



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**STUDIO DELLA PARVOVIROSI DEL CANE FRA
EPIDEMIOLOGIA CLASSICA E MOLECOLARE**

Relatore: Dott. Michele Drigo

Correlatori: Dott. Giovanni Franzo
Dott. Marco Caldin

Laureanda: Eva Mazzetto
Matricola n. 610225/MV

ANNO ACCADEMICO: 2014/2015

RIASSUNTO

Cani e gatti hanno un'importanza sempre maggiore nella vita quotidiana di molte famiglie, e la loro cura è un obiettivo ormai consolidato della Medicina Veterinaria. È in questo contesto che la parvovirosi canina si delinea quale malattia molto diffusa, temuta per le sue caratteristiche di persistenza, contagio e letalità. L'agente eziologico responsabile è *Canine parvovirus* (CPV), virus emerso recentemente, e soggetto ad una rapida e continua evoluzione che lo ha portato a mutare negli anni, e ad essere in grado di acquisire nuove specie ospite e adattamenti sempre migliori per sopravvivere all'ambiente che lo circonda. Il presente lavoro vuole studiare più a fondo la natura di questo virus avvalendosi di mezzi quali l'epidemiologia molecolare e classica, per investigare la situazione epidemiologica italiana, della quale le informazioni a disposizione sono ad oggi molto scarse. Tutto ciò è stato possibile grazie alla validazione *ex novo* di un protocollo di PCR per l'amplificazione di CPV, e all'analisi delle sequenze a disposizione. I risultati attesi e non, emersi da questa indagine confermano come CPV sia un virus di notevole interesse per le caratteristiche di azione a livello epidemiologico ma anche medico-clinico. Per tale motivo questo studio costituisce la base di un progetto futuro più ampio, che ambirà ad indagare CPV in modo mirato, non solo per approfondire la sua natura di agente patogeno in evoluzione e con temibili capacità adattative, ma anche per rispondere ai dubbi sempre più incalzanti riguardo la scelta e lo sviluppo di metodiche diagnostiche adatte, e sulla reale efficacia della profilassi vaccinale ad oggi utilizzata.

ABSTRACT

Dogs and cats are increasingly essential into the daily life of many families and their care is a well-established goal of Veterinary Medicine. In this context the canine parvovirus (CPV) is an infection disease widespread into the world and it is considered really dangerous for its persistence, diffusion and lethality. The *Canine parvovirus*, recently discovered, underwent to a rapid and continuous evolution that led him to change over the years. This characteristic makes it able to acquire new host species and adaptations to improve his survival in the surrounding environment. The aim of this study is to further investigate the nature of this virus, using methods such as molecular and classical epidemiology, and to analyze the epidemiological situation in Italy. The validation of a new protocol for PCR amplification of CPV and the analysis of sequences available has made it possible. The expected and unexpected results emerged from this study confirm that CPV is a virus of great interest for the characteristics of its behavior in the epidemiological but also medical and clinical context. For this reason, this study is the basis of future activity of research, which will continue to investigate on CPV and, besides to analyze the evolution of this pathogen, with formidable adaptive capabilities, will try to answer to the opened questions about the ability of the diagnostic methods to detect and characterize the CPV strains and the real efficacy of existing vaccination protocols.

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	9
2. MATERIALI E METODI	25
2.1 CAMPIONI	25
2.2 DATABASE	26
2.3 SEQUENZIAMENTO SANGER	27
2.3.1 SCELTA E DISEGNO DEI PRIMER	27
2.3.2 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE	27
2.3.3 ELETTROFORESI	28
2.3.4 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR E ALLESTIMENTO PIASTRE	28
2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)	29
2.4.1 DISEGNO DEI PRIMER E VALIDAZIONE	29
2.4.2 ELETTROFORESI	30
2.5 ANALISI DELLE SEQUENZE	30
2.6 ANALISI DELLE FREQUENZE	31
2.7 CLASSIFICAZIONE DEL GENOTIPO	31
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	33
3.1 VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO	33
3.2 ANALISI BIONFORMATICA DELLE SEQUENZE	35
3.2.1 DISTRIBUZIONE TEMPORALE DEI GENOTIPI	35
3.2.2 NETWORK FILOGENETICI	37
3.2.3 ALBERI FILOGENETICI	40
3.2.4 RISULTATI INATTESI: FELINE PARVOVIRUS	43
3.4 EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA DEI CASI DI CPV	45
3.4.1 DATABASE COMPLETO (PAZIENTI INTERNI ED ESTERNI)	45
3.4.2 DATABASE RELATIVO AI SOLI PAZIENTI INTERNI	53
4. CONCLUSIONI	57
5. BIBLIOGRAFIA	59
6. SITOGRAFIA	67
7. RINGRAZIAMENTI	69

1. INTRODUZIONE

La parvovirosi canina è una malattia ormai diffusa in tutto il mondo e temuta nell'ambito medico sanitario poiché coinvolge soggetti giovani con manifestazioni clinico patologiche spesso fatali. La sua natura contagiosa, associata all'elevata resistenza ambientale del virus che la sostiene, la porta ad essere una patologia infettiva epidemiologicamente importante e diffusa ovunque. I cani vengono vaccinati fin da giovani per evitare di contrarre la malattia, ed essa fa parte della profilassi di routine consigliata ai proprietari; nonostante questo, sono sorti dei dubbi relativi all'efficacia del vaccino utilizzato, il quale sembra non essere esente da eventuali rotture. Qual è quindi il motivo del difficile contenimento di tale patologia, e come mai la gestione della profilassi di un virus estremamente studiato, sebbene piuttosto recente, come questo non appare così semplice? Per capire a fondo le problematiche a cui il Parvovirus canino (CPV) mette di fronte, è necessario indagare la sua natura, mettendo a fuoco la grande plasticità che lo caratterizza, la quale si manifesta ai ricercatori attraverso mutazioni e salti di specie in lassi temporali brevissimi.

Prima di affrontare l'evoluzione e l'epidemiologia del Parvovirus, è doveroso un cenno alla tassonomia, che in continuo aggiornamento, si occupa di dare una classificazione alle diverse componenti della famiglia dei Parvoviridae. Questa famiglia si suddivide in due sottofamiglie: Densovirinae e Parvovirinae, la prima infetta ospiti artropodi, la seconda invece infetta ospiti vertebrati, ed è quella quindi a cui va rivolto l'interesse. A sua volta la sottofamiglia Parvovirinae contiene cinque generi, tra questi spicca il genere Parvovirus al quale appartengono: il *Canine parvovirus* (CPV) o (CPV-2), il *Feline parvovirus* (FPV), il *Raccoon Parvovirus* (RaPV) e il *Mink enteritis parvovirus* (MEV).¹ E' bene specificare che *Canine parvovirus tipo 1* (CPV-1) non fa parte di questo gruppo, si tratta infatti di un virus appartenente al genere *Bocavirus*, la cui corretta denominazione è *Canine minute parvovirus* (CnMV) o (CPV-1), e non è correlato né geneticamente, né antigenicamente ai Parvovirus sopra citati.²

I primi episodi di parvovirosi canina sostenuti da CPV sono stati osservati nel 1978 in America, quando si sono individuate due fenomeni patologici: miocardite che portava alla morte improvvisa di cuccioli neonati, e grave enterite accompagnata da diarrea in cani di oltre due mesi, e in particolare tra le otto e le sedici settimane di vita. Questa patologia virale,

apparentemente nuova, si distribuì velocemente in tutto il mondo, colpendo sia cani domestici, che canidi selvatici, diventando ben presto una patologia endemica.^{3,4} Interessante è notare come sebbene CPV sia stato identificato ed isolato per la prima volta nel 1978⁵, l'anno seguente uno studio retrospettivo condotto su sieri di cane, ne ha dimostrato la circolazione in Europa già tra il 1974 e 1976, anche se con prevalenze molto limitate.^{4,6} Nel periodo successivo ai primi episodi clinici, tra il 1978 e il 1979, il virus ha proseguito la sua rapida evoluzione infettando più dell'80% dei canidi domestici e selvatici di tutto il mondo, e di questi moltissimi svilupparono la malattia che portò nella maggior parte dei casi ad un esito mortale.^{3,4} Questo evento epidemiologicamente allarmante, ovvero la comparsa di un nuovo virus manifestatosi in pochissimo tempo e su più continenti, ha portato alla ricerca di un vaccino per provare a controllare la pandemia virale. Il vaccino utilizzato inizialmente, era basato sul virus della FPV, e prevedeva di proteggere i cani dall'infezione del CPV cercando di stimolare una cross protezione, grazie agli antigeni condivisi dai due virus. Tale strategia si rivelò però inefficace, poiché non solo portava allo sviluppo di livelli anticorpali troppo bassi, ma anche di breve durata, per questo, ben presto, fu sostituito da un' altra formula vaccinale basata su un CPV vivo e attenuato.⁷ Il nuovo vaccino, tuttora utilizzato⁵, rispetto al precedente, forniva una protezione eccellente e duratura.⁷

Può sembrare strano che il primo tentativo per contrastare l'emergenza sopra citata sia stato quello di creare un vaccino basato sul FPV, ma tale scelta, sebbene non sia stata efficace, è lecita se ricondotta alle teorie che stanno alla base dell'evoluzione del CPV. Come scrive Truyen⁸ sono possibili diverse spiegazioni riguardo la comparsa improvvisa di questo virus: i) la mutazione di un FPV che risiedeva nella popolazione canina o felina, ii) un virus vaccinale della pavovirosi felina nato nelle colture cellulari e poi distribuitosi con le vaccinazioni, iii) un antenato stretto del CPV, originato da un virus FPV-like presente in una popolazione di carnivori selvatici, che si è poi evoluto e adattato nel cane.^{8,9}

A supporto di quest'ultima teoria, attualmente ritenuta la più probabile dalla comunità scientifica, sono infatti state trovate delle sequenze genetiche intermedie tra il FPV e il CPV, nella volpe artica in Finlandia e nella volpe rossa selvatica in Germania.⁸ Studiando queste sequenze e la loro evoluzione si è visto che alla base del passaggio tra FPV e CPV ci sono state delle mutazioni genetiche e la conseguente sostituzione di alcuni amminoacidi chiave a livello di capsida virale. E' importante sottolineare come i cambiamenti genetici abbiano

portato ad alterazioni fenotipiche a livello delle proteine che costituiscono il capsido, poiché queste stesse proteine sono responsabili della variabilità antigenica virale, nonché il principale mezzo di interazione tra il virus e le cellule dell'ospite.⁵

Risulta facilmente comprensibile l'importanza di indagare le caratteristiche genetiche del virus oltre che la sua biologia, in quanto entrambi i fattori sono strettamente interconnessi tra loro e risultano complementari nel condizionare la fitness del virus stesso e il suo ruolo nella popolazione canina. Quindi, per comprendere appieno l'evoluzione del CPV-2 ed i cambiamenti genetici e fenotipici che gli hanno permesso di emergere come un nuovo virus, è necessario osservarne la struttura e come le sue componenti diano la patogenicità a livello di ospite.

Il Parvovirus è un virus relativamente piccolo di circa 260 Å in diametro, privo di envelope, il cui virione consiste in un capsido sferico contenente un singolo filamento di DNA lineare (ssDNA). Il genoma è composto da una molecola di DNA di circa 5200 nucleotidi, che contiene due principali *open reading frame* (ORFs). Questi due ORFs codificano rispettivamente le proteine non strutturali NS1 NS2, e le proteine strutturali VP1 VP2; con NS2 e VP2 ottenute attraverso *splicing* alternativo.^{10,11}

Il capsido del Parvovirus è costituito da 60 subunità proteiche risultato della combinazione tra le sequenze delle VP1, VP2 e VP3. VP1 contiene tutta la lunghezza della VP2 più un dominio N-terminale. La VP2 è la proteina strutturale più presente, da sola forma il 90% del capsido ed è alla base dell'interazione virus-ospite e viene altresì scissa in VP3 dalle proteasi dell'ospite. Le 60 subunità proteiche sono formate da un architettura a foglietto- β , in cui i filamenti β sono interconnessi da dei *loop* amminoacidici che costituiscono le caratteristiche protrusioni (*spike*) del capsido.² Tali protrusioni sono le strutture del capsido maggiormente coinvolte nell'attacco del virus alla cellula ospite.⁹ Questa interazione prevede il legame del virus al dominio proteico superficiale di un recettore della cellula ospite, cui seguita l'entrata del virione attraverso la membrana cellulare e la conseguente infezione della cellula.¹⁰

La grande semplicità di CPV, sinora descritta, ha un profondo impatto sul suo ciclo replicativo e conseguentemente sulla sua patogenesi. Come in precedenza accennato, CPV è

un virus a singolo filamento di DNA e non possiede una sua polimerasi per sintetizzare il duplice stampo sul quale innescare la reazione di trascrizione.¹² Per il virus è quindi necessario entrare nel nucleo di una cellula ospite in attiva replicazione, al fine di utilizzare i mezzi di sintesi della cellula stessa. Inoltre CPV non possiede le proteine in grado di portare una cellula dalla fase di riposo alla fase-S, ed è quindi costretto ad aspettare tale fase replicativa per avviare la sua sintesi molecolare. Questi importanti limiti biologici caratterizzano la patogenesi di CPV, il quale è obbligato ad avere come target cellule che per la maggior parte del tempo si trovano in fase-S, quali, quelle dei feti, dei neonati, o le cellule emopoietiche e le cellule basali intestinali degli animali giovani e adulti.¹⁰

Il virus infatti, riconosce come tessuti per la replicazione virale le cripte intestinali e gli organi linfoidi, anche se poi può diffondere in tutti gli altri tessuti, cervello incluso. Dopo una penetrazione attraverso la via oronasale, il virus replica nel tessuto linfoide dell'orofaringe, dei linfonodi mesenterici e del timo, e si dissemina alle cripte intestinali dell'intestino tenue in seguito a viremia (1-5gg post infezione). CPV infetta quindi l'epitelio germinale delle cripte causando la distruzione ed il collasso dell'epitelio che avrebbe dovuto costituire il rivestimento dei villi intestinali con conseguente alterazione del *turnover* cellulare. L'eliminazione del virus nelle feci inizia verso il terzo giorno dall'esposizione e continua in maniera massiva per 7-10 giorni. Durante l'infezione, il virus compromette anche i precursori mitoticamente attivi dei leucociti circolanti e in particolare delle cellule linfoidi con conseguente linfopenia (diminuzione al di sotto di 2000-3000 cell/ml di sangue) spesso accompagnata da neutropenia. Le infezioni batteriche secondarie, riconducibili all'alterazione della barriera intestinale, provocano ulteriori complicazioni quali batteriemia e endotossiemia. Sebbene, la maggior parte dei cani subisca un'infezione subclinica o inapparente, in determinate condizioni quali giovane età o immunodepressione si può sviluppare una grave enterite e, nei cuccioli con meno di otto settimane di età è possibile il verificarsi di una miocardite con esito fatale. La sintomatologia dell'enterite da Parvovirus è associata a vomito, diarrea emorragica, anoressia e disidratazione, ipertermia e leucopenia, e la morte può sopraggiungere anche in due giorni post infezione se con la malattia insorgono ulteriori complicazioni quale sepsi o/e coagulazione intravascolare disseminata (CID).^{13,2} Lo sviluppo di anticorpi sierici avviene precocemente a 3-4 giorni dall'infezione, invece lo sviluppo di anticorpi locali intestinali avviene verso la fine dell'escrezione virale. Se un cucciolo guarisce

da un'enterite da CPV, i suoi anticorpi rimangono a livelli alti e costanti per circa un anno, rendendolo immune ad un'eventuale reinfezione.¹³

Quanto il ciclo biologico virale è determinante per la patogenesi, tanto l'architettura esterna del capsido è fondamentale nel discriminare l'ecologia e il tropismo d'ospite di CPV. L'infezione è primariamente condizionata dall'interazione tra capsido virale e recettore della transferrina (TfR) della cellula ospite quale sito di attacco ed entrata. Il TfR è una glicoproteina della superficie cellulare espressa come omodimero sulla maggior parte delle cellule del corpo e in particolare su quelle con alti livelli di proliferazione; la sua funzione è quella di legare le transferrine, le proteine adibite al trasporto del ferro, e di portarle all'interno della cellula attraverso un meccanismo di endocitosi recettore mediata. Allo stesso modo TfR lega il virione del CPV, e lo trasporta rapidamente dentro la cellula tramite il sistema endosomiale.³ Il legame con tale recettore oltre a determinare la capacità di infettare la cellula, differenzia il CPV dal FPV nel tropismo d'ospite. FPV, infatti è in grado di legarsi a TfR di molti carnivori e in particolare è associato all'infezione dei gatti; i cani e i loro più stretti parenti, come lupi e coyote, non rientrano però tra questi.¹⁴ Il TfR canino si differenzia da quello felino in circa il 12% di amminoacidi, e possiede un sito di glicosilazione che impedisce il legame e l'infezione da parte di FPV. Il CPV-2 invece, ha acquisito nella sua evoluzione, la capacità di legarsi al TfR dei cani domestici e dei suoi più stretti parenti.⁹

La nuova specificità di legame con la TfR canina di CPV-2, è dovuta a due amminoacidi contigui sul capsido : i residui della VP2 in posizione 93 e 323. Con la dicitura Lys 93 Asn e Asp 323 Asn si intende sottolineare il cambiamento evolutivo che ha portato dall'avere un'asparagina sia al posto della lisina in posizione 93, sia al posto dell'aspartato in posizione 323.^{3,9,15,16}

Oltre a questi residui amminoacidici anche altri sono cambiati modificando nel complesso l'interazione del capsido con la cellula ospite. Per esempio, gli amminoacidi in posizione 80, 568 e 564; non solo hanno aumentato l'affinità di CPV-2 per la TfR canina, ma hanno reso CPV incapace di infettare il gatto, delineando così un salto di specie unidirezionale.^{3,17}

Questa grande capacità di adattamento a nuovi ospiti getta le sue radici nell'elevato tasso di sostituzione caratteristico dei virus ssDNA.

In particolare sebbene i Parvovirus dimostrino generalmente un tasso di sostituzione maggiore rispetto ad altri virus a DNA, CPV possiede un tasso di variazione notevolmente alto ($1,7 \times 10^{-4}$ di sostituzioni per siti l'anno) che supera persino quello dello stretto parente FPV (9×10^{-6}).^{2,3}

Il CPV presenta quindi una frequenza di mutazione molto più vicina a quella di un virus a RNA che non a quello di un virus a dsDNA, e su questa sembra esplicitarsi l'azione di pressioni selettive positive che porta a fissare nel tempo le sue numerose mutazioni. Molte delle mutazioni non sinonimo avvengono in siti ristretti a livello di VP2, al contrario la maggior parte di quelle che si verificano al di fuori di tali siti, ma sempre sulla VP2, sono sostituzioni sinonimo, che non vanno a modificare la sequenza amminoacidica e quindi la funzionalità proteica. L'evidenza che le variazioni coinvolgano anche le NS1 e NS2, non implicate dell'antigenicità e nel legame alla cellula ospite, porta a pensare che questo suo continuo mutare non sia legato esclusivamente alla spinta data dalla selezione naturale, ma dipenda anche da altri fattori ed in particolare ad un intrinseco elevato tasso di mutazione nucleotidica. Nonostante CPV sia un virus a ssDNA ed utilizzi gli enzimi cellulari dell'ospite per replicarsi, beneficiando così di un certo grado di controllo e correzione a livello di replicazione virale, non è immune da possibili errori, poiché usufruisce solo di alcune parti di tale meccanismo. Le cause che possono portare ad errori frequenti nella replicazione dei virus ssDNA sono : i) le caratteristiche del DNA-*template* virale, che non garantisce la fedeltà della DNA polimerasi; ii) la ridotta efficienza degli apparati cellulari di riparazione e correzione, che non sono ugualmente attivi in una cellula infettata, iii) la mancanza della doppia elica, così il virus si trova ad essere più vulnerabile di fronte a fenomeni di mutazione quali la deaminazione.¹⁷

Sebbene l'alto tasso di mutazioni sia sicuramente un elemento chiave della grande plasticità che caratterizza CPV; deve essere comunque considerato come il substrato di quel processo che esita poi nella genesi e fissazione della variabilità genetica propria della popolazione virale. In altre parole il tasso di sostituzioni, che determina la natura finale di CPV, non è altro che il prodotto dell'interazione di diversi fattori, quali, la grandezza della popolazione effettiva, la fitness virale, il tasso di replicazione e la selezione naturale.^{18,19}

Dopo aver descritto le caratteristiche a livello genetico e fenotipico di CPV-2 non stupisce quindi che successivamente all'emergenza di CPV la sua evoluzione sia proseguita e il

genotipo originale sia stato soppiantato in breve da due ulteriore varianti, derivanti probabilmente dallo stesso mutante ancestrale, con delle caratteristiche in grado di favorirne la diffusione all'interno della popolazione. Queste due varianti definite come CPV-2a e CPV-2b, sono il risultato della velocissima evoluzione del virus, delle sue caratteristiche di alta resistenza ambientale e della crescente immunità della popolazione canina, causata dal largo utilizzo dell'efficiente vaccino.^{2,10} Infatti CPV, come tutti i Parvovirus, è estremamente stabile e può persistere oltre i cinque mesi su oggetti, quali gabbie, pavimenti, vestiti, ed è quindi possibile che l'uomo giochi un ruolo chiave nella trasmissione virale.¹² Per quanto riguarda la profilassi, si deve considerare che essa riuscì a controllare bene la diffusione del virus tra i cani domestici, invece, non essendo applicata nei canidi selvatici, questi rappresentano tuttora un importante serbatoio per il virus, lasciandolo indisturbato nella sua evoluzione.³

Mentre il CPV-2, osservato quindi solo nel 1978 sembra scomparire del tutto verso il 1981, dal 1979 fa già la sua comparsa la variante CPV-2a.²⁰

Il CPV-2a si distingue dal CPV-2 in pochissimi amminoacidi, eppure queste piccole differenze sono bastate a dargli caratteristiche molto diverse che lo hanno reso predominante nella popolazione dal punto di vista epidemiologico. Il cambiamento a livello amminoacidico del capsido gli ha permesso di riacquistare come specie ospite anche il gatto, nel quale si rende tipicamente responsabile di una malattia di moderata gravità.⁸ Questi cambiamenti nella biologia virale però non sono il risultato di un ritorno alla sequenza genetica e al fenotipo del FPV, infatti la struttura amminoacidica è ancora una volta diversa dalle precedenti, a conferma che si tratta di un'ulteriore evoluzione del CPV che ha interessato specificamente i siti amminoacidici 87, 300 e 305 della VP2.³

Paradossalmente questo ha ridotto in qualche modo l'affinità recettoriale poiché il CPV-2a lega in modo meno efficiente il recettore della TfR canina, rispetto CPV-2, il quale probabilmente utilizza altri recettori per rafforzare l'interazione con la cellula ospite.¹⁰ Nonostante ciò, CPV-2a ha comunque evidenziato una maggiore capacità infettiva, e replicativa, risultando avvantaggiato nel diffondersi e stabilirsi a livello di popolazione.^{5,17}

Nello stesso periodo a partire dal 1984 un'altra variante, denominata CPV-2b, si è affermata nella popolazione. Questa, rispetto al CPV-2a, presenta due singoli cambiamenti a livello di amminoacidico in posizione 426 e 555 della VP2. Entrambe le due varianti sono quindi risultate essere più efficienti nell'infettare il cane.^{17,21} Il tipo di patologia che CPV-2a e CPV-2b esplicano è quasi del tutto riferibile a quella del primo CPV-2, anche se lo sviluppo

di segni clinici maggiormente aggressivi e l'escrezione di titoli virali più alti nelle feci inducono a pensare ad un'aumentata virulenza.²² Inoltre i due nuovi genotipi possiedono la capacità di attuare un'intensa replicazione virale anche in ospiti con livelli anticorpali che prima risultavano sufficienti ad inibire la replicazione il precedente CPV-2.²³

Queste nuove varianti hanno sostituito completamente CPV-2 affermandosi in tutto il mondo, anche se la prevalenza di una variante rispetto all'altra, varia molto a seconda dell'anno di riferimento e della posizione geografica nelle indagini epidemiologiche effettuate.¹¹ Per esempio uno studio mostra come negli Stati Uniti tra il 1979 e 1984 il CPV-2a abbia preso il posto di CPV-2.²⁴ Una successiva indagine invece, evidenzia come dal 1984 al 1991 negli Stati Uniti lo stesso nuovo CPV-2a sia stato sostituito dalla variante CPV-2b.²⁵ Un esempio aggiuntivo per sottolineare la grande variabilità nella distribuzione dei genotipi è fornito da un recente studio condotto in Argentina, il quale notifica come ultimamente siano stati ritrovati CPV-2a, nonostante non ci fossero più state segnalazioni di questa variante dal 2008.²⁶

L'accurata conoscenza dell'epidemiologia si è spesso dimostrata complicata a causa delle tecniche diagnostiche impiegate per distinguere le varianti, che a volte hanno portato ad un'incapacità nella differenziazione dei diversi genotipi o ad una mis-classificazione degli stessi.⁵

Nel 2000, proprio in Italia, sono state infatti ritrovate due sequenze che sia all'analisi antigenica che a quella biomolecolare (PCR) risultavano essere riconducibili al CPV-2b, ma che dopo l'analisi di sequenza mostravano una differenza genetica sulla VP2. Il cambiamento descritto in questo episodio ha coinvolto sia l'amminoacido in posizione 297, sia quello in posizione 426. Nello specifico la sostituzione della Asn e Asp nei rispettivi CPV-2a e CPV-2b con un Glu in posizione 426, è la più importante tra le due, in quanto porta ad avere una differenza a livello di epitopo A, il principale sito antigenico del capsido di CPV. Ciò ha condotto ad un'iniziale denominazione di questi ceppi con il nome di "mutante Glu-426", in attesa di un riconoscimento come variante CPV-2c.²¹

Sempre nel 2000, in Vietnam e a Taiwan, sono stati trovati in alcuni felini anche altri CPV che mostravano una variazione a livello amminoacidico, in posizione 300. Questi virus mutati vennero denominati come varianti CPV-2c (a), CPV-2c (b), intese come un nuovo adattamento del CPV in questa specie ospite.^{2,27}

Ci si è trovati dunque, di fronte a due mutazioni diverse ma ugualmente importanti, indicabili come varianti CPV-2c. Per venire a capo di questo dubbio tassonomico va premesso che ogni cambiamento a livello genetico e poi amminoacidico non può essere visto come la nascita di un nuovo virus, o di una sua variante. Infatti non bastano delle piccole modifiche per caratterizzare la presenza di una nuova variante, ma sono necessari cambiamenti a livello biologico e antigenico associati a una grande distribuzione mondiale.²¹

Perciò, la mancata presenza mondiale di CPV-2c (a) e CPV-2c(b)^{28,30} definite poi CPV-2a(c), CPV-2b (c), le ha relegate ad essere considerate delle semplici mutazioni, circolanti solo nel sud-est asiatico.²

Invece il mutante Glu-426, identificato in Italia e prima citato, è stato formalmente confermato come la vera variante CPV-2c, in quanto possiede tutte le caratteristiche sopra descritte.³⁰

Il CPV-2c ha pertanto iniziato ad essere sempre più presente a livello mondiale. Diversi autori hanno poi riportato la sua presenza in Germania già dal 1995, grazie all'analisi di campioni stoccati precedentemente, e come la sua distribuzione interessasse tutta l'Europa, rilevando positività nel Regno Unito, Portogallo, Spagna, Germania, Francia, Belgio e Bulgaria.³¹⁻³⁴ Anche in Italia uno studio ha evidenziato la sua crescente prevalenza a discapito delle varianti 2a e 2b, avvenuta in un brevissimo lasso di tempo dal 2000 al 2005.³⁵ Al di fuori dell'Europa il CPV-2c è stato poi riscontrato in America, e in India, a conferma dell'alto grado di diffusione che lo caratterizza.² Sfortunatamente le informazioni che dovrebbero chiarire se PCV-2c è una variante maggiormente patogena, rispetto alle due con le quali coesiste nell'ambiente, sono carenti. Alcuni rilevamenti fanno pensare che il CPV-2c abbia una patogenicità intermedia tra il CPV-2 e le più aggressive varianti 2a e 2b, ma presenti comunque una maggior persistenza di eliminazione virale nelle feci. Questa caratteristica associata alla grande resistenza del CPV nell'ambiente, potrebbe aver favorito la sua grande distribuzione epidemiologica.²²

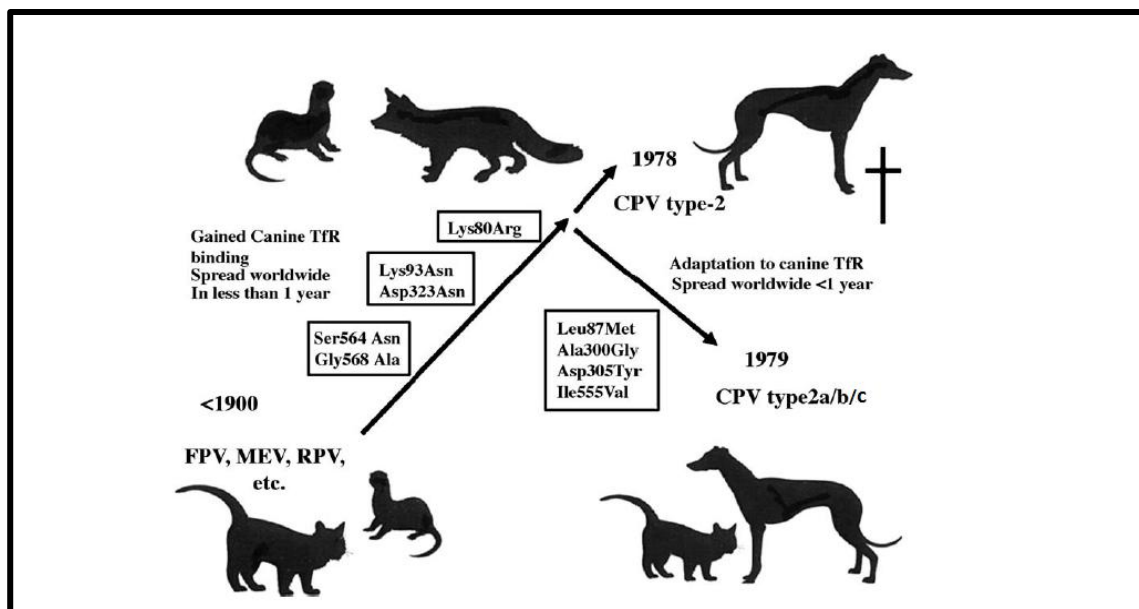


Fig. 1. L'immagine rappresenta l'evoluzione del *Canine parvovirus* (CPV) dal *Feline parvovirus* (FPV), *Mink enteritis virus* (MEV) o dal *Raccoon parvovirus*, con i relativi ospiti. L'originale CPV-2, ormai estinto, è stato soppiantato dalle varianti CPV-2a, 2b, 2c, le quali hanno acquisito anche il gatto nel loro spettro d'ospite. La chiave di questa evoluzione risiede nell'interazione e adattamento con il recettore della transferrina del cane e del gatto (TfR).⁵

Un altro dato che risulta preoccupante, riguarda l'efficacia del vaccino ad oggi utilizzato contro le varianti di CPV circolanti, infatti la necessità di una buona protezione anticorpale è fondamentale nella lotta al Parvovirus. In particolare per i cuccioli è necessario avere una buona protezione anticorpale al momento dell'infezione in quanto una scarsa copertura immunitaria porta ad avere una mortalità di oltre il 70%.² Al contrario, quando i titoli anticorpali sono intermedi o alti (titoli di HI > 80), le infezioni anche se presenti possono risultare subcliniche o inapparenti.²³

Allo stato attuale, la vaccinazione rappresenta il principale strumento di controllo e conseguentemente, monitorarne l'efficacia appare di primaria importanza. Il vaccino ad oggi utilizzato viene preparato a partire da ceppi appartenenti al genotipo CPV-2 o, in alternativa, anche sulla variante 2b, dimostrandosi una metodica sicura con rarissimi casi di reazione post vaccinale.² Si tratta di un virus vivo attenuato, somministrato ai cuccioli per via sottocutanea tra le 8/9 settimane di vita e ripetuto ogni 3/4 settimane fino all'ultima somministrazione che avviene non prima delle 14-16 settimane, per poi essere richiamato ogni 12 mesi.³⁶

In alcuni casi però, si sono osservate delle cosiddette "rottture vaccinali", ovvero cani che erano stati regolarmente vaccinati hanno comunque sviluppato la malattia.^{34,37,38} Tali episodi

sono tipicamente ricondotti all'interferenza dell'immunità materna con il vaccino: gli alti livelli anticorpali nei cuccioli alimentati con colostro materno, non permettono lo sviluppo dell'adeguata risposta anticorpale individuale.^{23,39} Tuttavia un ulteriore ruolo, alla base della rottura vaccinale, sembra invece attribuibile alla parziale cross-protezione indotta dal vaccino contenente CPV-2.⁵ La questione è ancora controversa, poiché alcuni ricercatori sostengono che questo sia in grado di fornire un'adeguata protezione rispetto alle varianti circolanti,^{33,36,39} mentre altri sono invece convinti che l'immunità indotta dal vaccino CPV-2 sia efficace in modo significativo solamente contro il virus omologo.⁴⁰ A sostegno della prima tesi sono stati condotti vari studi per provare l'efficacia del vaccino CPV-2 nello stimolare una cross-protezione contro i virus eterologhi.^{39,41} Uno di questi è stato condotto su sei cuccioli di Beagle infettati con CPV-2c poche settimane dopo la vaccinazione con un virus attenuato di CPV-2. Il gruppo infettato non ha manifestato segni clinici e non ha escreto il virus con le feci, invece il gruppo di controllo non vaccinato ha mostrato segni di diarrea mucoide violenta.⁷ Nonostante gli esperimenti possano aver dimostrato l'efficacia a livello clinico, è da sottolineare come l'inoculazione del virus sia stato fatto in situazioni controllate, nel momento in cui gli anticorpi raggiungevano il loro livello più alto. Questa condizione non studia quindi una situazione vicina alla realtà, cioè la reazione all'infezione virale dopo un notevole arco di tempo rispetto alla data della vaccinazione, con immunità ormai in declino.² Infatti nella pratica clinica sono stati analizzati alcuni episodi di malattia in cani giovani, ma anche adulti, sotto copertura vaccinale. Queste evidenze portano a pensare che il problema non sia stata l'interferenza dell'immunità materna con la profilassi vaccinale, bensì la scarsa efficacia del vaccino formulato con CPV-2, a causa della limitata cross reattività fra le varianti del CPV, il vaccino sarebbe quindi più pienamente protettivo contro il virus omologo, ma non nei confronti dell'eterologo.⁴⁰ A rafforzare quest'affermazione sono le analisi dei sieri: i livelli anticorpali sorti contro il CPV-2 hanno una potenzialità di virus neutralizzazione (VN) minore contro i virus eterologhi, il contrario accade se gli anticorpi vengono stimolati da un CPV-2b, i quali risultano aver un buonissimo livello di neutralizzazione virale contro il CPV-2.⁴² Ci sono quindi le basi per sostenere che le differenze antigeniche tra l'originale CPV e le molteplici varianti possono diminuire l'efficacia di un vaccino formulato sul CPV-2.⁴⁰ Alla luce di ciò è stato introdotto nel mercato un vaccino vivo inattivato basato sul CPV-2b, dimostratosi valido nel fornire una buona copertura anticorpale contro le varianti circolanti anche a distanza di mesi dall'ultima inoculazione.³⁹ Nonostante studi a conferma di questo,

ancora oggi sono stati comunque resi noti casi nei quali cani vaccinati secondo la nuova formulazione CPV-2b hanno subito l'infezione di alcuni Parvovirus isolati tra il 2008-2012 e rinominati CPV new2a e new2b.

Stante la grande diffusione della profilassi vaccinale, si rende necessaria la capacità di saper distinguere il virus vaccinale da quello di campo (*wild type*), per essere in grado di rilevare un'eventuale reversione alla virulenza del ceppo vaccinale, ma anche in caso di controversie tra proprietari, medici veterinari e compagnie farmaceutiche quando, pochi giorni dopo il vaccino, i cuccioli sono soggetti ad episodi di diarrea acuta. Sia i vaccini basati su CPV-2 che su CPV-2b talvolta causano viremia e i virus escreti con le feci dei cani immunizzati sono stati ritrovati da soli o con ceppi di campo in campioni prelevati da cani che accusavano una gastroenterite acuta a breve distanza dalla vaccinazione.⁴³ Anche se somministrato per una via innaturale, il vaccino vivo e attenuato è in grado di replicare nelle cellule della mucosa intestinale e di essere quindi escreto nelle feci. Sebbene questo avvenga a titoli più bassi e per periodi più brevi rispetto a un virus di campo, la semplice quantificazione di tali titoli risulta inadeguata ai fini della differenziazione di stipiti vaccinali e *wild type*. Per tale motivo negli ultimi anni, l'interesse scientifico si è rivolto alla messa a punto di metodi diagnostici in grado di capire se tali episodi fossero imputabili al ceppo vaccinale o a quello di campo.⁴⁴

Tutta la diagnostica del CPV, dal rilevamento del virus alla distinzione tra i ceppi di campo e vaccinali o ancora alla differenziazioni tra varianti, può avvalersi di più metodi, da quelli tradizionali come i test ELISA, alla più sofisticata biologia molecolare, associabili tra loro per ottenere dei risultati completi e definitivi.

Per la diagnostica in campo del CPV, l'obiettivo è identificare il virus, escludendo la presenza di altri patogeni che possano colpire il gastroenterico generando i medesimi segni clinici; a tale scopo vengono utilizzati dei kit commerciali ad immunocromatografia (IC), oppure nei laboratori di analisi si possono usare test basati sull'emoagglutinazione (HA) e sull'isolamento virale (VI). Queste metodiche però presentano molti punti deboli, quali la dispendiosità in termini di tempo e di costi e una bassa sensibilità. Il motivo è dovuto a più fattori, come l'escrezione di una carica virale bassa, la presenza di anticorpi nel lume intestinale che vanno a mascherare l'antigene virale, o ancora la comparsa di alcuni ceppi che non presentano più la capacità di emoagglutinazione.⁴⁵ Per questo spesso vengono scelte le metodiche biomolecolari come la RFLP-PCR (*Polymerase Chain Reaction Restriction*

Fragment Length Polymorphism) e la RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) che non vengono fuorviate dalla risposta immunitaria, ma necessitano di laboratori e tecnici specializzati nell'applicarle. In particolare la RT-PCR è molto sensibile, permette di rilevare e quantificare i prodotti generati durante lo svolgersi della reazione partendo da una preparazione relativamente semplice del campione, e non richiede una processazione post-PCR riducendo così i tempi richiesti per una normale PCR.⁴⁶

L'applicazione di queste tecniche può essere usata anche per caratterizzare il virus oltre che per la sua individuazione. Inizialmente si utilizzava l'insieme di più metodiche per discriminare le varianti del CPV. Unendo l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) con anticorpi monoclonali (MAbs), l'isolamento virale (VI), la PCR-RFLP ed infine il sequenziamento, si poteva arrivare a definire se il CPV trovato fosse un CPV-2a, CPV-2b o CPV-2c. Ciò tuttavia comportava un grande dispendio di tempo e denaro.⁴⁷ Con la validazione della *Minor Groove Binder* (MGB) *probe assay*, la differenziazione tra le varianti è diventata molto più rapida. Grazie all'utilizzo di MGB, aventi regioni *target* caratterizzate da SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), si ha la possibilità di distinguere le varianti sfruttando le singole differenze genetiche a livello di nucleotidi. Questa tecnica è altamente specifica e sensibile e, grazie alla sua economicità e praticità, è spesso usata come mezzo d'elezione per gli studi epidemiologici votati all'identificazione dei genotipi circolanti.^{35,47}

L'unico punto debole risiede nel basarsi sulla minima differenza degli SNPs per determinare la variante di CPV, poiché significa che anche un singolo cambiamento nella regione legante la *probe* può comportare un errore di caratterizzazione delle varianti.² Questo si è verificato con un CPV-2c trovato in America per il quale non è stato possibile usare la medesima MGB disegnata per il CPV-2c italiano, a causa di una differenza sul codone 440.³⁸

La MGB *probe assay* può essere utilizzata anche come tecnica per distinguere il ceppo di campo da quello vaccinale, definendo se la sintomatologia gastroenterica, comparsa pochi giorni dopo la vaccinazione, sia data da una reversione a virulenza del virus vaccinale o un'infezione sostenuta da un ceppo di campo. A seconda delle caratteristiche delle MGB, è possibile differenziare le varianti, quindi un ceppo di campo CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c, rispetto al vaccino ottenuto sul CPV-2.⁴⁴ Con l'introduzione del vaccino formulato su CPV-2b, le precedenti MGB non erano in grado di discriminare il nuovo ceppo vaccinale dalla variante di campo CPV-2b e si rese quindi necessario sviluppare una MGB che fosse in grado di distinguere i due ceppi.⁴⁸ Questo aspetto delinea come la MGB *probe assay* sia una

tecnica che va continuamente rielaborata e aggiornata in funzione dell'evoluzione e dell'epidemiologia virale, nonché a seconda degli obiettivi prefissati.

Tecniche di sequenziamento: una breve overview

Nella panoramica della virologia e in particolare dell'epidemiologia ad essa applicata, una certa attenzione va rivolta anche alle metodiche di sequenziamento del DNA. Queste permettono infatti di ottenere una mole di informazioni che vanno ben al di là della semplice genotipizzazione degli stipiti circolanti.

La necessità di ottenere ed analizzare le sequenze genetiche degli organismi ad oggi è sempre più pressante e trova applicazioni in moltissimi campi della ricerca.⁴⁹

Il sequenziamento Sanger è stato fino a pochi anni fa il principale metodo utilizzato a livello industriale, grazie al quale si è resa possibile la realizzazione di progetti molto importanti, primo tra questi la ricostruzione dell'intera sequenza del genoma umano.⁵⁰ Questa metodica di sequenziamento è stata introdotta nel 1975 da Fred Sanger, da cui prende il nome, ed è stata modificata nel tempo con lo scopo di rendere massima la sua efficienza.⁵¹ Il principio del sequenziamento Sanger si basa su un processo di sintesi del DNA complementare a un dato *template*, utilizzando due diverse tipologie di nucleotidi, i normali dNTPs e i ddNTPs. Questi ultimi una volta incorporati nel filamento neosintetizzato (o di nuova sintesi) ne impediscono un'ulteriore estensione. Bilanciando in maniera appropriata la quantità dei dNTPs e ddNTPs, si ottengono molti frammenti dello stesso DNA interrotti nella sintesi in punti diversi, ottenendo così altrettante molecole di DNA di diverse lunghezze. Tali frammenti vengono poi separati in base alla lunghezza e al peso tramite elettroforesi capillare, e successivamente analizzati per ottenere la sequenza dell'intera molecola di DNA di partenza. Ciò è possibile in quanto i ddNTPs sono marcati con dei fluorofori di colore diverso a seconda del tipo di base (A,T,G,C). In questo modo quando i frammenti di DNA vengono opportunamente eccitati, emettono una fluorescenza la cui lunghezza d'onda è funzione del nucleotide terminale. Monitorando le variazioni nella fluorescenza determinate dal progressivo susseguirsi di frammenti di dimensioni via via crescenti è possibile ricavare la sequenza del DNA.⁵²

Questa metodica però ha dei limiti importanti che permettono di rispondere in modo solo parziale alle richieste del mondo scientifico, prima tra queste, la necessità di sequenziare grandi moli di DNA. Per tale motivo, negli ultimi anni si sono sviluppate nuove modalità di sequenziamento complessivamente rinominate “*Next Generation Sequencing*” (NGS). Queste

hanno introdotto nuove capacità, che possono aprire importanti prospettive a livello di ricerca ma anche di diagnostica e terapia. Il primo sistema NGS è stato sviluppato nel 2005 e, come per il Sanger, sono stati poi introdotti dei miglioramenti e delle differenziazioni, mirate ad ottimizzare il metodo e a renderlo specifico per l'applicazione in diversi contesti. In particolare si possono trovare NGS ad “*high-capacity sequencers*” e NGS “*long-read sequencers*”. Nonostante alcune differenze tra le due diverse piattaforme, la metodica NGS prevede un processo di base comune ad entrambe e suddivisibile in tre fasi: i) la preparazione della libreria, ii) il legame del DNA ed il suo arricchimento iii) il sequenziamento e l'analisi della sequenza ottenuta.⁵³

Il principale vantaggio rispetto al metodo Sanger, anche definito di prima generazione, è la possibilità di produrre un volume enorme di dati, riducendo così i costi. In particolare è possibile sequenziare rapidamente grandi genomi o sequenziare in contemporanea più molecole. Inoltre il NGS non presuppone necessariamente la conoscenza del DNA di partenza, permettendo così di ricavare la sequenza anche di molecole sconosciute.⁵⁰ Molti sono gli ambiti di applicazione di questa tecnologia in campo biologico e virologico; è infatti possibile utilizzare su larga scala il sequenziamento per studi di metagenomica, per indagare la variabilità virale intra-ospite, e per ottenere una grande mole di genomi virali completi.⁵³ Con riferimento all'epidemiologia molecolare, studiare, nell'intero genoma, la presenza di sotto-popolazioni, può contribuire alla conoscenza del ruolo delle singole mutazioni, dei fenomeni che ne favoriscono la diffusione nella popolazione virale e della loro interazione. Tali conoscenze rappresentano un presupposto fondamentale per la piena della comprensione di come un virus si muove e si modifica nel tempo, nello spazio e nella popolazione ospite.

Scopo e potenzialità dello studio

CPV, presente nella panoramica mondiale da appena 50 anni, risulta un interessantissimo modello che può stimolare l'interesse dei ricercatori sotto molti aspetti. L'intensa variazione genetica, che lo caratterizza, getta le basi per sospettare che la sua corsa evolutiva non si sia conclusa, e nulla esclude che possa fare ulteriori salti di specie. Molti studi hanno poi analizzato in maniera approfondita le varianti di CPV sulla sequenza genetica della VP2, ma poco si conosce del genoma completo e del ruolo che le sue diverse regioni possano aver avuto nella nascita dei diversi genotipi e della loro radicazione nella popolazione. Gli stessi Decaro et al. nel 2009, nell'approfondire lo studio del CPV-2c a livello di VP2, sostengono la

necessità di poter fare un confronto con la sequenza completa del genoma per ottenere maggiori informazioni.³⁰

Per quanto riguarda le varianti sono presenti pochissime indagini che abbiano approfondito la correlazione tra un determinato genotipo e la gravità delle manifestazioni cliniche da questo causato. Un ulteriore aspetto riguarda l'elaborazione di tecniche diagnostiche standardizzabili, capaci di identificare, quantificare e caratterizzare il virus assicurando alta sensibilità e specificità. Infine di notevole interesse è la questione vaccinale, per la quale sono richieste urgenti conferme dell'effettiva protezione fornita agli animali vaccinati.

Nonostante l'ormai preminente ruolo degli animali da compagnia nella società italiana e la quindi notevole rilevanza che questo patogeno riveste a livello economico e sociale, non sono presenti informazioni aggiornate sulla distribuzione di CPV nel nostro Paese. Il presente studio ha perciò l'obiettivo di offrire una panoramica sulla parvovirosi in Italia avvalendosi di mezzi quali l'epidemiologia classica e quella molecolare. Si è quindi scelto di analizzare i principali dati anamnestici e clinici dei pazienti in grado di fornire un quadro epidemiologico generale, invece le altre numerose informazioni a disposizione, verranno sviluppate in studi successivi.

Parallelamente, è stata validata una metodica di PCR e sequenziamento al fine di studiare le sequenze degli stipiti circolanti. La successiva analisi ha permesso di valutarne diversi aspetti tra cui il genotipo, le relazioni filogenetiche tra i ceppi individuati e di confrontarle con quelle di riferimento nelle banche dati. Inoltre, in prospettiva futura, si è ottimizzato un protocollo che permetterà di ottenere i dati da analizzare tramite *Next Generation Sequencing* (NGS).

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI

Per la validazione del protocollo di PCR da utilizzare per l'analisi dei campioni, è stato utilizzato il vaccino *Novibac puppy cp*. Il DNA contenuto nel vaccino è stato estratto utilizzando il kit *Genomic DNA purification with NucleoSpin® Blood* (MACHEREY-NAGEL) seguendo la procedura suggerita dal produttore. Una volta definito il protocollo per l'amplificazione del DNA virale, questo è stato applicato a campioni risultati positivi per CPV durante la normale attività diagnostica e gentilmente messi a disposizione dalla Clinica veterinaria San Marco di Padova; tali campioni provengono sia dall'attività medico-clinica svolta all'interno della Clinica San Marco sia da altri ambulatori dislocati sul territorio nazionale che si rivolgono al Laboratorio della Clinica per l'attività diagnostica. I campioni messi a disposizione consistono in estratto di DNA (ricavato da diverse matrici quali sangue, feci e tamponi fecali), prelevati durante l'attività clinica, e classificati sulla base della quantificazione virale tramite RT-PCR, in tre categorie: titolo virale alto, medio e basso.

Ogni campione possiede un codice di riferimento univoco corrispondente ad un numero identificativo, con il quale è possibile rintracciarlo all'interno del database della Clinica San Marco, tramite il sistema POA&M e associarlo quindi a tutte le informazioni della scheda clinica del paziente.

La selezione dei campioni su cui effettuare le analisi del presente lavoro è stata operata partendo dal totale di 400 campioni stoccati e riferiti agli anni 2008-2015, cercando di assicurare la massima casualità nella scelta ma rispettando parallelamente altri criteri di selezione:

- i) titolo virale, al fine di utilizzare i campioni potenzialmente più efficienti in termini di risultati positivi per ottenere sequenze complete e di buona qualità. Il dato sulla carica virale è presente nella routine diagnostica solo a partire dal 2008 poiché introdotta in quell'anno la metodica di RT-PCR;
- ii) rappresentazione temporale: si è cercato di avere un numero rappresentativo per ogni anno in funzione del numero di campioni stoccati per anno;
- iii) origine dei campioni: primariamente è stata selezionata una popolazione di campioni appartenente a pazienti interni, perché associati a molte informazioni cliniche che potranno

essere utilizzate in studi successivi a questo. Al fine però di garantire anche la massima rappresentazione geografica, sono stati inclusi nello studio anche campioni provenienti da pazienti esterni alla clinica di ambulatori del territorio nazionale.

Tale selezione ha condotto al recupero di 216 campioni sui 400 disponibili.

Sostanzialmente un primo gruppo di 38 campioni è stato destinato al protocollo di sequenziamento standard con metodica Sanger; un secondo gruppo di 96 campioni è stato invece amplificato e preparato per un futuro sequenziamento tramite *Next Generation Sequencing*.

Tutti i campioni prelevati sono stati conservati e stoccati a -20°C fino all'inizio delle analisi.

2.2 DATABASE

Per gestire al meglio i campioni, l'avanzamento delle analisi e i risultati ottenuti è stato organizzato un archivio, regolarmente aggiornato, in Microsoft Excel (2010).

A ciascun campione identificato tramite il numero corrispondente nel database POA&M sono stati associati, quando disponibili, i seguenti dati.

- NUMERO IDENTIFICATIVO del campione fornito dal POA&M
- MATRICE
- ANNO di prelievo
- ORIGINE (paziente interno/esterno)
- PROVINCIA di origine del paziente
- SESSO
- RAZZA
- ETÀ
- Quantificazione e classificazione (alta/media/bassa) della carica virale
- Risultato della PCR
- SEQUENZA
- DECESSO (entro i 28 gg.) e STATO VACCINALE (questi dati erano presenti solo per i pazienti interni alla clinica).

2.3 SEQUENZIAMENTO SANGER

2.3.1 SCELTA E DISEGNO DEI PRIMER

Al fine di mettere appunto e validare un protocollo per l'amplificazione del DNA virale, è stata utilizzata una coppia di *primer* descritta da di Pérez et al.¹¹ (VP-F/VP-R). I *primer* sono stati scelti in modo da garantire l'amplificazione del tratto genomico corrispondente alla VP1 e quindi anche VP2 in essa contenuta. Questo tratto genomico è la parte più studiata in quanto racchiude la maggior parte delle informazioni di interesse sulle mutazione e permette la genotipizzazione di CPV.

Altri *primer*, interni alla VP1, sono stati disegnati tramite il programma Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) al fine di permettere il sequenziamento dell'intera VP1 garantendo, per ciascuna posizione nucleotidica, un'adeguata qualità del segnale nel cromatogramma (vedi tabella 1).

Nella scelta delle caratteristiche chimico-fisiche dei *primer* si sono ottemperati i requisiti suggeriti dalla ditta di sequenziamento prescelta.

2.3.2 PROTOCOLLO PCR E VALIDAZIONE

La prima fase è stata finalizzata alla validazione del protocollo da utilizzare, in modo che fosse possibile ottenere un buon amplificato da campioni contenenti CPV. A questo scopo l'enzima utilizzato è stato una DNA polimerasi *high fidelity* (i.e. Phusion Hot Start II DNA Polymerase-Life Technologies) in modo da minimizzare la mis-incorporazione di nucleotidi. Scelto l'enzima, si è utilizzato il protocollo suggerito dal kit, apportando alcune modifiche con l'obiettivo di massimizzare la resa della reazione e ridurre la presenza di amplificati aspecifici. Le performance e la sensibilità del metodo è stata valutata tramite diluizioni seriali del DNA vaccinale: tal quale, 1:100, 1:1000 e 1:10000. I fattori su cui si è agito sono stati molteplici. A partire dalla mix di reazione, nella quale è stata modificata più volte la concentrazione dei *primer*, variandola in un range che andava da 0,2 a 0,6 μ M. Ottenuta la miscela più adatta allo scopo, si è cercato di individuare la corretta proporzione tra DNA e mix di reazione nel volume finale. Anche in questo caso si sono fatte diverse prove partendo da un quantitativo di 5 μ l di DNA in 30 μ l di reazione, fino a 1 su 40. Alcune modifiche hanno poi coinvolto il protocollo termico; sono state infatti ottimizzate le temperature di *annealing* impostando, nella medesima corsa, un gradiente di temperatura nelle diverse

posizioni del termoblocco. Invece per l'*extension* è stato variato il tempo previsto per questa fase.

Una volta trovata la migliore combinazione tra queste variabili e, considerato validato il protocollo, esso è stato applicato a circa 60 campioni di interesse, con l'intento di ricavarne almeno 38 (ovvero due piastre di sequenziamento Sanger – vedi oltre) da poter sequenziare. Essendo già nota la positività dei campioni ad ogni reazione è stato aggiunto il solo bianco come controllo negativo. Tutte le reazioni sono state eseguite tramite termociclatore T-gradient.

2.3.3 ELETTROFORESI

I prodotti di PCR sono stati caricati con addensante *6X DNA Loading Dye*[®] (Thermo Fisher Scientific) su gel agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution*[®] (EuroClone S.p.A.) e sottoposti a una differenza di potenziale costante di 100V per 20 minuti in buffer TBE 1X. Dopo la corsa elettroforetica le bande sono state visualizzate con il trans illuminatore *Gel Doc XR Sistem*[®] (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette). La lunghezza e la specificità di ogni amplificato sono state valutate tramite comparazione con uno standard a peso molecolare e a concentrazione noti, *GeneRuler 100bp DNA Ladder*[®] (Thermo Fisher Scientific), caricato su gel assieme ai campioni. Il confronto con il marcatore di peso molecolare ha permesso inoltre di stimare la concentrazione di DNA presente in ogni banda. I campioni per le successive fasi sono stati selezionati qualora la concentrazione della banda fosse superiore a 50 ng/μl e non fossero presenti amplificati aspecifici.

2.3.4 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR E ALLESTIMENTO PIASTRE

La purificazione degli amplificati ottenuti si è resa necessaria per agevolare il sequenziamento, eliminando i *primer*, sali, nucleotidi ed enzimi, residuati dalla reazione di PCR e che avrebbero potuto inibire i passaggi successivi. A tal fine è stato utilizzato il kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) secondo le specifiche fornite dalla ditta produttrice. I purificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel per confermarne la qualità.

L'allestimento delle due piastre per il sequenziamento è stato preceduto da una fase di organizzazione dei campioni e di stima delle quantità di purificato da sottoporre alla reazione. Ogni piastra è stata allestita con 19 campioni utilizzando cinque *primer*, i due utilizzati per la

validazione del metodo, VP-F e VP-R, e altri tre disegnati appositamente per il sequenziamento VP-R2, VP-F3 e VP-F4 (vedi tabella 1). Le piastre una volta allestite sono state inviate ai laboratori della MACROGEN per essere processato con un sequenziamento Sanger.

2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Al giorno d'oggi le sequenze dell'intero genoma di CPV, depositate nelle banche dati, sono molto poche, e si rende sempre più urgente la necessità di studiare questo virus nella sua globalità. L'opportunità di ampliare il database con le sequenze complete di CPV potrebbe essere fornita dal *Next Generation Sequencing* (NGS).

2.4.1 DISEGNO DEI PRIMER E VALIDAZIONE

Le coppie di sono state scelte in modo da garantire l'amplificazione di tutto il tratto genomico attraverso la formazione di due ampliconi in parte sovrapposti. I *primer* NS-F/NS-R, e VP-F/P-R sono stati disegnati secondo le istruzioni di Pérez et al.¹¹; da ogni coppia di *primer* si è ottenuto un amplicone, corrispondente rispettivamente a NS (lungo 2254 bp) e a VP (lungo 2662 bp). La mix di reazione contenente i *primer* per la VP è stata mantenuta uguale a quella formulata per la precedente validazione. Per quanto riguarda il tratto della NS si è proceduto alla validazione del metodo utilizzando il medesimo approccio precedentemente descritto.

Primer	Seq(5-3)	
NS-F	GACCGTTACTGACATTCGCTTC	forward
NS-R	GAAGGGTTAGTTGGTTCTCC	reverse
VP-F	TTGGCGTTACTCACAAAGACGTGC	forward
VP-R	ACCAACCACCCACACCATAACAAC	reverse
Seq_VP1_R2	AAACTTTAGTTGGTGGCTGAG	reverse
Seq_VP1_F3	CCAGGAGATTGGCAACTAAT	forward
Seq_VP1_F4	CAACAAGATAAAAGACGTGGTG	forward

Tab.1. *Primer* utilizzati per l'amplificazione del genoma.

2.4.2 ELETTROFORESI

La visualizzazione dei prodotti di PCR e la selezione è avvenuta secondo gli stessi criteri prima descritti. In questo caso però i campioni dovevano presentare per entrambi gli amplificati, VP e NS, una concentrazione superiore a 50 ng/μl in assenza di amplificati aspecifici. Per ottenere i 96 campioni richiesti per il NGS si sono testati circa 160 campioni, quelli soddisfacevano ai requisiti sopraindicati sono stati conservati e stoccati a -20°C, in attesa di essere inviati al laboratorio di sequenziamento in un futuro progetto.

2.5 ANALISI DELLE SEQUENZE

La qualità dei cromatogrammi ottenuti è stata preliminarmente valutata tramite FinchTV (<http://www.geospiza.com>) e successivamente le sequenze consenso sono state assemblate utilizzando CromasPro (CromasPro Version 1.5). Al fine di permettere la comparazione con una ampio database di sequenze depositate in database pubblici per le successive analisi è stato utilizzato il tratto corrispondente alla sola VP2. Alle sequenze ottenute nel presente studio è stata aggiunta una raccolta di sequenze di VP2 campionate a livello mondiale. Quando disponibile, lo stato di origine, la specie ospite e l'anno di campionamento sono stati codificati nel nominativo della sequenza. Al fine di considerare la natura codificante della regione presa in analisi, l'allineamento è stato effettuato a livello amminoacidico con il metodo MAFFT⁵⁴ implementato in TranslatorX⁵⁵ e successivamente la sequenza nucleotidica è stata sovrainposta. Tutti gli stipiti sono stati genotipizzati utilizzando i marker amminoacidi (amminoacidi in posizione 80, 87, 426) descritti da CANIO. Al fine di automatizzare il processo sono stati realizzati degli appositi script utilizzando R (<http://www.R-project.org>) (disponibili su richiesta). Le relazioni filogenetiche fra i diversi ceppi sono state definite ricostruendo degli alberi filogenetici utilizzando una approccio di Neighbour-Joining implementati nel pacchetto Ape⁵⁶ di R. Al fine di rappresentare graficamente le relazioni epidemiologiche fra stipiti campionati in Italia ed in altri stati ricostruiti degli “*haplotype network*” specifici per ciascun genotipo utilizzando il metodo Median-Joining implementato in Network 4.6.1.2. (<http://www.fluxus-technology.com>).

2.6 ANALISI DELLE FREQUENZE

Le informazioni contenute nei record del database dei soggetti positivi a CPV sono state analizzate producendo frequenze per le variabili “ORIGINE del campione, ANNO di prelievo, PROVINCIA di provenienza, ETA’, SESSO e RAZZA”. A questo proposito sono stati anche costruiti grafici e tabelle per rappresentare le diverse frequenze di risposta. Per il confronto statistico delle frequenze per le medesime variabili tra la popolazione di pazienti interni alla clinica e esterni è stato condotto mediante l’utilizzo del test Chi-quadrato e sue eventuali correzioni (Yates). Limitatamente alla popolazione di pazienti interni alla Clinica, essendo disponibili le informazioni VACCINAZIONE e DECESSO (entro 28 gg), lo stesso test è stato impiegato per testare la loro associazione con l’età dei soggetti.

Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come soglia di significatività statistica.

2.7 CLASSIFICAZIONE DEL GENOTIPO

La classificazione delle varianti è stata fatta seguendo le indicazioni di Decaro et al.² secondo una differenziazione tramite marker amminoacidici. In particolare la lisina in posizione 80 è stata utilizzata per discriminare FPV da CPV, la leucina in posizione 87 per differenziare CPV-2 dal CPV-2a e dalle altre varianti, mentre la presenza dell’asparagina, dell’aspartato e del glutammato in posizione 426 ha permesso di discriminare rispettivamente tra i genotipi CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c.

Aa residue	80	87	93	101 ^b	103	232	297	300	305	323	375	426 ^c	555	564	568
Nt position	3024-3026	3045-3047	3063-3065	3087-3089	3093-3095	3480-3482	3675-3677	3684-3686	3699-3701	3753-3755	3909-3911	4062-4064	4449-4451	4476-4478	4488-4490
Codon observed	AAA (Lys) AGA (Arg)	ATG (Met) TTG (Leu)	AAA (Lys) AAC (Asn) AAT (Asn)	ATT (Ile) ACT (Thr)	GUA (Val) GCA (Ala)	GTA (Val) ATA (Ile)	TCT (Ser) GCT (Ala)	GCT (Ala) GGT (Gly)	GAT (Asp) TAT (Tyr)	GAC (Asp) AAC (Asn)	AAT (Asn) GAT (Asp)	AAT (Asn) GAT (Asp) GAA (Glu)	GTA (Val) ATA (Ile)	AAT (Asn) AGT (Ser)	GCT (Ala) GGT (Gly)
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
New CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
New CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
Asp-300 (2a/2b)	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn (2a) Asp (2b)	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Ser	Gly

Tab.2. Differenze amminoacidiche nella proteina VP2 tra FPV e CPV.²

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 VALIDAZIONE PROTOCOLLO

Le varie prove svolte durante la fase di validazione hanno portato a definire dei protocolli di PCR che hanno permesso di ottenere un buona resa di reazione (i.e. concentrazione di amplificato) in assenza di amplificati/prodotti aspecifici. Nello specifico la mix di reazione comprendeva; Phusion buffer GC 1X, *primer* VP-F, VP-R con concentrazione 0,6 μ M (vedi Tab. 1), dNTP 200 μ M, Phusion high fidelity 1U, 1 μ L di DNA target e H2O ultra pura fino al raggiungimento di un volume finale di 40 μ L. Il protocollo termico prevedeva una prima fase di attivazione enzimatica ad una temperatura di 98°C per 30 secondi; a questa segue il ciclo vero e proprio composto da una fase di denaturazione a 98°C per 10 secondi, una fase di *annealing* a 60°C per 20 secondi, e una fase di *melting* a 72°C per 160 secondi. Il numero di cicli ritenuti necessari all'amplificazioni è di 45. In ultimo si è impostata l'estensione finale a 72°C per due minuti. Per l'amplificazione della regione corrispondente ai geni NS si sono mantenute le medesime condizioni di reazione e del ciclo termico, variando solamente i *primer* (i.e. NS-F, NS-R) che sono stati utilizzati ad una concentrazione 0,5 μ M.

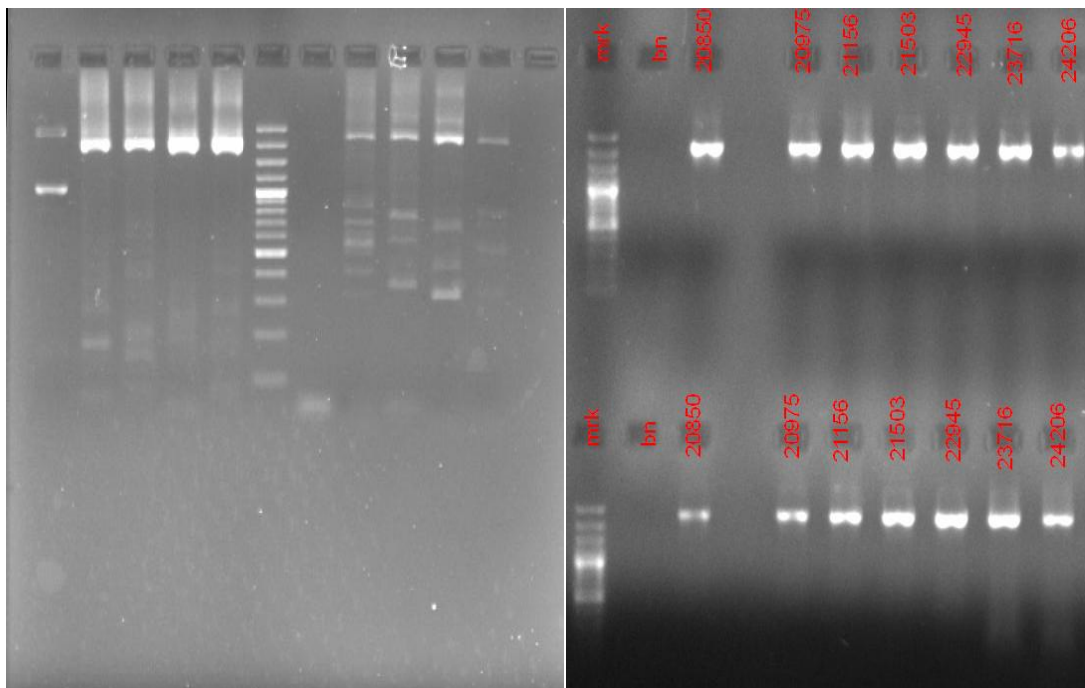


Fig. 2. A sinistra il confronto tra i risultati ottenuti nelle prime prove durante la fase di validazione del protocollo di PCR e, a destra, i risultati finali ottenuti con il protocollo di PCR definitivo.

ID	POA	PROVENIENZA	ANNO	PROVINCIA	SESSO	ETA'	RAZZA	GENOTIPO	VACCINAZIONI	DECESSO
1	7453	I	2008	BO	M	2	CANE CORSO	2C	IGNOTE	SI
2	10379	I	2009		F	3	CHIHUAHUA	2A	REGOLARI	NO
3	17510	I	2011	PD	M	35	METICCIO	2C	IRREGOLARI	NO
4	21201	I	2013	VR	M	7	BEAGLE	2C	REGOLARI	NO
5	21780	I	2013	PD	M	5	LABRADOR RETRIEVER	2B	IRREGOLARI	NO
6	22869	I	2013	PD	M	2	SHIH-TZU	2C	IRREGOLARI	NO
7	24804	I	2014		M	2	LABRADOR RETRIEVER	2A	REGOLARI	NO
8	4096	E	2008	SP				2		
9	4719	E	2008	VE	F	3	METICCIO	2A		
10	8170	E	2009	FI	F	4	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	2B		
11	8586	E	2009	PV	M	7	PASTORE TEDESCO	2A		
12	11237	E	2010	PN	M	3	SHAR PEI	2A		
13	11655	E	2010	PG	M	4	VOLPINO DI POMERANIA	2A		
14	14714	E	2011	RI	F	2	PINSCHER	2B		
15	15018	E	2011	PG	M	6	ARIEGEOIS	2A		
16	15160	E	2011	FI	F	3	METICCIO	2C		
17	15989	E	2011	LE	M	4	ROTTWEILER	2A		
18	16806	E	2011	BL	M	3	KING CHARLES SPANIEL	FELINE		
19	20749	E	2012	CN	M	6	BORDER COLLIE	2B		
20	18354	E	2012	VI	M	3	WEST HIGHLAND WHITE TERRIER	2A		
21	18473	E	2012	RI	M	6	PASTORE MAREMMANO ABRUZZESE	2A		
22	18893	E	2012	PU	F	2	SETTER INGLESE	2C		
23	19724	E	2012	BL	F	2	SETTER GORDON	2B		
24	20401	E	2012	RM	F	0	METICCIO	2A		
25	20608	E	2012	SS	M	3	BASSOTTO TEDESCO A PELO LISCIO	2A		
26	22058	E	2013	PD	M	2	METICCIO	2A		
27	25095	E	2014	VT	M	6	METICCIO	FELINE		
28	25457	E	2014		F		MALTESE	2A		
29	26156	E	2014	RM	M	36	METICCIO	2B		
30	27226	E	2014	RI	F	5	AKITA INU	2B		

Tab. 3. Elenco dei 30 campioni dai quali si è ottenuta la sequenza e ed il genotipo, con relativi dati riguardo provenienza, anno di campionamento, provincia, sesso, età (in mesi) e razza. Per i pazienti interni si è potuto risalire anche alla storia vaccinale ed eventuale decesso entro i 28 giorni

3.2 ANALISI BIOINFORMATICHE DELLE SEQUENZE

3.2.1 DISTRIBUZIONE TEMPORALE DEI GENOTIPI

Le sequenze della VP2 di CPV italiani, comprendenti quelle in precedenza pubblicate da altri autori e quelle ottenute nel presente studio, sono state utilizzate per osservare la frequenza dei diversi genotipi nel nostro territorio. Le sequenze a disposizione sono state tradotte e suddivise in genotipi secondo i criteri descritti (cfr. materiali e metodi 2.7). E' stata quindi calcolata la frequenza dei genotipi per anno dal 2000 fino al 2014, normalizzando i dati sul numero di casi verificatosi annualmente. Tale conteggio fornisce un'idea delle dinamiche di una variante rispetto all'altra nella popolazione di cani malati. È bene sottolineare che per una reale stima della prevalenza dei genotipi sarebbe necessario avere le sequenze di un campione rappresentativo di stipiti di CPV in Italia in relazione alla popolazione ospite. Tale obiettivo, nella pratica, non è facilmente perseguibile poiché i casi di malattia non sempre arrivano al veterinario, e anche in tale eventualità, i metodi diagnostici mirano alla identificazione dell'agente eziologico piuttosto che alla sua genotipizzazione. Anche la distribuzione temporale e spaziale dei dati in nostro possesso ne complica l'interpretazione in quanto le sequenze a disposizione sono relative a particolari studi epidemiologici dove il campionamento è stato mirato (e.g. canili) o legato ad una struttura (come la Clinica alla quale ci siamo appoggiati per avere i campioni dell'attuale lavoro), che per quanto esposta su un vasto territorio come referenza clinica, rappresenta comunque un osservatorio epidemiologico puntiforme. Quindi, considerato il bias di campionamento, attualmente non risulta semplice caratterizzare la reale distribuzione dei casi di parvovirosi in funzione del genotipo di CPV sul territorio italiano; similmente, l'assenza di sequenze precedenti al 2000, non permette un confronto fra l'andamento della frequenza di CPV negli anni in Italia con quanto riportato nel resto del mondo. Partendo da tali considerazioni, è comunque possibile avanzare delle ipotesi sulla prevalenza reale in Italia di CPV, supportate dai dati che caratterizzano il *trend* temporale della distribuzione genotipica nel mondo. Possiamo osservare quindi, che in Italia, il CPV-2c è la variante più presente e a seguire si hanno CPV-2a e CPV-2b (Fig. 3). Nel secondo grafico invece è riportata la frequenza di ogni genotipo a partire dal 1979 fino al 2014, su scala mondiale. Il genotipo CPV-2a è il più frequentemente riscontrato (Fig. 4).

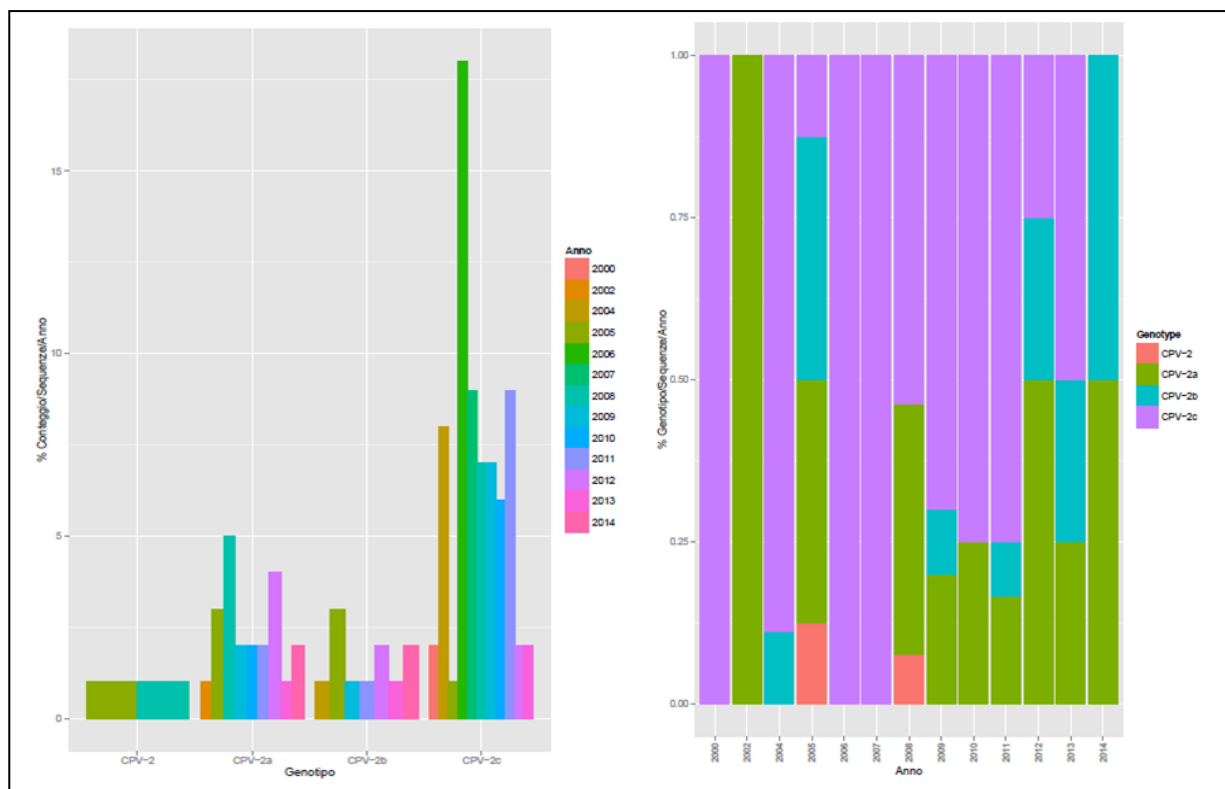


Fig. 3. A sinistra il conteggio dei casi di malattia per anno suddivisi in base al genotipo e, a destra, la frequenza percentuale di ogni genotipo per anno, normalizzata sul totale delle sequenze depositate annualmente, in Italia.

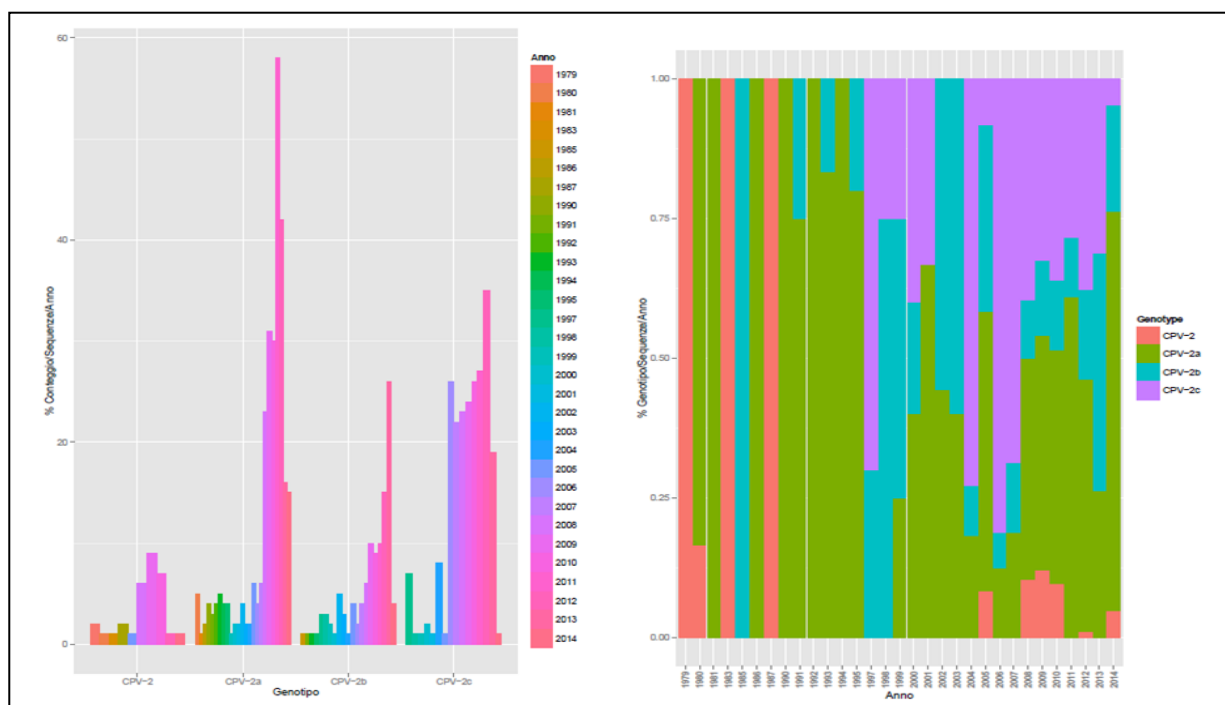


Fig. 4. A sinistra il conteggio dei casi di malattia per anno suddivisi in base al genotipo e, a destra, la frequenza percentuale di ogni genotipo per anno, normalizzata sul totale delle sequenze depositate annualmente, nel mondo.

Nonostante questa apparente contraddizione, considerando solo le sequenze ottenute nel presente lavoro, lo scenario italiano appare potenzialmente influenzato dalla origine geografica dei campioni: nel gruppo di campioni da noi sequenziati prevale infatti il genotipo CPV-2a, con ben 14 sequenze sulle 30 ottenute, dato epidemiologicamente in accordo con quanto riportato a livello mondiale. Interessante è la presenza di alcuni casi di malattia imputabile al CPV-2, storicamente considerato estinto, la cui sequenza è stata riscontrata sia in Cina che in uno dei campioni di questo studio tra gli anni 2008 ad oggi. Questo fatto può trovare una spiegazione nella reversione a virulenza di uno dei vaccini in commercio basato su CPV-2, anche se improbabile vista la grande stabilità dei cippi vaccinali, o a un'infezione da un virus di campo concomitante alla somministrazione vaccinale.⁵⁷

3.2.2 NETWORK FILOGENETICI

Tutte le sequenze della VP2 a disposizione, sono state divise in gruppi a seconda del genotipo, e con ognuno di questi gruppi si è creato un network per analizzare la loro presenza nei diversi stati. Ogni network rappresenta le relazioni filogenetiche fra aplotipi, ovvero sequenze fra loro identiche. Le connessioni sono state stabilite secondo un criterio di parsimonia, favorendo il percorso evolutivo che spiegasse le relazioni fra sequenze implicando il minor numero di mutazioni. Qualora più traiettorie evolutive risultassero egualmente parsimoniose sono state introdotte delle reticolazioni. Il diametro dei nodi (ciascuno dei quali rappresenta un aplotipo) dipende dal numero di ceppi con quella determinata sequenza. Infine, con i colori, si è voluto evidenziare l'appartenenza ad una determinata macroregione. Presi in considerazione tali aspetti, dalla visione di insieme di questi network sono comunque intuibili varie informazioni. Principalmente non è percepibile un punto di inizio, ovvero la presenza di una sequenza di origine con la seguente evoluzione delle altre a partire da questa. Ci sono molti nuclei di aplotipi numerosi, da cui si diramano *spot* più piccoli, ma nulla impone che siano stati i primi a generare i secondi e viceversa, inoltre la presenza di sequenze molto simili, appartenenti a macroaree differenti, anche geograficamente lontane, fa supporre che ci sia una significativa circolazione degli stipiti che coinvolge continuamente Stati diversi. Dal network, si intuisce poi, che queste nuove introduzioni possono avere esiti diversi: diventare fondi ciechi, ovvero l'entrata di un ceppo in uno Stato che rimane un caso sporadico ed isolato; oppure trovare condizioni favorevoli, con ceppi che circolano e si differenziano mantenendosi nella popolazione. Tale scenario risulta

vero anche nel contesto italiano in cui alcune sequenze vanno a costituire dei gruppi isolati con sequenze simili o identiche a quelle campionate in macroaree molto distanti anche tra loro; altre invece formano dei *cluster* separati a riprova di un'iniziale introduzione di un ceppo straniero, che poi ha continuato a circolare in Italia, differenziandosi dalle antenate di origine. Questo tipo di osservazioni sono molto evidenti nei network di CPV-2a e di CPV-2b (Fig. 5-6). Decisamente particolare è il network costruito per il CPV-2c: le sequenze presenti sono molto più simili tra loro se non uguali per la maggior parte dei casi, inoltre sembrano originare tutte da un nucleo unico centrale che raccoglie sequenze vicine geneticamente ma segnalate in regioni diverse (Fig. 7). Un'interessante spiegazione riguarda la possibilità che essendo emerso più recentemente rispetto agli altri genotipi, sia solo all'inizio di quella fase di espansione che poi lo porterà a circolare in stati diversi, differenziandosi e caratterizzandosi all'interno di questi. Un'ulteriore ipotesi, osservando l'omogeneità delle sequenze di CPV-2c, è che questo genotipo risulti vincente dal punto di vista evolutivo favorendone la diffusione nell'ambiente.

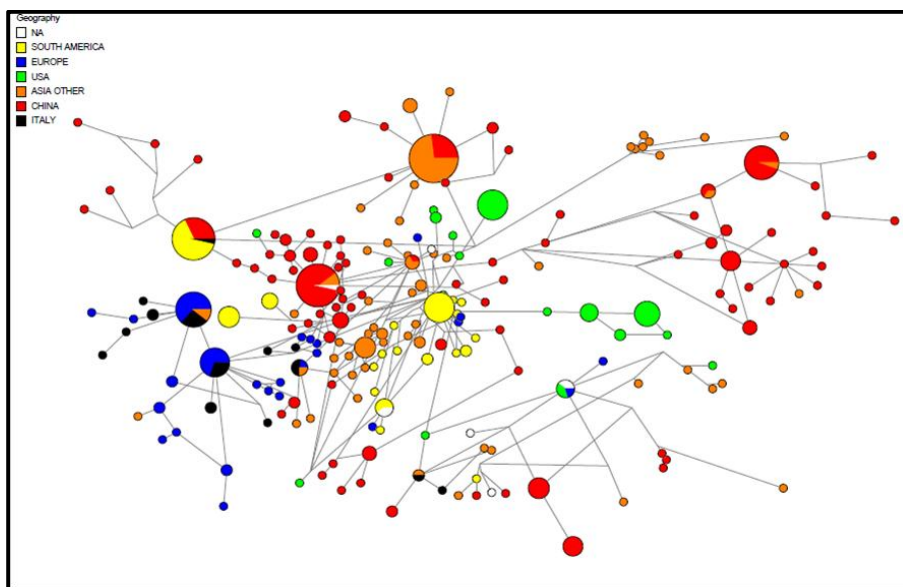


Fig. 5. Median-Joining (MJ) network di CPV-2a. Gli aplotipi sono raggruppati in base alla classificazione del genotipo. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alle frequenze. Gli aplotipi sono colorati in base alle regioni dove sono stati raccolti i campioni mentre i campioni italiani sono colorati in nero.

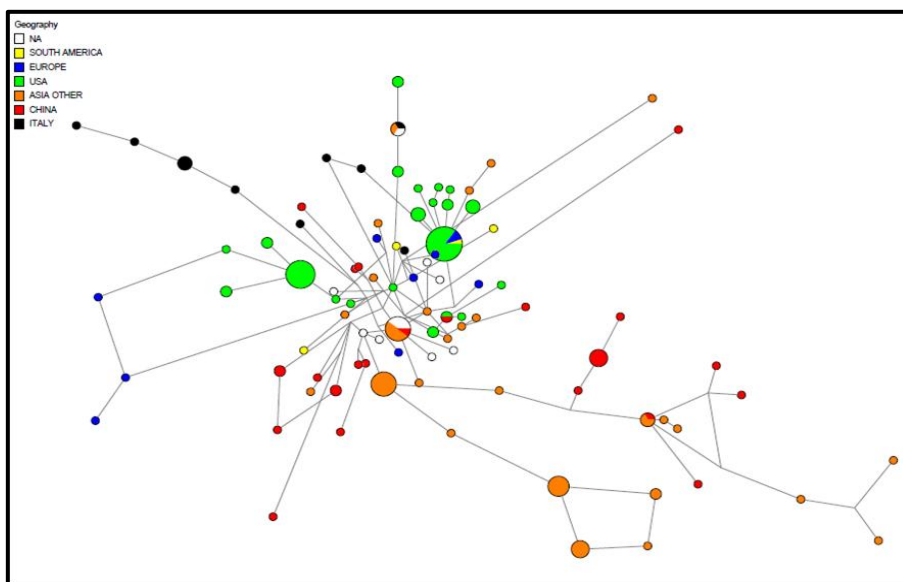


Fig. 6. Median-Joining (MJ) network di CPV-2b. Gli aplotipi sono raggruppati in base alla classificazione del genotipo. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alle frequenze. Gli aplotipi sono colorati in base alle regioni dove sono stati raccolti i campioni mentre i campioni italiani sono colorati in nero.

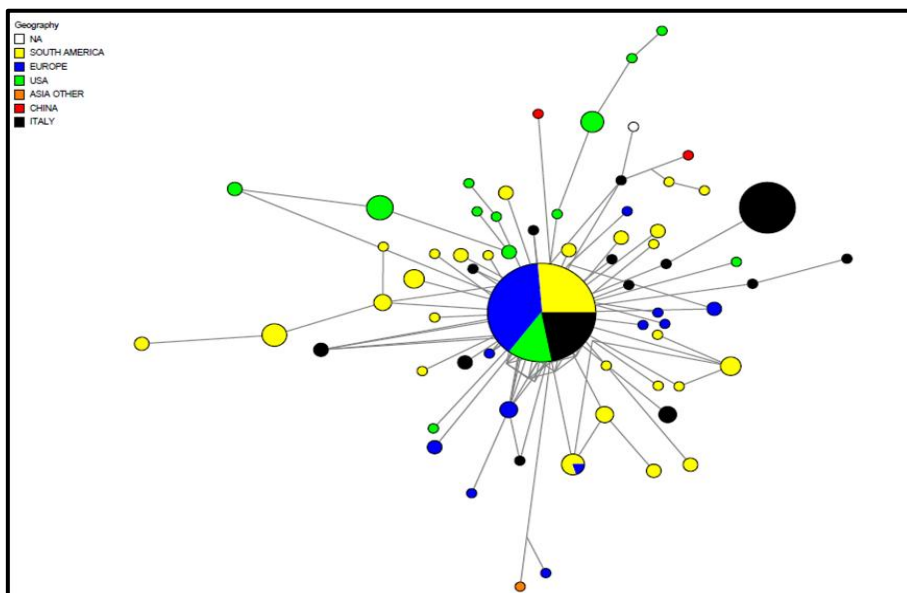


Fig. 7. Median-Joining (MJ) network di CPV-2c. Gli aplotipi sono raggruppati in base alla classificazione del genotipo. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alle frequenze. Gli aplotipi sono colorati in base alle regioni dove sono stati raccolti i campioni mentre i campioni italiani sono colorati in nero.

3.2.3 ALBERI FILOGENETICI

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando tutte le sequenze della VP2 dei CPV ricavate dai vari database esistenti, complessivamente in numero di 1023. Nell'analisi dell'albero filogenetico, l'obiettivo è di poter studiare le relazioni evolutive tra i ceppi italiani e quelli sequenziati nel resto del mondo (Fig. 8). È stato scelto come *outgroup* il clade costituito dalle sequenze di FPV. Le sequenze italiane rispetto alla panoramica mondiale non tendono a formare dei clade propri, e sono visibili due pattern che rispecchiano quanto detto in precedenza. Alcuni ceppi si trovano in un contesto isolato, vicini filogeneticamente a stipiti geograficamente distanti, a riprova di introduzioni casuali nel territorio. Altri ceppi invece appartengono a clade più numerosi di sole sequenze italiane, che probabilmente si sono evolute rapidamente differenziandosi da un antenato comune di partenza. Si nota però, che anche in questo caso di apparente raggruppamento tra ceppi, gli antenati di origine di ogni clade appartengono a stipiti diversi, richiamando nuovamente la possibilità di frequenti introduzioni di CPV. Per ogni sequenza è stato inoltre definito il genotipo in modo tale da poter individuare la distribuzione delle sue varianti nell'albero filogenetico (Fig. 9). Al contrario di quanto ci si possa aspettare, la suddivisione dei genotipi non avviene in maniera netta, con quattro *cluster* monofiletici originati da antenati distinti e riferibili a CPV-2, CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, ma sono presenti stipiti appartenenti a genotipi diversi che si intercalano ad altri genotipi. Questa situazione può essere imputata alla mancata corrispondenza tra nomenclatura genotipica basata su marker amminoacidici e l'origine filogenetica del ceppo considerato. Per esempio in questo studio si definisce genotipo CPV-2c un virus con il glutammato in posizione 426, ma nell'albero vediamo come le sequenze di alcuni ceppi CPV-2c, siano più simili a sequenze appartenenti ad un clade 2b o 2a. Una possibile spiegazione prende in considerazione l'effetto di una singola mutazione sulla *fitness* virale: la presenza di tale amminoacido potrebbe conferire un vantaggio evolutivo ai ceppi che ne sono portatori, favorendo quindi un'evoluzione convergente, verso un dato amminoacido, di ceppi aventi origini diverse. Questo diventa quindi un problema a livello epidemiologico perché, come è accaduto in questo studio, non permette la classificazione univoca di un ceppo all'interno di un determinato genotipo.

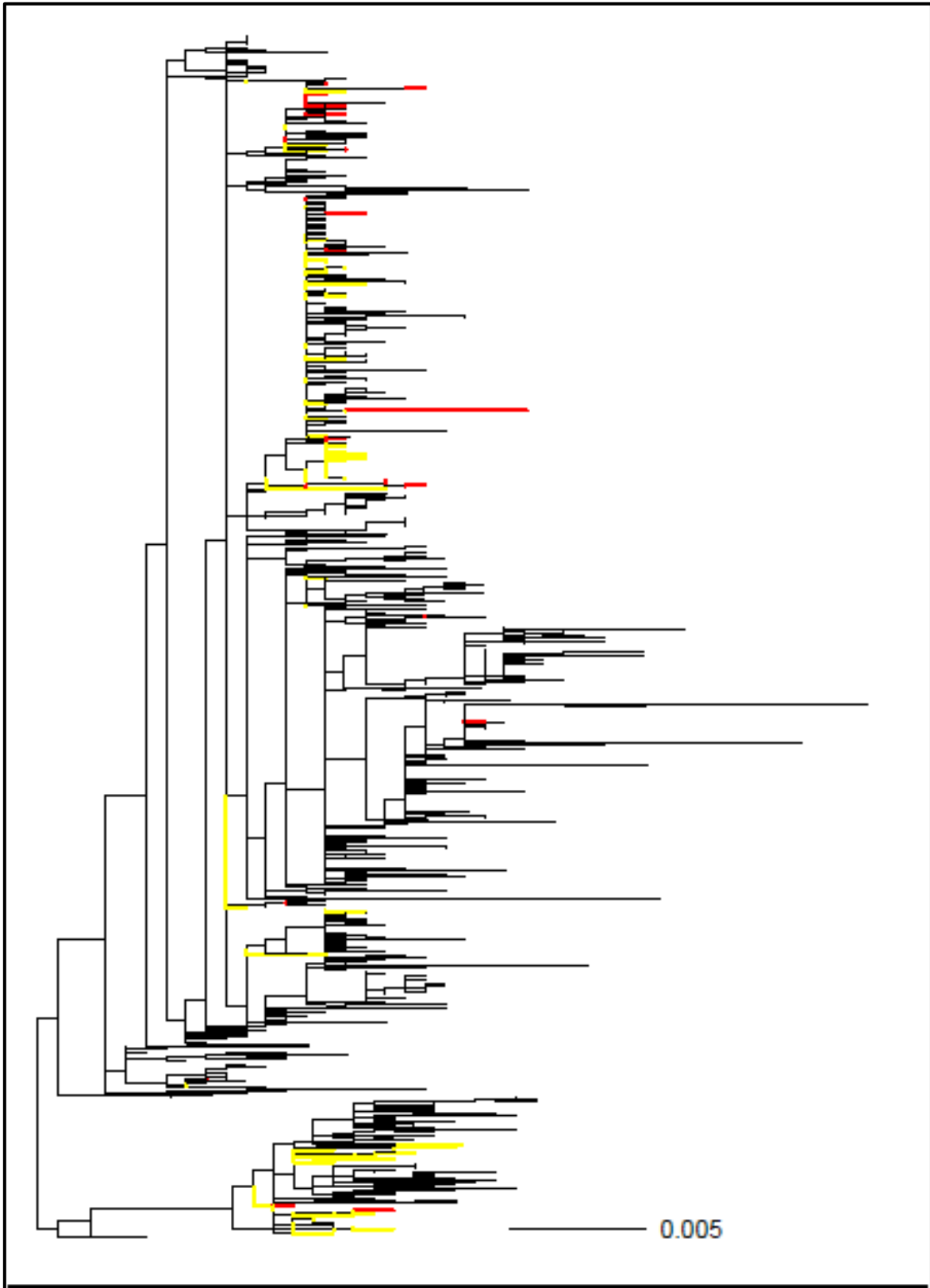


Fig. 8. Albero filogenetico costruito sulla sequenza del gene VP2 dei Parvovirus canino e felino, utilizzando il metodo Neighbor-Joining (NJ) con 1000 replicati di *bootstrap*. La lunghezza dei rami è espressa in termini di *p-distance*. Sono evidenziate in rosso le 30 sequenze dei campioni analizzati in questo studio e in giallo le sequenze italiane.

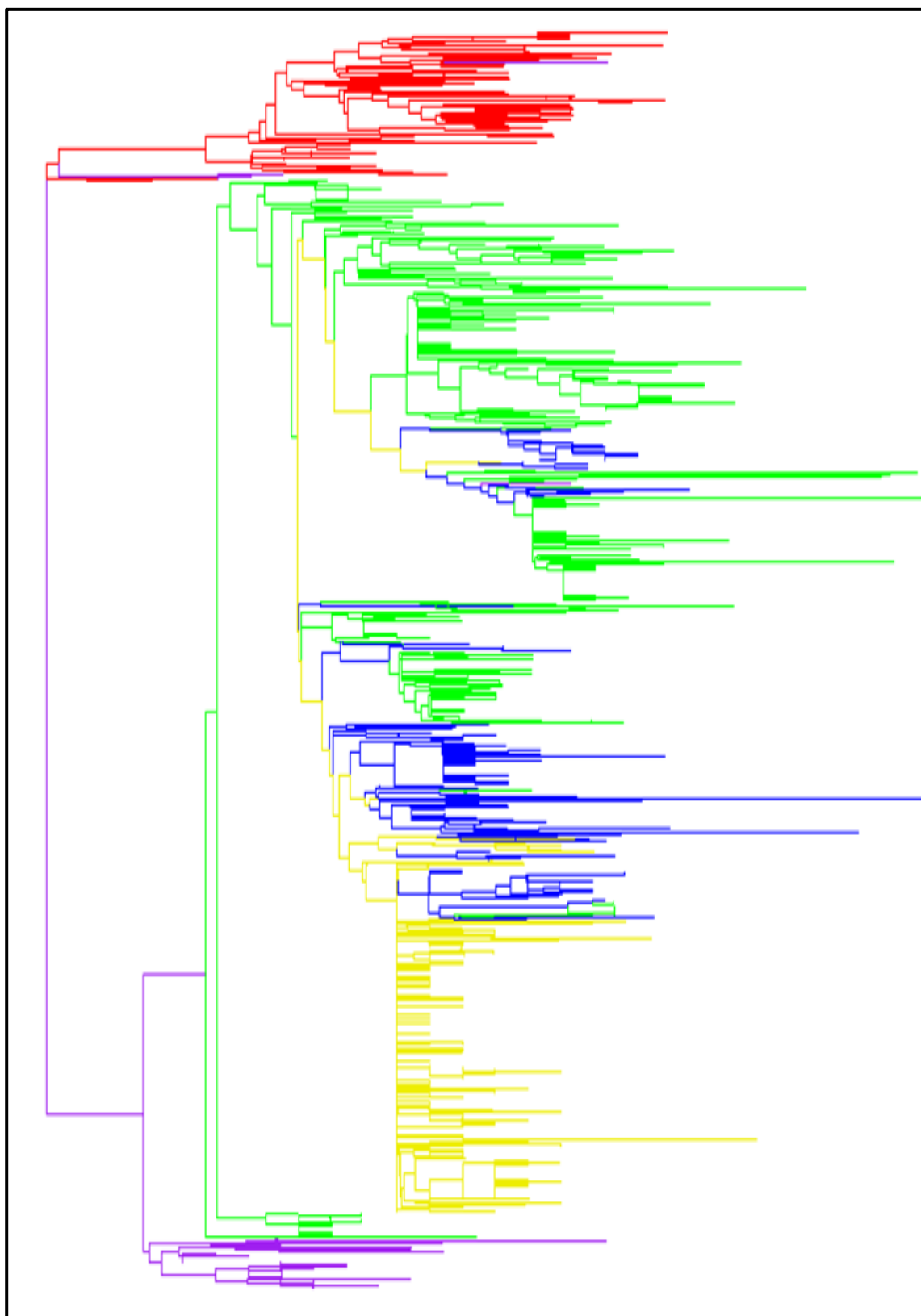


Fig. 9. Albero filogenetico costruito sulla sequenza del gene VP2 dei Parvovirus canino e felino, utilizzando il metodo Neighbor-Joining (NJ) con 1000 replicati di *bootstrap*. La lunghezza dei rami è espressa in termini di *p*-distance. I colori sono associati a ciascun genotipo: FPV (rosso), CPV-2 (viola), CPV-2a (verde), CPV-2b (blu) e CPV-2c (giallo).

Inoltre si tratta anche di un problema diagnostico, poiché le metodiche utilizzate per la genotipizzazione fanno riferimento, nella sierologia ad un singolo epitopo, e nella PCR a differenze di singoli nucleotidi, e non prendono in considerazione l'intera struttura genetica. Conseguentemente, queste metodiche risentono del fenomeno sopradescritto e non rappresentano le reali relazioni evolutive fra i virus.

3.2.4 RISULTATI INATTESI: FELINE PARVOVIRUS

Tra le sequenze analizzate in questo studio, due sono risultate appartenenti a FPV di soggetti le cui caratteristiche sono descritte in tabella 3. Tale dato appare oltremodo sorprendente rispetto a quanto finora riportato in letteratura poiché molti studi confermano che FPV non è in grado di dare infezione naturale nel cane, (poiché da sempre l'ospite d'elezione per FPV rimane il gatto), anche se alcuni FPV-like circolano in popolazione di carnivori selvatici. Per poter confermare la capacità di alcuni ceppi di FPV nel dare malattia anche nei cani, si è cercato di escludere possibili cause di errore. La contaminazione del campione in laboratorio è da scartare poiché non è mai stato manipolato Parvovirus al di fuori dei campioni testati. Anche una contaminazione a monte, durante l'estrazione del DNA dai campioni è da escludersi per le procedure laboratoristiche, in qualità, che non consentono la manipolazione contemporanea di campioni di origine diversa (i.e. specie). O ancora, poiché i campioni appartengono entrambi a soggetti esterni alla Clinica, potrebbe esserci stata una contaminazione da FPV, nel prelievo del campione fecale, o un errore di corretta identificazione del campione, al momento della sua spedizione. Infine, il ragionamento epidemiologico ha contemplato la possibilità della presenza di FPV nelle feci dei cani, proprio considerando le caratteristiche di grande resistenza di tale virus: esso può persistere nell'ambiente anche per 5 mesi o più. Quindi pensando alla possibile coincidenza che un cane abbia potuto ingerire FPV da un gatto convivente affetto da parvovirosi e in seguito portato ad accertamento dal veterinario per un'enterite, probabilmente dovuta ad altre cause, il cane avrebbe potuto fungere da meccanico di passaggio di FPV, portando così ad una misdiagnosi. Questo virus è molto presente nel contesto italiano come riportato in figura 10, e quindi non è impossibile che qualcuna di queste evenienze si sia verificata.

La plausibilità di questo rilievo epidemiologico non va comunque sottovalutata poiché la replicazione di FPV *in vivo*, è stata descritta in uno studio, a seguito di infezione sperimentale con un titolo elevato di FPV (10^6); in questa condizione, la replicazione era avvenuta nel timo

e nel midollo osseo, ma non si era verificata a livello intestinale con escrezioni del virus nelle feci.⁵⁸ Questo dato va confermato con ulteriori approfondimenti futuri, e apre interessanti scenari riguardo la presenza di ceppi, con un tropismo d'ospite differente dallo stipite ancestrale, in grado di infettare e dare malattia anche nel cane.

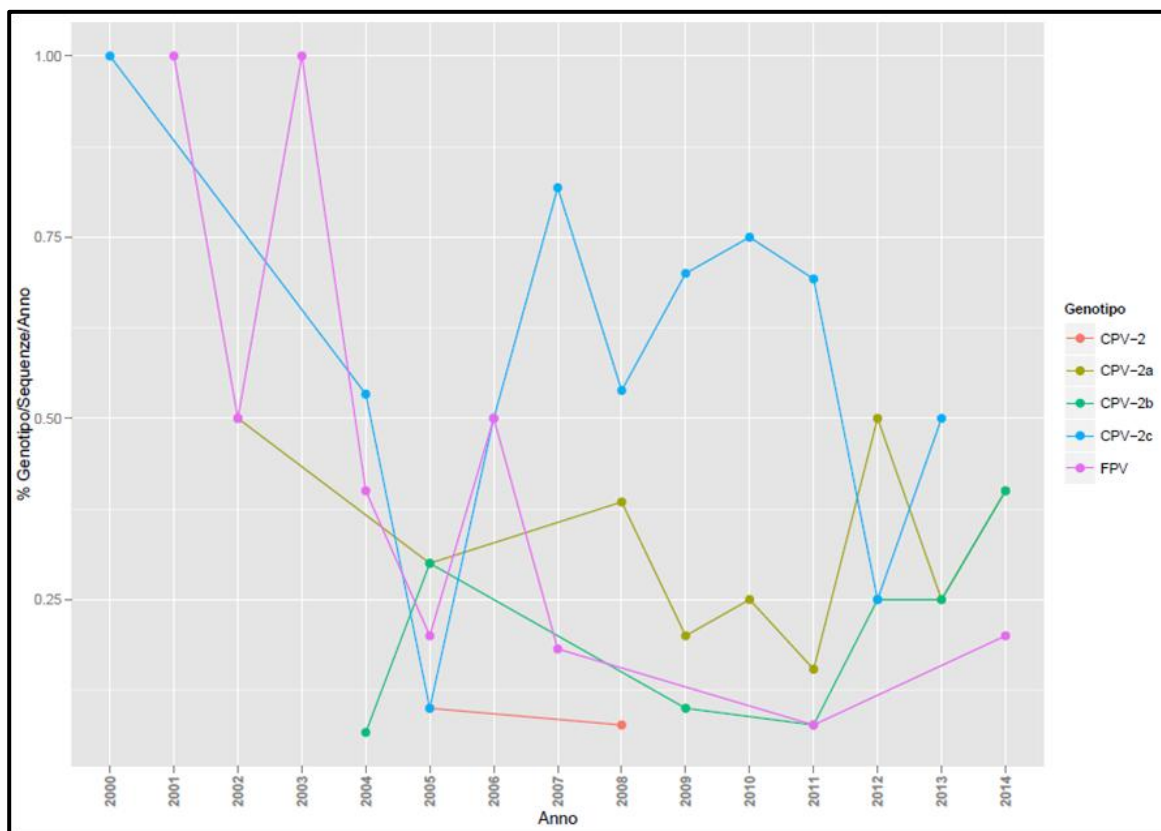


Fig. 10. Quantificazione in percentuale dei genotipi per anno, normalizzati sul totale di eventi di malattia verificatosi annualmente in Italia.

3.4 EPIDEMIOLOGIA DESCRITTIVA DEI CASI DI CPV

3.4.1 DATABASE COMPLETO (PAZIENTI INTERNI ED ESTERNI)

Il database della clinica, usato per la selezione dei campioni di CPV da utilizzare nel presente lavoro di tesi, è stato anche utilizzato per descrivere il contesto epidemiologico da cui derivano i tali campioni. Sono stati presi in considerazione tutti i record di pazienti risultati positivi a CPV negli anni dal 2008 al 2015 e analizzate le frequenze relativamente a:

ORIGINE: dato relativo al tipo di paziente ovvero paziente interno alla clinica o paziente esterno e quindi in consulenza diagnostica presso il laboratorio della clinica;

ANNO: dato relativo al momento della diagnosi;

PROVINCIA: dato relativo alla residenza geografica del cane;

ETÀ – SESSO – RAZZA

La frequenza cumulativa è stata calcolata solamente sul totale dei record con informazione disponibile.

Seguono tabelle riassuntive e grafici delle frequenze calcolate per i diversi strati di ogni variabile considerata:

VARIABILE	STRATO	FREQUENZA N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
ORIGINE	ESTERNO	335 (78,6)	78,6
	INTERNO	91 (21,4)	100

Tab. 4. Frequenze relative alla variabile ORIGINE del campione.

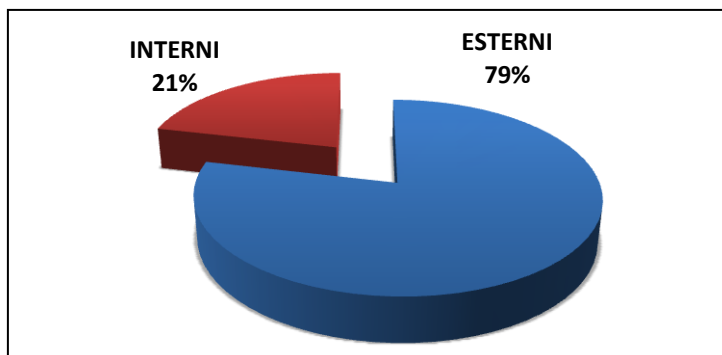


Fig. 11. Grafico a torta della variabile ORIGINE.

Come si può vedere dalle frequenze riportate in tabella 4 e graficamente in figura 11, sulla totalità dei casi di parvovirosi diagnosticati, i pazienti esterni rappresentano il 79%. Questo dato evidenzia l'intensa attività diagnostica della Clinica come centro di riferimento per gli ambulatori distribuiti sul territorio nazionale.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZE N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
SESSO	MASCHI	181 (42,5)	52,6
	FEMMINE	163 (38,3)	100
	DATO MANCANTE	82 (19,2)	
	TOTALE	426	

Tab. 5. Frequenze relative alla variabile SESSO del campione.

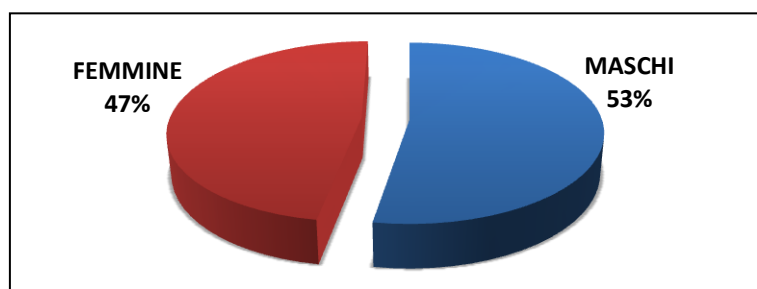


Fig. 12. Grafico a torta della variabile SESSO.

Nella tabella 5 e nel grafico di figura 12, si può osservare che la frequenza di casi in funzione del sesso risulta statisticamente non differente tra maschi e femmine.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZA N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
ANNO	2008	60 (14,1)	14,1
	2009	42 (9,9)	24,0
	2010	49 (11,5)	35,5
	2011	58 (13,6)	49,1
	2012	91 (21,4)	70,5
	2013	60 (14,1)	84,6
	2014	63 (14,8)	99,3
	2015	3 (0,7)	100

Tab. 6. Frequenze relative alla variabile ANNO del campione.

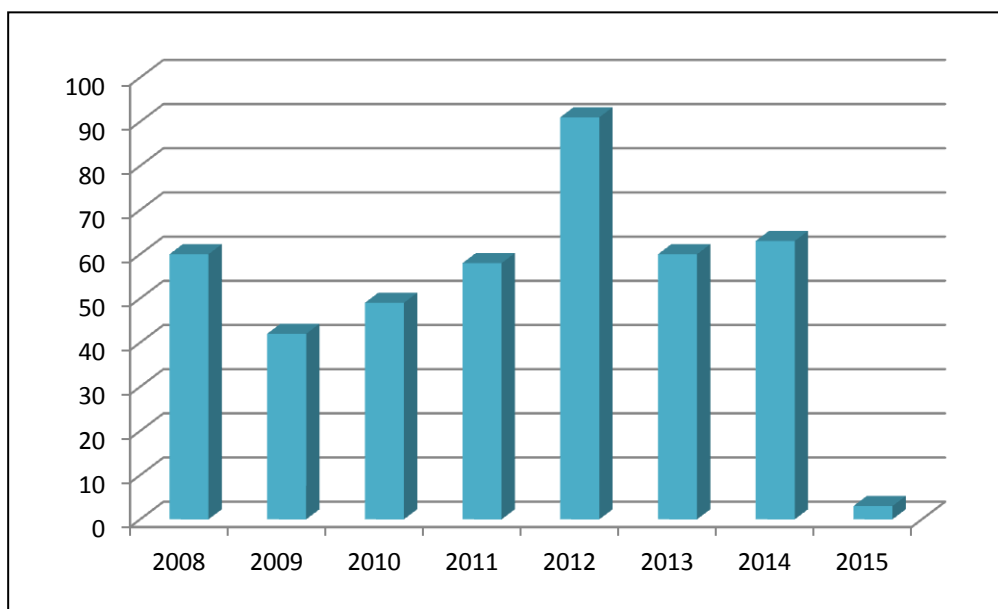


Fig. 13. Istogramma del numero di campioni per ANNO.

Come si può vedere dalle frequenze riportate in tabella 6 e in figura 13, il numero di casi di parvovirus diagnosticati per anno si mantiene costante, con circa 60 casi l'anno. Solo nel 2012 si osserva un picco con 91 casi di diagnosi di CPV.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZA N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
PROVINCIA	PD	42 (9,9)	11,2
	RM	31 (7,3)	19,4
	TV	23 (5,4)	25,5
	FI	20 (4,7)	30,8
	VE	20 (4,7)	36,1
	VI	16 (3,8)	40,3
	BS	13 (3,1)	43,8
	MN	12 (2,8)	47,0
	FE	11 (2,6)	49,9
	MO	10 (2,3)	52,6
	RI	10 (2,3)	55,3
	ALTRE	168 (39,4)	100
	DATO MANCANT E	50 (11,7)	
	TOTALE	426	

Tab. 7. Frequenze relative alla variabile PROVINCIA del campione.

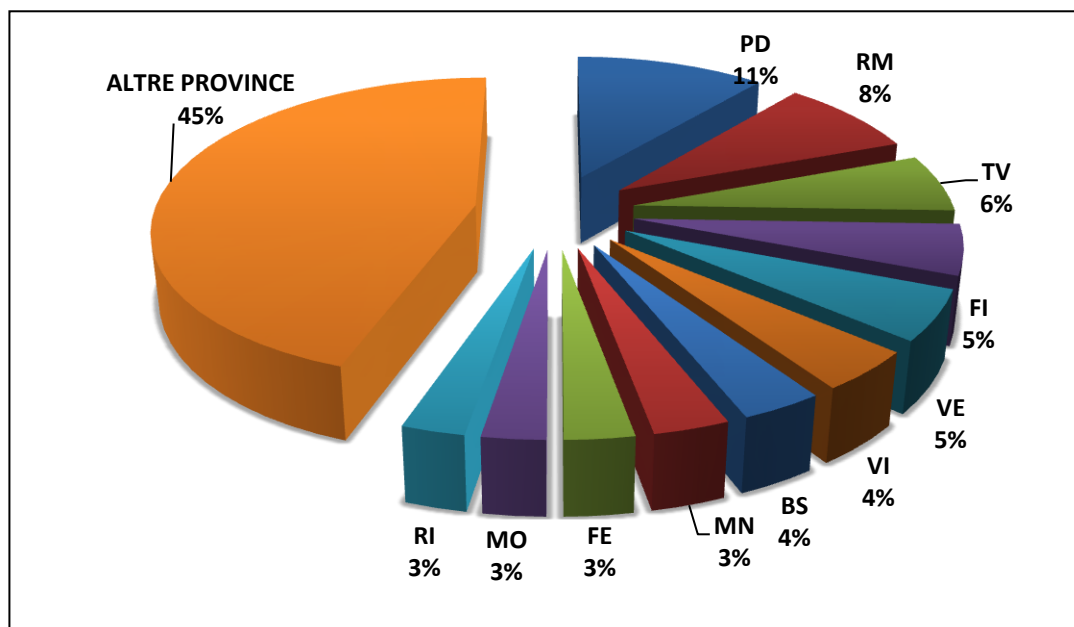


Fig. 14. Grafico a torta della variabile PROVINCIA.

Nella tabella 7, e nel grafico a torta di figura 14, sono riportate le frequenze delle province con almeno 10 campioni diagnosticati positivi per parvovirus. Tra le 53 province con un numero inferiore di casi, ci sono Verona, Napoli, Perugia, Bari, Brescia, Milano, Torino, e molte altre distribuite su tutto il territorio italiano.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZE N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
ETÀ	<1	1 (0,2)	0,3
	1	7 (1,6)	2,2
	2	121 (28,4)	35,1
	3	87 (20,4)	58,9
	4	37 (8,7)	68,9
	5	22 (5,2)	74,9
	6	16 (3,8)	79,3
	7	15 (3,5)	83,4
	8	10 (2,3)	86,1
	9	6 (1,4)	87,7
	10	7 (1,6)	89,6
	11	2 (0,5)	90,2
	12	8 (1,9)	92,4
	>12	28 (6,7)	100
	DATO MANCANTE	59 (13,8)	
	TOTALE	426	

Tab. 8. Frequenze relative alla variabile ETÀ (mesi) del campione.

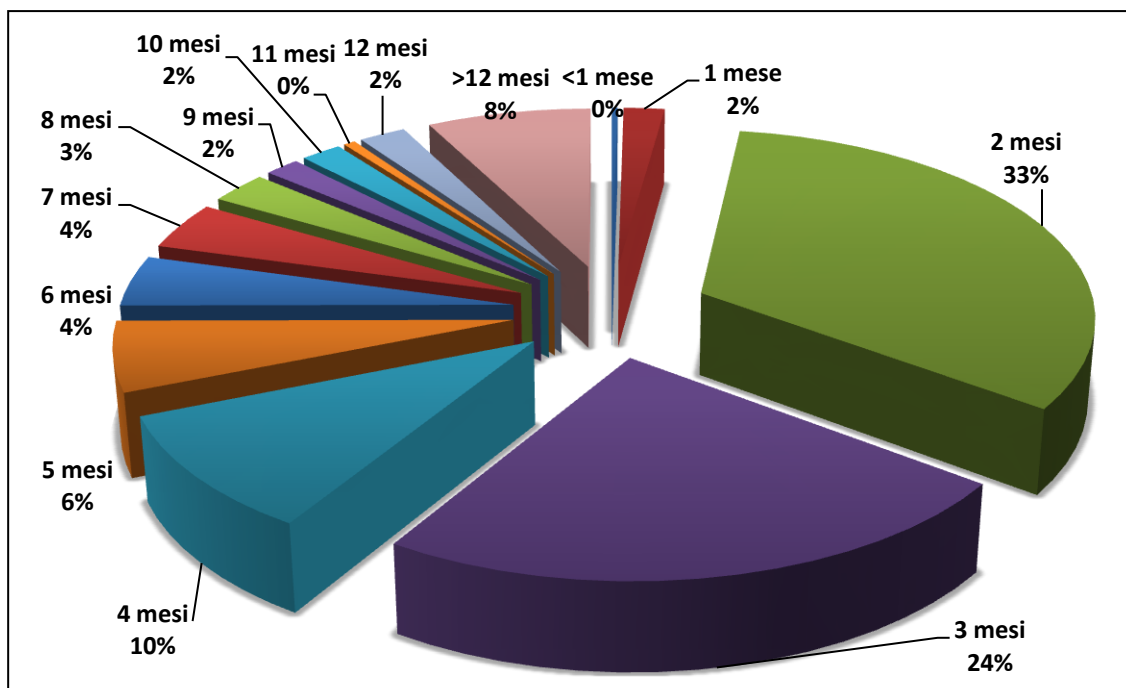


Fig. 15. Grafico a torta della variabile ETÀ (mesi).

Come si può vedere dalle frequenze riportate in tabella 8 e nel grafico a torta (Fig.15), CPV colpisce entro il primo anno di vita (92,4% dei casi appartengono a soggetti entro i 12 mesi); inoltre, gli strati che registrano le frequenze maggiori sono quelli di 2, 3, 4 mesi,

corrispondenti al momento di perdita dell'immunità materna e/o non completa acquisizione di immunocompetenza a seguito di profilassi indiretta.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZE N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
RAZZA	METICCIO	84 (19,7)	23
	MALTESE	21 (4,9)	28,7
	CHIHUAHUA	20 (4,7)	34,2
	LABRADOR RETRIEVER	18 (4,2)	39,1
	BOVARO DEL BERNESE	17 (4)	43,7
	PASTORE TEDESCO	12 (2,8)	47
	ROTTWEILER	11 (2,6)	50
	WHW TERRIER	11 (2,6)	53
	YORKSHIRE	11 (2,6)	56
	COCKER SPANIEL	10 (2,3)	58,7
	BEAGLE	9 (2,1)	61,2
	PINSCHER	8 (1,9)	63,4
	GOLDEN RETRIEVER	7 (1,6)	65,3
	ALTRE RAZZE	127 (29,9)	100
	DATO MANCANTE	60 (14,1)	
	TOTALE	426	

Tab. 9. Frequenze relative alla variabile RAZZA.

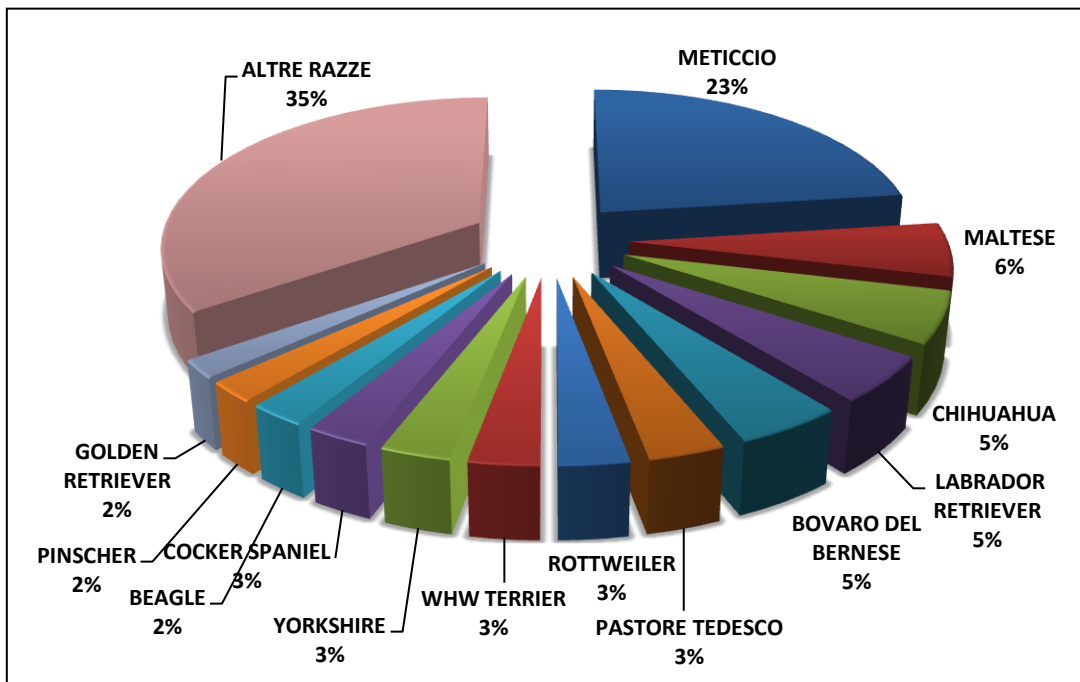


Fig. 16. Grafico a torta sulla variabile RAZZA.

Nella tabella 9 e nel grafico a figura 16, sono illustrate le razze che presentano le frequenze di casi più elevate; tra queste ci sono i cani meticci, seguiti poi dai cani di razza Maltese, Chihuahua, Labrador, e Bovaro del Bernese. Questi dati indicano le razze maggiormente presenti sul nostro territorio. Con tali dati non è possibile accertare la predisposizione di una razza rispetto ad un'altra a contrarre la malattia, in quanto manca il dato “cane sano”, denominatore necessario per fare il confronto ed estrapolare questa informazione.

VARIABILE	STRATO	ESTERNI N (%)	INTERNI N (%)	TOTALE
SESSO	MASCHI	135 (74,6)	46 (25,4)	181
	FEMMINE	125 (76,7)	38 (23,3)	163
	MANCANTE	75 (91,5)	7 (8,5)	82
	TOTALE	335 (78,7)	91 (21,3)	426

Tab. 10. Frequenze del SESSO in funzione dell'ORIGINE dei campioni.

La frequenza per sesso, non è risultata significativamente diversa (Chi quadro = 0,20; $p = 0.70$) in funzione dell'origine del paziente, ovvero non c'è una diversa prevalenza di genere tra i campioni appartenenti alla popolazione degli esterni rispetto a quella degli interni (Tab. 10).

VARIABILE	STRATO	ESTERNI N (%)	INTERNI N (%)	TOTALE
ETÀ	ENTRO 12 MESI	259 (76,4)	80 (23,6)	339
	OLTRE 12 MESI	17 (60,7)	11 (39,3)	28
	MANCANTE	59 (100)	0	59
	TOTALE	335 (78,7)	91 (21,3)	426

Tab. 11. Frequenze dell' ETÀ , suddivisa in strati “ENTRO il primo anno di vita / OLTRE l'anno”, in funzione dell'origine dei campioni.

Il confronto per ETÀ in funzione dell'origine dei campioni è stato fatto considerando tutti assieme gli strati relativi al primo anno di vita dei soggetti (periodo biologicamente più attivo per l'infezione da CPV). I pazienti interni hanno dimostrato una proporzione di casi oltre l'anno di vita maggiore (quasi il doppio) rispetto a quanto registrato nella popolazione di

pazienti esterni. Tale confronto non è risultato comunque statisticamente significativo (Chi quadro = 3,4; $p = 0,07$) a causa della dimensione numerica della popolazione di cani adulti (oltre l'anno di vita) rispetto a quella dei cani più giovani. Al di là del test statistico, una possibile spiegazione di questa diversa frequenza è riconducibile al fatto che il test per parvovirosi in cani di questa età viene condotta più frequentemente in pazienti interni alla clinica a seguito dell'applicazione di standard di ricerca diagnostica più estensivi rispetto a quanto avvenga nella routinaria prassi ambulatoriale (Tab. 11).

VARIABILE	STRATO	ESTERNI N (%)	INTERNI N (%)	TOTALE
ANNO	2008	48 (92,3)	4 (7,7)	52
	2009	32 (80,0)	8 (20,0)	40
	2010	38 (80,9)	9 (19,1)	47
	2011	40 (71,4)	16 (28,6)	56
	2012	60 (79,5)	19 (24,1)	79
	2013	40 (75,5)	13 (24,5)	53
	2014	37 (62,7)	22 (37,3)	59
	2015	3 (100)	0	3
	MANCANTE	37 (100)	0	37
	TOTALE	335 (78,7)	91 (21,3)	426

Tab. 12. Frequenze di campionamento per ANNO in funzione dell'ORIGINE dei campioni.

La frequenza di casi di parvovirosi per ANNO non è risultata significativamente diversa in funzione dell'ORIGINE del paziente, con una distribuzione di casi su pazienti esterni che va dal 80% al 75%. Negli anni quindi, non ci sono stati cambiamenti evidenti nell'acquisizione di casi CPV positivi presso il laboratorio della Clinica (Tab.12).

3.4.2 DATABASE RELATIVO AI SOLI PAZIENTI INTERNI

La Clinica si è dimostrata disponibile a concedere tutte le informazioni contenute nel database relativamente a pazienti con diagnosi di parvovirosi, indipendentemente dal lavoro di selezione e analisi dei campioni. E' sembrato interessante quindi poter analizzare anche questi record, visto che si riferivano ad un arco temporale più ampio (dal 2001) e visto che i pazienti interni sono corredati di molte informazioni aggiuntive rispetto a quanto possa essere per pazienti esterni. In totale sono stati estratti 132 casi positivi per CPV e, non essendo l'ambito di questa tesi quello clinico-patologico, al di là di tutti i parametri clinici disponibili, sono state analizzate due variabili ritenute interessanti dal punto di vista epidemiologico: lo STATO VACCINALE e il DECESSO entro i 28 giorni.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZE N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
VACCINAZIONE	REGOLARE	73 (55,3)	59,3
	IRREGOLARE	50 (37,9)	100
	MANCANTE	9 (6,9)	
	TOTALE	132	

Tab. 13. Frequenze dello stato di VACCINAZIONE dei pazienti interni.

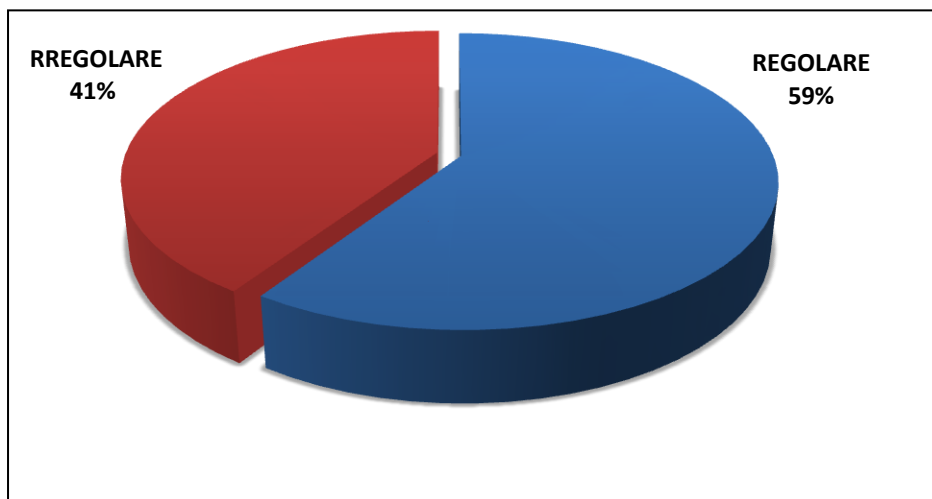


Fig. 17. Grafico a torta della variabile VACCINAZIONE.

Dalla tabella 13 e dal grafico di figura 17 si osserva che quasi il 60% dei pazienti interni risultati positivi a CPV sono regolarmente vaccinati.

VARIABILE	STRATO	FREQUENZE N (%)	PERCENTUALE COMULATIVA (%)
DECESSO	NO	102 (77,3)	73,3
	SI	30 (22,7)	100
	TOTALE	132	

Tab. 14. Frequenze del DECESSO entro 28 giorni dei pazienti interni.

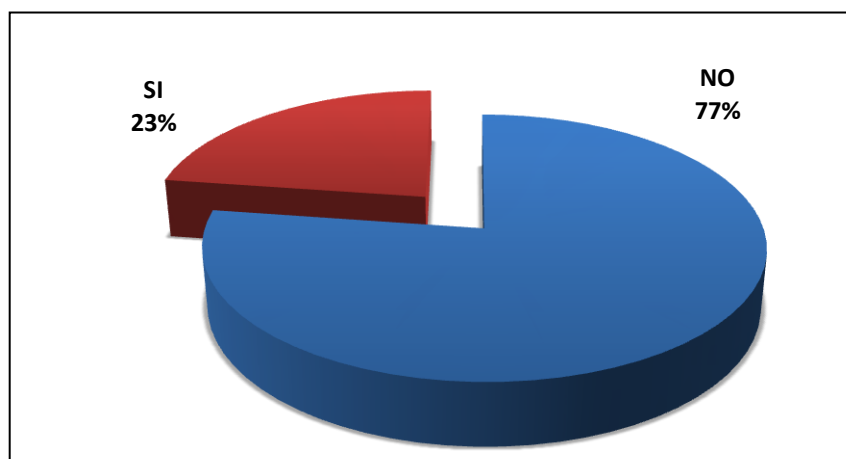


Fig. 18. Grafico a torta della variabile DECESSO entro 28 giorni.

Le frequenze riportate nella tabella 14 e nel grafico a torta (Fig.18) evidenziano come un quinto dei pazienti interni affetti da parvoviroosi non sia sopravvissuto oltre i 28 giorni.

VARIABILE	STRATO	IRREGOLARI N (%)	REGOLARI N (%)	TOTALE
ETÀ	ENTRO 12 MESI	48 (42,9)	64 (57,1)	112
	OLTRE 12 MESI	2 (18,2)	9 (81,8)	11
	TOTALE	50 (40,7)	73 (59,3)	123

Tab. 15. Frequenze dell'ETA'età, suddivisa in strati "ENTRO il primo anno di vita / OLTRE l'anno", in funzione della storia vaccinale.

Il confronto per ETÀ, stratificata in "ENTRO il primo anno di vita / OLTRE l'anno", non ha dimostrato una differenza statisticamente significativa (Chi quadro = 2,5; $p = 0,2$) in funzione dello STATO VACCINALE del paziente. Nonostante la percentuale di casi di CPV oltre l'anno di vita sia nettamente più frequente in cani con STATO VACCINALE REGOLARE tale dato non può essere preso in considerazione data l'esiguità numerica di cani con parvoviroosi oltre il primo anno di vita portati a visita in clinica. Desta invece sicuramente più

interesse il dato sullo STATO VACCINALE nei cani con CPV entro il primo anno di vita, poiché risulta paragonabile il numero di pazienti con protocollo vaccinale regolare rispetto a quelli con protocollo irregolare. Vale la pena di ricordare ancora che la mancanza del dato dello stato vaccinale in pazienti sani non permetta una reale analisi di mancata efficacia vaccinale, ma il frequente rilievo di casi di parvovirosi in cani correttamente vaccinati è un dato che andrà investigato ulteriormente in futuro (Tab.15).

VARIABILE	STRATO	IRREGOLARI N (%)	REGOLARI N (%)	TOTALE
ETÀ	ENTRO 4 MESI	37 (44,0)	47 (56,0)	84
	OLTRE 4 MESI	13 (33,3)	26 (66,7)	39
	TOTALE	50 (40,7)	73 (59,3)	123

Tab. 16. Frequenze dell'ETA' stratificata IN "ENTRO 4 mesi / OLTRE 4 mesi", in funzione della storia vaccinale.

La frequenza di casi di CPV per età, non è risultata significativamente diversa in funzione dello stato vaccinale nemmeno quando il cut-off d'ETA' è stato considerato a 4 MESI (Chi quadro = 1,2; $p = 0,3$). Più che il confronto tra vaccinati regolari e irregolari nei due strati di età, è interessante notare come oltre i 4 mesi, con protocollo vaccinale regolare (prima si possono avere protocolli incompleti, o interferenza dell'immunità materna) ci siano casi di parvovirosi, numericamente non trascurabili. La particolarità del dato, non riesce ad essere ulteriormente valutata in termini di efficienza vaccinale, in quanto manca la popolazione di riferimento "cani vaccinati sani" (Tab. 16).

VARIABILE	STRATO	DECESSO NO N (%)	DECESSO SI N (%)	TOTALE
ETÀ	ENTRO 12 MESI	92 (77,3)	27 (22,7)	119
	OLTRE 12 MESI	10 (76,9)	3 (23,1)	13
	TOTALE	102 (77,3)	30 (22,7)	132

Tab. 17. Frequenza dell'ETA', suddivisa in strati "ENTRO il primo anno di vita / OLTRE l'anno", in funzione della morte entro i 28 giorni.

La frequenza dell'età, stratificata in prima e dopo l'anno, non è risultata significativamente diversa (Chi quadro = 0,001; $p = 0,97$) in funzione del decesso entro i 28 giorni.

La tabella 17 indica come l'età nel paziente affetto da CPV non sia un fattore discriminante, poiché la probabilità di sopravvivere alla malattia è uguale prima e dopo l'anno di vita.

VARIABILE	STRATO	DECESSO NO N (%)	DECESSO SI N (%)	TOTALE
VACCINAZIONE	IRREGOLARE	40 (80)	10 (20)	50
	REGOLARE	55 (75,3)	18 (24,7)	73
	TOTALE	95 (77,2)	28 (22,8)	123

Tab. 18. Frequenza dello STATO VACCINALE, in funzione del DECESSO entro i 28 giorni.

Il confronto per STATO VACCINALE, non è risultato statisticamente significativo (Chi-quadro = 0,4; p = 0,5) in funzione del DECESSO entro i 28 giorni. Infatti dalla tabella 18 si osserva che casi di decesso in pazienti affetti da CPV sono circa il 20% sia in caso di vaccinazione regolare che di protocollo vaccinale irregolare. Questo dato si trova in contraddizione con quanto ci si aspetterebbe da cani con storia vaccinale regolare, i quali dovrebbero essere pienamente protetti dalla malattia.

4. CONCLUSIONI

La validazione di un protocollo in grado di amplificare Parvovirus a partire da campioni positivi, rappresenta un'importante traguardo, in quanto è un passaggio imprescindibile per le successive fasi di sequenziamento. Lo studio del gene VP2, ottenuto tramite sequenziamento con metodica Sanger, ha permesso di estrapolare informazioni rilevanti, quali la caratterizzazione del genotipo, e le connessioni filogenetiche tra ceppi. Questi dati, supportati dalle analisi bioinformatiche, hanno evidenziato come la presenza del genotipo CPV-2a sia predominante a livello mondiale, e si distribuisca, assieme a CPV-2b e CPV-2c, in modo ubiquitario tra gli Stati. La situazione italiana rientra in questo contesto, trovandosi in accordo con ciò che accade epidemiologicamente nel resto del mondo. Questo studio è uno tra i pochissimi lavori pubblicati riguardo l'epidemiologia di CPV sul territorio italiano, e rappresenta di sicuro il più recente. La ricostruzione delle dinamiche italiane di CPV, è stata possibile grazie all'osservatorio epidemiologico al quale ci siamo appoggiati per ottenere i dati. Questo infatti, rappresentato dalla Clinica, e dagli ambulatori che si appoggiano ad essa come centro di riferimento per la diagnostica, ha raccolto informazioni da molte regioni italiane, offrendo quindi la possibilità di abbracciare un'area geografica ampia sulla quale investigare. Inoltre l'opportunità di avere un vasto database anamnastico e clinico associato ai casi di parvovirosi, permetterà studi futuri sulle implicazioni clinico-patologiche dei ceppi attualmente circolanti e di indagare più approfonditamente possibili evoluzioni genetiche del CPV nel determinismo della patologia. La popolazione di pazienti interni è risultata sovrapponibile a quella dei pazienti esterni per quanto riguarda le principali variabili di segnalamento supportando quindi la bontà nell'aver deciso di includere campioni casualmente selezionati secondo questi parametri. Stabilita quindi l'oggettiva importanza della provenienza del campione sul quale effettuare delle buone osservazioni di sorveglianza passiva nell'analisi retrospettiva dei dati, studi futuri potranno essere rivolti in maniera mirata (quindi come sorveglianza attiva), imponendo la scelta di variabili di interesse, quali ad esempio una peculiare tipologia di paziente, o una particolare distribuzione geografica. Infine alcuni risultati inattesi, quale la presenza di FPV e CPV-2 tra i nostri campioni, pongono quesiti interessanti che dovranno essere affrontati in successive fasi di ricerca.

Questo lavoro rappresenta quindi il principio di una più ampia indagine che ha come obiettivo lo studio di CPV a 360 gradi. La presenza di numerosi campioni pronti per essere sequenziati tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) darà la possibilità di analizzare l'intero genoma, del quale la mancanza di dati è una lacuna assodata che necessita di essere colmata al più presto. Avere le sequenze di una consistente mole di campioni, permetterà un'indagine più dettagliata non solo sulla distribuzione e relazione tra genotipi, ma anche sulla inaspettata presenza di CPV-2. Il ritrovamento di CPV-2, mette in dubbio la confermata stabilità dei ceppi vaccinali, inoltre la presenza di casi di malattia in animali regolarmente vaccinati, e la continua circolazione di Parvovirus nel territorio nonostante la diffusa profilassi, sembra essere uno spunto interessante per approfondire le temute "rotture vaccinali". Anche l'apparente presenza di FPV in campioni di cani, desta una certa sorpresa, e porta a chiederci se ulteriori salti di specie siano possibili, in quanto la plasticità evolutiva del Parvovirus canino e felino si presta a non escludere queste considerazioni. Di pari passo, ottenere un FPV, con il protocollo validato per CPV, ci mette di fronte a problemi di mis-diagnosi, sarà quindi opportuno continuare a lavorare sulla specificità delle metodiche, come strumento di discriminazione importante nella clinica di tutti i giorni. Infine, l'esistenza di un database molto ampio, in cui i casi malattia sono corredati da una vastissima quantità di informazioni cliniche per ogni paziente, apre la strada ad una serie di studi futuri, in ambito clinico, volti ad indagare meglio l'interazione tra ospite e agente e quindi gli effetti patologici legati a particolari caratteristiche del ceppo di CPV in causa, o a certe peculiarità del soggetto che ne condizionano la suscettibilità. Tali studi, potranno quindi contribuire a rispondere a molti quesiti scientifici, sia di natura epidemiologica che di aspetto clinico-patologico, legati ad un agente eziologico mutevole come CPV.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Cotmore SF. The family Parvoviridae. *Archives of virology*. 2014;159(5):1239-1247.
2. Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol*. 2012;155(1):1-12.
3. Parrish CR. The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:553-586.
4. Carmichael LE. An annotated historical account of canine parvovirus. *Journal of veterinary medicine Series B*. 2005;52(7-8):303-311.
5. Truyen U. Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Vet Microbiol*. 2006;117(1):9.
6. Parrish CR. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Advances in virus research*. 1990:403-450.
7. Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WSK, Tarpey I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol*. 2008;128(1-2):48-55.
8. Truyen U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Veterinary microbiology*. 1999;69(1):47-50.
9. Allison AB. Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLOS PATHOGENS*. 2014;10(11).
10. Cotmore SF. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res*. 2007;70:183.

11. Pérez R. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One*. 2014;9(11):e111779.
12. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Veterinary virology*. 3rd ed. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA: Academic Press; 1999.
13. Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd Edition ed. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri 63146: SAUNDERS ELSEVIER; 2006.
14. Truyen U, Parrish CR. Feline panleukopenia virus: its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Vet Microbiol*. 2013;165(1-2):29-32.
15. Parrish CR. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary microbiology*. 1999;69(1):29-40.
16. Cságola A. Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary. *Archives of virology*. 2014;159(9):2441-2444.
17. Shackelton LA. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(2):379-384.
18. Duffy S. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):267.
19. Holmes EC. *The Evolution and Emergence of RNA Viruses*. Oxford University Press (OUP); 2009:288.

20. Truyen U. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*. 1996;215(2):186-189.
21. Buonavoglia C. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of general virology*. 2001;82:3021-3025.
22. Decaro N. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2005;17(2):133-138.
23. Decaro N, Campolo M, Desario C, et al. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*. 2005;33(4):261-267.
24. Parrish CR. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of general virology*. 1988;69:1111-1116.
25. Parrish CR. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of virology*. 1991;65(12):6544-6552.
26. Gallo Calderón M, Romanutti C, Wilda M, et al. Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *J Virol Methods*. 2015;222:145.
27. Ikeda Y. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology*. 2000;278(1):13-19.
28. Ohshima T. Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci*. 2008;70(8):769.

29. Meers J. Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Australian veterinary journal*. 2007;85(10):392-396.
30. Decaro N, Desario C, Parisi A, et al. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology*. 2009;385(1):5-10.
31. Decaro N. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES*. 2007;13(8):1222-1224.
32. Decaro N. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet J*. 2011;187(2):195.
33. Ntafis V. Characterization of Canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2010;22(5):737-740.
34. Filipov C. Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(1):152.
35. Decaro N. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods*. 2006;133(1):92.
36. Welborn LV, DeVries JG, Ford R, et al. 2011 AAHA canine vaccination guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2011;47(5):1.
37. Castro TX. Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Research in veterinary science*. 2011;90:336-340.
38. Kapil S. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):4044.

39. Wilson S. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine*. 2014;32(42):5420.
40. Decaro N. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol*. 2008;31(1):125.
41. Siedek EM. Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2011;124(1-2):58.
42. Pratelli A. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(3):612.
43. Decaro N. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine*. 2014;32(30):3850.
44. Decaro N. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J Virol Methods*. 2006;136(1-2):65.
45. Desario C. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods*. 2005;126(1-2):179.
46. Decaro N, Elia G, Martella V, et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol*. 2005;105(1):19-28.

47. Decaro N. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *Journal of veterinary medicine Series B*. 2005;52(7-8):316-319.
48. Decaro N. 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*. 2006;138(1-2):10.
49. Radford AD. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*. 2012;93:1853.
50. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31.
51. Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):6227.
52. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15(12):1767.
53. Capobianchi MR. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(1):15.
54. Katoh K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772.
55. Abascal F. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:W7.

56. Paradis E. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;20(2):289-290.
57. Zhang R. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes*. 2010;40(3):397.
58. Truyen U. 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(9):5399-5408.

6. SITOGRAFIA

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<http://www.fluxus-technology.com>

<http://www.geospiza.com>

<http://www.R-project.org>

7. RINGRAZIAMENTI

Sono grata al Dottor Drigo per avermi dato la possibilità di svolgere la tesi su una tematica di grande attualità come questa e che fin dall'inizio mi ha coinvolta con entusiasmo nel suo gruppo di ricerca. Inoltre lo vorrei ringraziare per la fiducia che ha riposto in me, permettendomi di prendere parte alla nascita di un progetto, rendendo così il mio lavoro un punto di partenza e non uno scritto fine a sé stesso.

Ringrazio il Dottor Franzo per essermi stato a fianco durante lo sviluppo di questo progetto, sostenendomi sia tecnicamente che moralmente con saggezza e simpatia giorno dopo giorno. Il suo aiuto si è rivelato indispensabile, e gli sono grata per avermi instancabilmente spronata ad ottenere il meglio dal mio lavoro.

Vorrei inoltre ringraziare la grande disponibilità del Dottor Caldin, che mi ha permesso di avere i dati sui quali impostare il mio studio. La sua precisione e la sua dedizione verso l'attività clinica e la ricerca hanno contribuito nel fornire informazioni preziose non solo per il mio studio, ma soprattutto per lo stesso mondo scientifico.

Ringrazio il Dottor Cecchinato per le puntuali intuizioni che mi hanno aiutata nel portare a termine questo lavoro.

Sono grata a Mattia e Daniele, che mi hanno aiutato nella stesura della tesi, con suggerimenti e critiche costruttive.

Infine ringrazio la mia famiglia per essermi sempre stata accanto, e per avermi sostenuto, sotto ogni aspetto, in questo cammino di studio e soddisfazioni.