1 (30 giorni dopo la immunizzazione) e al tempo T_2 (80 giorni dopo la immunizzazione).

CONIGLI		CPV-2	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
A ₁ , A ₂ (CPV-2)	IEA	8.82±0.50 (452)	7.82±0.50 (226) (P=ns)	7.82±0.50 (226) (P=n.s.)	7.82±0.50 (226) (P=n.s.)
	SN	10.82±0.40 (1810)	7.82±0.40 (226) (P=0.003)**	8.82±0.40 (452) (P=0.022)*	7.82±0.40 (226) (P=0.003)**
B ₁ , B ₂ (CPV-2a)	IEA	8.32±0.47 (320) (P=0.053)*	9.82±0.47 (905)	9.82±0.47 (905) (P=n.s.)	9.82±0.47 (905) (P=n.s.)
	SN	10.32±0.13 (1280) (P=n.s.)	10.32±0.13 (1280)	11.07±0.13 (2217) (P=0.003)**	9.32±0.13 (640) (P<0.001)***
C ₁ , C ₂ (CPV-2b)	IEA	7.82±0.47 (226) (P=0.005)**	10.82±0.47 (1810) (P=n.s.)	10.32±0.47 (1357)	9.82±0.47 (905) (P=n.s.)
	SN	8.82±0.57 (452) (P<0.001)***	10.82±0.57 (1810) (P=0.017)*	12.82±0.57 (7240)	8.82±0.57 (452) (P<0.001)***
D ₁ , D ₂ (CPV-2c)	IEA	9.82±0.35 (905) (P=0.004)**	10.82±0.35 (1810) (P=n.s.)	11.82±0.35 (3620) (P=n.s.)	11.82±0.35 (3620)
	SN	11.32±0.10 (2560) (P=n.s.)	10.32±0.10 (1280) (P<0.001)***	14.32±0.10 (20480) (P<0.001)***	11.32±0.10 (2560)

ns = non significativa
* = significativa
** / *** = altamente significativa

Tab.3. Medie quadratiche dei titoli IEA ed SN nei sieri di coniglio prelevati 30 giorni (T_1) dopo l'inoculazione con CPV-2 (A₁, A₂), CPV-2a (B₁, B₂), CPV-2b (C₁, C₂) e CPV-2c (D₁, D₂). In parentesi sono indicate le medie geometriche. Le medie dei titoli omologhi sono riportate in grassetto. È riportata anche la significatività statistica delle differenze tra titolo omologo e titoli eterologhi (valore di P)

Nei sieri prelevati dai conigli A₁ e A₂ inoculati con CPV-2, le prove di IEA non hanno evidenziato differenze significative tra titolo omologo e titoli eterologhi, con la sola eccezione della risposta ottenuta nei confronti della variante 2b al tempo T_2 .

Per contro, utilizzando il test di SN, tali differenze sono risultate molto più marcate e/o significative in entrambi i sieri T_1 e T_2 .

CONIGLI		CPV-2	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
A ₁ A ₂ (CPV-2)	IEA	9.82±0.50 (905)	8.82±0.50 (452) (P = n.s.)	7.82±0.50 (226) (P = 0.022) *	8.82±0.50 (452) (P = n.s.)
	SN	11.82±0.40 (3620)	8.82±0.40 (452) (P = 0.003) **	10.82±0.40 (1810) (P = n.s.)	9.82±0.40 (905) (P = 0.022) *
B ₁ B ₂ (CPV-2a)	IEA	9.32±0.47 (640) (P = n.s.)	11.32±0.47 (2560)	10.32±0.47 (1280) (P = n.s.)	11.32±0.47 (2560) (P = n.s.)
	SN	11.32±0.13 (2560) (P = 0.003) **	12.07±0.13 (4434)	12.32±0.13 (5120) (P = n.s.)	9.32±0.13 (640) (P < 0.001) ***
C ₁ C ₂ (CPV-2b)	IEA	8.82±0.47 (452) (P < 0.017) *	11.82±0.47 (3620) (P = n.s.)	10.82±0.47 (2715)	10.82±0.47 (1810) (P = n.s.)
	SN	10.82±0.57 (1810) (P < 0.001) ***	12.82±0.57 (3620) (P = 0.005) **	14.32±0.57 (20480)	9.82±0.57 (905) (P < 0.001) ***
D ₁ D ₂ (CPV-2c)	IEA	11.32±0.35 (2560) (P = 0.004) **	12.32±0.35 (5120) (P = n.s.)	13.32±0.35 (10240) (P = n.s.)	13.32±0.35 (10240)
	SN	13.32±0.10 (10240) (P < 0.001) ***	12.32±0.10 (5120) (P = n.s.)	14.32±0.10 (20480) (P < 0.001) ***	12.32±0.10 (5120)

ns = non significativa
 * = significativa
 ** / *** = altamente significativa

Tab. 4. Medie quadratiche dei titoli IEA ed SN nei sieri di coniglio prelevati 80 giorni (T₂) dopo l'inoculazione con CPV-2 (A₁A₂), CPV-2a (B₁B₂), CPV-2b (C₁C₂) e CPV-2c (D₁D₂). In parentesi sono indicate le medie geometriche. Le medie dei titoli omologhi sono riportate in grassetto. È riportata anche la significatività statistica delle differenze tra titolo omologo e titoli eterologhi (valore di P)

Nei conigli inoculati con CPV-2a (B₁, B₂), il confronto tra le medie ottenute in IEA a T₁ e T₂ ha messo in evidenza una risposta diversa solo nei confronti dello stipite originale CPV-2, mentre nelle prove di SN eseguite sugli stessi sieri, sono emerse differenze significative nei confronti della variante 2c.

Nelle prove di IEA eseguite sui sieri T₁ e T₂ dei conigli inoculati con CPV-2b (C₁ e C₂), solo il titolo eterologo verso CPV-2 è risultato significativamente diverso da quello omologo. Per contro nelle prove di SN, tutti i titoli eterologhi (verso CPV-2, 2a e 2c) sono risultati sempre significativamente più bassi rispetto a quello omologo.

Nei conigli inoculati con CPV-2c (D₁ e D₂), i titoli IEA verso il virus omologo hanno mostrato una differenza statisticamente significativa solo rispetto ai titoli ottenuti verso il tipo originale CPV-2. Le prove di SN hanno invece fornito un risultato apparentemente paradossale: in entrambi i sieri T₁ e T₂, il titolo omologo è risultato significativamente più basso rispetto a quello eterologo diretto verso la variante 2b e lo stesso fenomeno è stato osservato nei sieri T₂, anche nei confronti dello stipite originario CPV-2.

DISCUSSIONE

In questo studio sono state effettuate prove di IEA e SN su sieri immuni di cane e di coniglio per valutare le correlazioni antigeniche esistenti tra le varianti del parvovirus del cane. Poiché la risposta sierologica del cane (ospite naturale dell'infezione da CPV-2) può talvolta essere influenzata da un precedente "priming" con l'antigene, i titoli anticorpali osservati in questa specie sono stati confrontati con quelli rilevati nei conigli. In questi ultimi inoltre, le prove sierologiche sono state effettuate dopo la 1^a (sieri T₁) e la 4^a (sieri T₂) inoculazione, per valutare se le differenze di titolo osservate nei confronti dei virus eterologhi persistono anche dopo ripetute somministrazioni dell'antigene.

I risultati hanno chiaramente evidenziato che le differenze genetiche esistenti tra le varianti CPV-2, anche se limitate alla sostituzione di pochi aminoacidi, si traducono di fatto in una sostanziale differenza tra i titoli anticorpali diretti verso il virus omologo e i virus eterologhi. È stato ulteriormente confermato che tale differenza è più evidente se si usa il test SN e che, al contrario, la IEA, considerata a tutt'oggi il golden test per la diagnosi sierologica della parvovirosi, può fornire risultati che tendono a sovrastimare il reale stato immunitario degli animali esaminati. Le differenze più significative dei titoli anticorpali sono state evidenziate tra lo stipite originario CPV-2 e le sue varianti. Questo risultato, già osservato in precedenza,^(18,31) è probabilmente associato alla sostituzione di 5-6 aminoacidi nella sequenza della VP2.⁽²⁶⁾

Tuttavia differenze significative dei titoli anticorpali sono state osservate anche tra le varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c che differiscono tra loro in un singolo aa.⁽²²⁾

Negli animali immunizzati con CPV-2 (virus largamente utilizzato ancora oggi nella preparazione dei vaccini), è stato evidenziato che i titoli SN diretti verso il virus omologo sono statisticamente più elevati rispetto a quelli diretti verso le varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c.

Occorre tuttavia precisare che nei cuccioli, dopo una efficace vaccinazione con CPV-2, tali differenze non influenzano lo stato di protezione verso l'infezione. Questi soggetti infatti, presentano titoli anticorpali superiori ai livelli minimi considerati protettivi (≥1:80). Questo può spiegare perché alcuni autori^(13,32,38) hanno osservato protezione nei cani sottoposti ad infezione con le varianti circolanti, 20-30 giorni dopo la vaccinazione con CPV-2. Se tuttavia, si prendono in considerazione i cuccioli che possiedono solo gli an-

ticorpi di derivazione materna (MDA), la differenza dell'efficacia protettiva degli anticorpi nei confronti delle varianti eterologhe può essere determinante allorché i titoli di MDA scendono sotto i valori soglia considerati protettivi. In effetti, in più occasioni, sono stati osservati gravi episodi di parvovirosi in cuccioli con titoli anticorpali ritenuti pienamente protettivi nei confronti dell'infezione ($\geq 1:80$) o della malattia ($1:40-1:80$) (*Buonavoglia, osservazioni personali*).

Episodi di infezione sono stati inoltre osservati in cani adulti regolarmente vaccinati,^(4,8) (*Buonavoglia, osservazioni personali*) e, più recentemente, la variante CPV-2c è stata isolata in un grave focolaio di infezione che ha colpito un intero gruppo di cani adulti ripetutamente vaccinati con CPV-2.⁽¹⁰⁾

Queste osservazioni hanno generato serie perplessità circa la durata ed il livello di immunità indotta nei cani dai vaccini CPV-2, soprattutto alla luce dei nuovi orientamenti in tema di profilassi vaccinale del cane che suggeriscono una frequenza triennale dei richiami vaccinali.⁽²⁸⁾

In questo studio, come già osservato in precedenza, è stata osservata una evidente differenza tra i titoli anticorpali IEA e quelli SN, confermando che il test SN è sicuramente più affidabile del test IEA per valutare il reale stato immunitario nei confronti degli stipiti eterologhi in un cane vaccinato con CPV-2.

Il risultato sicuramente più difficile da interpretare è stato osservato nei sieri dei cani e dei conigli infetti/vaccinati con la variante CPV-2c. Il pattern di reazione di questi sieri è stato anomalo in quanto i titoli verso il virus omologo sono risultati inferiori rispetto a quelli eterologhi.

La variante 2c è stata identificata nel 2000 in Puglia ed è ormai stabilmente presente in tutta Italia.^(20,22)

Successivamente è stata segnalata anche in altri Paesi Europei, in Asia e negli Stati Uniti.^(9,14,23,29)

È possibile ipotizzare che la mutazione Asn/Asp→Glu insorta nel residuo 426, all'interno di un epitopo immunodominante di CPV, abbia fornito al virus mutante un sostanziale vantaggio evolutivo favorendone la rapida diffusione.⁽²¹⁾

Nelle prove di SN condotte in questo studio, la variante 2c è stata scarsamente riconosciuta dai sieri degli animali inoculati con i virus eterologhi (CPV-2, CPV-2a e CPV-2b). Ma il dato più strano che è emerso è che i titoli anticorpali SN sono risultati significativamente più elevati nei confronti dei virus eterologhi ed in particolare di CPV-2b, rispetto al virus omologo.

Un simile paradosso immunitario è stato osservato anche nel corso di uno studio sulle correlazioni an-

tigeniche esistenti tra diversi stipiti di parvovirus del suino (PPV). Lo stipite altamente virulento PPV 27a ha evidenziato nelle prove di SN con sieri immuni di suino e di coniglio, titoli omologhi 100-1000 volte più bassi rispetto a quelli eterologhi diretti verso altri stipiti PPV.⁽³⁹⁾

In conclusione, i risultati del presente studio permettono di fare alcune importanti considerazioni sulla efficacia dei vaccini attualmente disponibili per la profilassi dell'infezione.

Gli studi condotti durante gli anni 70-80 sulle interazioni virus-ospite in corso di infezione da CPV-2, hanno permesso di stabilire alcuni parametri immunologici indicativi dello stato di protezione nei confronti dell'infezione. Convenzionalmente, il titolo HI $\geq 1:80$ è stato ritenuto come livello soglia protettivo, mentre il titolo HI $\geq 1:20$ come livello soglia interferente con la vaccinazione. I titoli anticorpali compresi tra questi due valori risulterebbero troppo bassi per proteggere il cucciolo dall'infezione e, nel contempo, sufficientemente alti da impedire in esso la sieroconversione attiva dopo la vaccinazione. È stato quindi necessario individuare dei protocolli vaccinali in grado di superare in maniera efficace, il ruolo interferente degli MDA e i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando i vaccini "alto titolo" o, sperimentalmente, la vaccinazione per via intranasale.

Tuttavia, a 30 anni di distanza dai primi studi effettuati sull'immunologia della parvovirosi, si assiste sempre più spesso all'insorgenza di gravi episodi di malattia non solo nei cuccioli con titoli anticorpali compresi tra 1:20 e 1:80, ma anche in animali adulti regolarmente vaccinati nonché in cuccioli con titoli MDA superiori al livello soglia considerato protettivo. Queste osservazioni impongono una revisione dei parametri immunologici determinati nel passato, avendo come riferimento esclusivamente lo stipite originario CPV-2 ormai presente esclusivamente nei vaccini.

I risultati del presente studio dimostrano che le cagne vaccinate con questo virus trasmettono ai loro cuccioli degli anticorpi colostrali che riconoscono e neutralizzano in maniera completa solo lo stipite vaccinale omologo. In questi cuccioli pertanto, i titoli anticorpali richiesti per prevenire l'infezione sostenuta dalle varianti, dovranno essere superiori al valore soglia fino ad oggi considerato protettivo.

L'insorgenza delle nuove varianti del virus ha provocato nuovi problemi relativi alla profilassi dell'infezione rendendo di grande attualità la valutazione dell'efficacia dei vaccini. I vaccini allestiti con il "vecchio" virus CPV-2, non più circolante nella popolazione canina,

inducono la formazione di anticorpi che risultano meno efficaci nei confronti delle varianti eterologhe circolanti. Questo problema, in effetti, ha portato anche in Italia alla commercializzazione di alcuni vaccini, allestiti con la variante 2b che risultano al momento, sicuramente più vicini alle realtà epidemiologiche di questa grave infezione del cane.

BIBLIOGRAFIA

- Appel M.J.G., Scott W.F., Carmichael L.E.: Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *The Veterinary Record*, 1979, 105, 156-159.
- Buonavoglia C., Fratelli A., Tempesta M., Martella V., Normanno G.: Valutazione delle caratteristiche di innocuità e immunogenicità di una variante 2b di parvovirus del cane (CPV2b). *Veterinaria*, 1998, 12, 55-58.
- Buonavoglia C., Compagnucci M., Orfei Z.: Dog response to plaque variant of canine parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 1983, 30, 526-531.
- Buonavoglia C., Martella V., Fratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N., Carmichael L.E.: Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *The Journal of General Virology*, 2001, 82, 3021-3025.
- Buonavoglia D., Cavalli A., Fratelli A., Martella V., Greco G., Tempesta M., Buonavoglia C.: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *Microbiologica*, 2000, 23, 93-96.
- Burtonboy G., Coignoul F., Pastoret P.P., Delferriere N.: Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Archives of Virology*, 1979, 61, 1-11.
- Carmichael L.E.: Canine parvovirus type-2 an evolving pathogen of dogs. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 1994, 138, 459-464.
- Cavalli A., Bozzo G., Decaro N., Tinelli A., Aliberti A., Buonavoglia D.: Characterization of a Canine Parvovirus strain isolated from an adult dog. *Microbiologica*, 2001, 24, 239-242.
- Decaro N., Desario C., Addie D.D., Martella V., Vieira M.J., Elia G., Zipola A., Davis C., Thompson G., Thiry E., Truyen U., Buonavoglia C.: The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging infectious diseases*, 2007, 13, 1222-1224.
- Decaro N., Desario C., Elia G., Martella V., Mari V., Gavazza A., Nardi M., Buonavoglia C.: Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *The New Microbiologica*, 2008, 31(1), 125-30.
- Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Campolo M., Di Trani L., Tarsitano E., Tempesta M., Buonavoglia C.: A real-time PCR assay for rapid detection and quantization of canine parvovirus type 2 in the faeces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105, 19-28.
- Decaro N., Martella V., Desario C., Bellacicco A.L., Camero M., Manna L., D'Aloja D., Buonavoglia C.: First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 2006, 53, 468-472.
- Greenwood N.M., Chalmers W.S.K., Baxendale W., Thompson H.: Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains. *The Veterinary Record*, 1995, 136, 63-67.
- Hong C., Decaro N., Desario C., Tanner P., Pardo M.C., Sanchez S., Buonavoglia C., Saliki J.T.: Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, 19, 535-539.
- Hueffer K., Parrish C.R.: Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6, 392-398.
- Ikeda Y., Mochizuki M., Naito R., Nakamura K., Miyazawa T., Mikami T., Takahashi E.: Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology*, 2000, 278, 13-19.
- Johnson R.H., Spradbrow P.B.: Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Australian Veterinary Journal*, 1979, 55, 151.
- Kang B.K., Song D.S., Lee C.S., Jung K.I., Park S.J., Kim E.M., Park B.K.: Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes*, 2008, 36, 127-33.
- Kelly W.R.: An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia virus. *Australian Veterinary Journal*, 1978, 54, 593.
- Martella V., Cavalli A., Fratelli A., Bozzo G., Camero M., Buonavoglia D., Narcisi D., Tempesta M., Buonavoglia C.: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 1333-1336.
- Martella V., Decaro N., Buonavoglia C.: Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes*, 2006, 33, 11-13.
- Martella V., Decaro N., Elia G., Buonavoglia C.: Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 2005, 52, 312-315.
- Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., Mochizuki M., Phung H.T., Nguyen N.H., Huynh L.M., Nguyen L.T., Nguyen P.N., Nguyen P.V., Nguyen N.P., Akashi H.: A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of Virology*, 2004, 149, 2261-2269.
- Parker J. S., Murphy W. J., Wang D., O'Brien S. J., Parrish C. R.: Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter and infect cells. *Journal of Virology*, 2001, 75, 3896-3902.
- Parrish C.R.: Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69, 29-40.
- Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M.L., Evermann J.F., Sgro J-Y., Mohammed H.O.: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 1991, 65, 6544-6552.
- Parrish C.R., O'Connell P.H., Evermann J.F., Carmichael L.E.:

- Global spread and replacement of canine parvovirus strains. *The Journal of General Virology*, 1988, 69, 1111-1116.
28. Paul M.A., Carmichael L.E., Childers H., Cotter S., Davidson A., Ford R., Hurley K.F., Roth J.A., Schultz R.D., Thacker E., Welborn L.:
AAHA Canine Vaccine Guidelines –Report of the American Animal Hospital Association (AAHA) Canine Vaccine Task Force. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2006, 42, 80-89.
 29. Pérez R., Francia L., Romero V., Maya L., López I., Hernández M.:
First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology*, 2007, 124, 147-152.
 30. Pollock R.V., Carmichael L.E.:
Use of modified live feline panleukopenia virus vaccine to immunize dogs against canine parvovirus. *American journal of Veterinary Research*, 1983, 44, 169-175.
 31. Pratelli A., Cavalli A., Martella V., Tempesta M., Decaro N., Carmichael L. E., Buonavoglia C.:
Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001, 8, 612-615.
 32. Spibey N., Greenwood N.M., Sutton D., Chalmers W.S., Tarpey I.:
Canine parvovirus Type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*, 2008, 128, 48-55.
 33. Truyen U.:
Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Veterinary Microbiology*, 2006, 117, 9-13.
 34. Truyen U., Gruneberg A., Chang S.F., Obermaier B., Veijalainen P., Parrish C.R.:
Evolution of the feline-subgroup of parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, 1995, 69, 4702-4710.
 35. Truyen U., Steinel A., Bruckner L., Lutz H., Mostl K.:
Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 2000, 142, 115-119.
 36. Truyen U., Parrish C.R.:
Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 1992, 66, 5399-5408.
 37. Truyen U., Evermann J.F., Vieler E., Parrish C.R.:
Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 1996, 215, 186-189.
 38. Yule T.D., Roth M.B., Dreier K., Johnson A.F., Palmer-Densmore M., Simmons K., Fanton R.:
Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine*, 1997, 15, 720-729.
 39. Zeeuw E.J., Leinecker N., Herwig V., Selbitz H.J., Truyen U.:
Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *The Journal of General Virology*, 2007, 88, 420-427.