

Genetyczna i antygenowa ewolucja parwowirusa psów. Nowy wariant parwowirusa psów CPV 2c.

Autor: Canio Buonavoglia

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet w Bari, Włochy

Na początku lat 70. w wielu krajach świata zaobserwowano pojawienie się wirusa u psów, charakteryzującego się bardzo wysoką śmiertelnością u zakażonych szczeniąt. (Kelly, 1978; Appel i wsp., 1979; Burtonboy i wsp., 1979; Johnson and Spreadbrow, 1979). Wirus został zidentyfikowany jako parwowirus psów typ 2 (CPV-2). Wykazywał on genetyczne i antygenowe pokrewieństwo z parwowirusem kotów (FPV-2), a także z FPV-podobnymi parwowirusami, występującymi u dzikich psowatych (Truyen i wsp., 1995; Parker i wsp., 2001). Na podstawie tych powiązań postawiono wniosek, że psi parwowirus CPV-2 powstał na skutek pasaży międzygatunkowych, a następnie szybkiej adaptacji do komórek psa (Shackelton i wsp., 2005).

W latach 80. przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych (MoAbs) wyodrębniono dwa warianty antygenowe CPV-2: CPV-2 a i CPV-2 b (Parrish i wsp., 1985, 1991). Obecnie warianty antygenowe całkowicie zastąpiły oryginalny typ 2 wirusa. CPV-2 jest stosowany standardowo w większości szczepionek (Mochizuki i wsp., 1993; De Ybanez i wsp., 1995; Greenwood i wsp., 1996; Steinel i wsp., 1998; Buonavoglia i wsp., 2000; Truyen i wsp., 2000; Martella i wsp., 2004).

Co najmniej sześć lub siedem aminokwasów różni łańcuchy FLV i CPV-2 i pięć lub sześć aminokwasów różni warianty CPV 2a/b od CPV 2 (tabela 1). Tych kilka różnic w sekwencji aminokwasów między FVP, CPV 2 i CPV 2 a/b powoduje antygenowe, a także biologiczne różnice. Skutkiem różnorodności CPV jest fakt, że stanowi on istotny model studiów nad ewolucją wirusów. (Truyen i Parrish, 1992; Truyen i wsp., 1996; Parker i wsp., 2001; Hueffer i Parrish, 2003).

FLV ma zdolność replikacji jedynie w komórkach kota, CPV replikuje się zarówno w komórkach psa jak i kota.

W warunkach in vivo replikacja FPV u kotów i CPV-2 u psów ma miejsce w komórkach układu chłonnego, w komórkach nabłonka jelit, co skutkuje masowym siewstwem wirusów z kałem. FVP replikując się u psa w grasicy i szpiku kostnym nie powoduje siewstwa wirusa wraz z kałem. CPV-2 nie ma wcale zdolności replikacji w komórkach kota. Oba warianty wirusa CPV, zarówno CPV-2 a, jak i b pozyskały zdolność do replikacji w komórkach kota. (Truyen i Parrish, 1992; Chalmers i wsp., 1999). Badania nad interakcjami między FPV i CPV, z zastosowaniem receptora komórkowego – białka transferyny wykazały, że FPV specyficznie wiąże się z kocią transferyną, CPV-2 nie jest w stanie wiązać się ani z kocim, ani psim receptorem transferynowym. Warianty antygenowe

CPV-2 z kolei, wiążą psi receptor transferynowy znacznie efektywniej niż oryginalny typ wirusa CPV-2 (Hueffer i Parrish, 2003). Dwie cechy wariantów CPV: a i b – zdolność replikacji w komórkach kota i adaptacja do komórek psa, zapewne przyczyniły się do ewolucji wirusa parwo i spowodowały, że oryginalny typ CPV-2 został aktualnie całkowicie zastąpiony przez warianty a i b.

Właściwości i rozprzestrzenienie wariantu Glu-426 wirusa CPV-2 (CPV-2c)

Dodatkowe mutacje spowodowały istotne zmiany w białkach kapsydu wirusa CPV. Ostatnio rozpoznanymi są zmiany na pozycjach 297, 300 i 426 (tabela 1). Zmiany te są dowodem na ciągłość procesu ewolucji wirusa CPV. (Ikeda i wsp., 2000; Truyen i wsp., 2000; Buonavoglia i wsp., 2001; Martella i wsp., 2004; Nakamura i wsp., 2004).

Nowy typ antygenowy CPV został odkryty we Włoszech przez Buonavoglia i współpracowników (2001). Dokonano analizy sekwencji dużego fragmentu genu CVP 2, zarówno typu a, jak i b pobranego od psów z objawami gastroenteritis. Badanie wykazało występowanie w łańcuchu dwóch wariacji. Ser297Ala i Asp426Glu w porównaniu z typem 2b CPV. Zmiana na pozycji 297 jest charakterystyczna dla większości aktualnie występujących wirusów i dotyczy zarówno CPV-2 a, jak i CPV-2 b, ma ona wpływ na strukturę antygenów zlokalizowanych w pobliżu epitopu B, w części głównej kapsydu (Truyen, 1999, 2006; Battilani i wsp., 2001; Nakamura i wsp., 2004; Wang i wsp., 2005; Chinchkar i wsp., 2006; Martella i wsp., 2004, 2005, 2006). Jednakże zmiana Asp426Glu nie była nigdy przedtem obserwowana i jest zlokalizowana w innym miejscu – w głównym regionie antygenowym – epitopie A, na trójkątnie zwiniętej wypustce kapsydu (Parrish i wsp., 1991; Agbandje i wsp., 1995).

Początkowo wirusy charakteryzujące się występowaniem tego rodzaju mutacji na pozycji 426 nazwano Glu-426 mutantami, aktualnie uznano zmiany te na tyle istotne z genetycznego i biologicznego punktu widzenia, że Glu-426 mutanty, pozyskały nazwę nowego typu CPV: CPV-2c (Decaro i wsp., 2006b). Największą liczbę tego typu izolatów odnaleziono we Włoszech (Martella i wsp., 2004). Szacuje się, że z pośród wszystkich izolatów CPV 2, badanych w 2004 roku we Włoszech, typ CPV-2c stanowił 60 % (Martella i wsp., 2005).

Posługiwanie się technologią MGB bezpośredniego testu PCR daje możliwość dokładnej diagnostyki i identyfikacji wirusów. Przy zastosowaniu tej technologii dokonano „wstecznych” badań i we Włoszech przebadano 414, CPV-pozytywnych próbek pochodzących z przypadków parwowirusy, które miały miejsce we Włoszech na przestrzeni dziesięciu ostatnich lat, od 1995 do 2005 roku. (Decaro i wsp., 2006a, b, c). Badania wykazały, że spośród 414 próbek – 268 (64.73%), zawierało wirus należący do typu 2a, 49 (11.83%) typu 2b i 97 (23.43%) próbek reprezentowało typ CPV-2c. Z doświadczeń tych wynika również, że typ CPV-2c pojawił się we Włoszech po roku 2000. Na przestrzeni lat 1995-2005 widoczne są bardzo zdecydowane i szybkie mutacje parwowirusa psów, czego efektem jest zdecydowane zastępowanie typu b przez typ c wirusa. W ostatnich dwóch latach typ CPV-2 b jest identyfikowany niezwykle rzadko (Decaro i wsp., 2006b).

W latach 2004 i 2005 typ CPV-2c został również wyizolowany i zidentyfikowany w kilku innych krajach.

Nakamura i współpracownicy (2004) wyizolowali typ CPV-2c w Wietnamie. W 2005 roku, CPV-2c wariant został wyizolowany z przypadków gastroenteritis, jakie miały miejsce w hodowli bassetów w Katalonii w Hiszpanii (Decaro i wsp., 2006d).

W 2006 roku, pobrano w Szkocji próbki kału od 41 CPV-pozytywnych psów (doświadczenie wykonane przez Diane Addie and Chris Davis - Department of Veterinary Pathology, Institute of Comparative Medicine, Companion Animal Diagnostics, Scotland). Badanie wykazało, że jedna próbka zawierała wirus należący do typu CPV-2c, 18 próbek, typ CPV-2a, 21 próbek CPV-2 b i jedna próbka zawierała wirus szczepionkowy CPV-2 (Davis i współpracownicy; N. Decaro, dane nie publikowane).

Ostatnio zostało też przeprowadzone badanie w Niemczech przez Prof. Uwe Truyenę (Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany). Zbadano 37 CPV izolatów, pobranych od psów z biegunką w Niemczech w latach 1996-2005. Wówczas, bez dokładnych badań izolatów uznano, że 5 próbek zawierało wariant CPV-2a, a 32 próbki wariant CPV-2b. Analiza powtórna, z użyciem technologii MGB testu PCR, potwierdziła identyfikację 5 próbek zawierających CPV-2 typ a, jednakże wykazano, że spośród 32 próbek sklasyfikowanych wówczas jako CPV-2b jedynie 18 było rzeczywiście typem b, pozostałe 14 izolatów zostało zdecydowanie zakwalifikowanych do typu CPV-2c. (N. Decaro i U. Truyen, dane niepublikowane). Najstarszy wirus CPV 2c został wyizolowany w 1996 roku w Niemczech, co dowodzi, że mutant ten krążył w populacji wirusów w Niemczech, co najmniej 4 lata przed tym zanim wyizolowano i zidentyfikowano izolat CPV-2 c we Włoszech w 2000 roku (Buonavoglia i wsp., 2001).

Patogenność wirusa CPV-2c

Już w latach 90tych udowodniono, że izolaty 2a i 2b CPV mają znacznie większą zdolność wysiewania się z kałem niż oryginalny CPV typ 2 (Carmichael, 1994). Jest to prawdopodobnie przejawem ciągłej i postępującej adaptacji do gatunku. Ewolucję i zdolność adaptacji potwierdza również fakt, że nowe warianty antygenowe wywołują poważniejsze objawy choroby, u zakażonego zwierzęcia niż oryginalny CPV-2 (Carmichael, 2005). Zmiany te, obserwowane w przypadku CPV-2a i CPV-2b związane są z możliwością wiązania receptora transferynowego, jakiej to zdolności nie ma oryginalny typ 2 (Hueffer and Parrish, 2003).

Eksperymentalne zakażenie szceniąt z różnym poziomem matczynych przeciwciał (MDA), wykazało, że wirus CPV-2c jest wysiewany wraz z kałem zakażonych psów, w bardzo dużych ilościach, dotyczy to nawet szceniąt z bardzo wysokim poziomem przeciwciał MDA HI - 1:160, nawet takie szcenięta mogą zostać zakażone (Decaro i wsp., 2005a).

Patogenność CPV-2c była badana na dwóch miotach szceniąt owczarków niemieckich, poprzez naturalne zakażenie (Decaro i wsp., 2005b). U wszystkich szceniąt widoczne były ciężkie objawy choroby (wodnista biegunka, ze śluzem, leukopenia). Natomiast u

żadnego ze zwierząt nie stwierdzono krwistej biegunki, ani wymiotów, w żadnym przypadku nie nastąpiło też wyleczenie w ciągu kilku dni. Zaobserwowano również bardzo długi okres wysiewania się wirusa CPV-2c wraz z kałem – powyżej 51 dni. Dowodzi to, że infekcja typem CPV-2 powoduje znacznie poważniejsze objawy niż dotychczas występujące warianty wirusa parwo. W 2006 roku Spibey i współpracownicy, wykonali eksperymentalne zakażenie terenowym szczepem CPV – 2c psów rasy beagle. Doświadczenie to miało na celu sprawdzenie czy stosowany w szczepionkach szczep CPV-2 ma zdolność zabezpieczenia przed wystąpieniem objawów choroby i wysiewaniem wirusa do środowiska. Psy z grupy kontrolnej, zakażone bez uprzedniego zabezpieczenia szczepionką, wykazywały ciężkie objawy choroby, leukopenię od 4 dnia po zakażeniu. Trzy z sześciu psów z grupy kontrolnej musiały zostać poddane eutanazji, pozostałe trzy dzięki terapii przeżyły.

Perspektywy

Genetyczna i antygenowa ewolucja wirusa CPV spowodowała pojawienie się nowych wariantów wirusa, które zostały wyizolowane i zidentyfikowane w wielu krajach na świecie. W świetle tych odkryć pojawiają się dwa istotne pytania: czy aktualnie stosowane szczepionki mają zdolność zabezpieczenia psów przeciwko nowym wariantom ?; czy jest konieczne uaktualnienie stosowanych szczepionek przeciwko parwowirusowi psów, tak aby zawierały najnowsze warianty parwowirusa psów.

Tabela 1. Różnice w sekwencjach aminokwasów łańcuchów białkowych VP2 różnych typów parwowirusów kotów i psów.

	80	87	93	101	103	297	300	305	323	426	555	564	568
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Ala	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
New CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
New CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
Asp-300	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asn Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Glu	Val	Ser	Gly

Bibliografia

1. Agabandje, M., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 1995. The recognition of parvovirus capsids by antibodies. *Seminars in Virology* 6, 219-231.
2. Appel, M.J.G., Scott, W.F., Carmichael, L.E., 1979. Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156-159.
3. Battilani, M., Scagliarini, A., Tisato, E., Turilli, C., Jacoboni, I., Casadio, R., Prosperi, S., 2001. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 1555-1560.
4. Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L.E., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 1555-1560.
5. Buonavoglia, D., Cavalli, A., Pratelli, A., Martella, V., Greco, G., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2000. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23, 93-96.
6. Burtonboy, G., Coignoul, F., Pastoret, P.P., Delferriere, N., 1979. Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol.* 61, 1-11.
7. Carmichael, L.E., 1994. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann. Vet. Med.* 135, 459-464.
8. Carmichael, L.E., 2005. An annotated historical account of canine parvovirus. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 303-311.
9. Chalmers, W.S., Truyen, U., Greenwood, N.M., Baxendale, W., 1999. Efficacy of feline panleucopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet. Microbiol.* 69, 41-45.
10. Chinchkar, S.R., Mohana Subramanian, B., Hanumantha Rao, N., Rangarajan, P.N., Thiagarajan, D., Srinivasan, V.A., 2006. Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India. *Arch. Virol.* 151, 1881-1887.
11. Davis, C.A., McDonald, M., Decaro, N., Addie, D.D., in press. Evaluation of a rapid immunomigration test for parvoviruses of the dog and cat. *Vet. Rec.*
12. De Ybanez, R.R., Vela, C., Cortes, E., Simarro, I., Casal, J.I., 1995. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136, 174-175.
13. Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005a. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33, 259-265.
14. Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005b. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 133-138.
15. Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006a. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between vaccine and field strains of canine parvovirus type 2. *J. Virol. Methods* 136, 65-70.
16. Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C., 2006b. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods* 133, 92-99.
17. Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Buonavoglia, D., Bellacicco, A.L., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2006c. Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J. Virol. Methods* 138, 10-16.
18. Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., D'aloja, D., Buonavoglia, C., 2006d. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 468-472.

19. Greenwood, N.M., Chalmers, W.S.K., Baxendale, W., Thompson, H., 1996. Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction-enzyme analysis. *Vet. Rec.* 138, 495-496.
20. Hueffer, K., Parrish, C.R., 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 392-398.
21. Ikeda, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., Takahashi, E., 2000. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278, 13-19.
22. Johnson, R.H., Spreadbrow, P.B., 1979. Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Aust. Vet. J.* 55, 151.
23. Kelly, W. R., 1978. An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *Aust. Vet. J.* 54, 593.
24. Martella, V., Cavalli, A., Pratelli, A., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Narcisi, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1333-1336.
25. Martella, V., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C., 2005. Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 312-315.
26. Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Genetic and antigenic variation of CPV-2 and implicance in antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11-13.
27. Mochizuki, M., Harasawa, R., Nakatani, H., 1993. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38, 1-10.
28. 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., 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261-2269.
29. Parker, J.S., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J., Parrish, C.R., 2001. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J. Virol.* 75, 3896-3902.
30. Parrish, C.R., O'Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E., 1985. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046-1048.
31. Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.-Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544-6552.
32. Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 379-384.
33. Spibey, N., Greenwood, N., Tarpey, I., Chalmers, S., Sutton, D., 2006. A canine parvovirus type 2 vaccine protects dogs following challenge with a recent type 2c strain. In: *Proceedings of the 2006 World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Prague, October 11-14, 2006*, pp. 885-886
34. Steinel, A., Venter, E.H., van Vuuren, M., Truyen U., 1998. Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65, 239-242.
35. Truyen, U., 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol.* 69, 47-50.
36. Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13.
37. Truyen, U., Parrish, C.R., 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 66, 5399-5408.
38. Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S.F., Obermaier, B., Veijalainen, P., Parrish, C.R., 1995. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69, 4702-4710.
39. Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215, 186-189.
40. Truyen, U., Steinel, A., Bruckner, L., Lutz, H., Mostl, K., 2000. Distribution of antigenic types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 115-119.
41. Wang, H.C., Chen, W.D., Lin, S.L., Chan, J.P., Wong, M.L., 2005. Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in Taiwan. *Virus Genes* 31, 171-174.