

Coinfezione da parvovirus felino e canino in un gatto

Mara Battilani, Andrea Balboni, Massimo Giunti, Santino Prospero

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna,
Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia
mara.battilani@unibo.it

Parole chiave

Gatto,
Infezione,
Italia,
Parvovirus canino,
Virus della
panleucopenia felina.

Riassunto

In questo studio si riporta un caso di coinfezione da parvovirus canino (CPV) di tipo 2a e da virus della panleucopenia felina (FPV) in un gatto di 3 mesi, con la presenza di una variante di parvovirus avente caratteristiche genetiche intermedie tra CPV e FPV. Il riscontro di una variante virale caratterizzata da epitopi specifici sia per il FPV che per il CPV avvalorò l'importanza del meccanismo evolutivo per mutazioni multistep nella produzione di nuove varianti e nell'emergenza di nuovi virus. Questo tipo di adattamento progressivo è già stato riscontrato durante l'emergenza del CPV. Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile ipotizzare che il CPV abbia presumibilmente iniziato un nuovo processo di riadattamento nell'ospite felino, confermando l'importanza del salto d'ospite nell'emergenza di nuovi virus.

Veterinaria Italiana 2013, 49 (1), 123-125

Recentemente sono state condotte numerose ricerche nel campo delle malattie infettive emergenti, focalizzate in particolare sulle infezioni multiple e sono stati proposti diversi modelli per approfondire i meccanismi alla base delle coinfezioni. Una conoscenza approfondita delle interazioni che si stabiliscono tra i diversi patogeni nel corso delle infezioni multiple è indispensabile ai fini di prevederne la virulenza, la persistenza nonché la diffusione delle malattie infettive emergenti (1, 15). Infezioni multiple sono state descritte anche per i parvovirus autonomi, dimostrando che i parvovirus hanno un notevole grado di variabilità e che si possono rilevare contemporaneamente in un animale infetto più varianti virali (2, 3, 4, 5, 14).

Tra i carnivori, i gatti sono recettivi sia alle nuove varianti del parvovirus canino (CPV-2a, 2b e 2c) che al parvovirus della panleucopenia felina (FPV). Coinfezioni con più ceppi di parvovirus potenzialmente facilitano gli eventi ricombinanti e l'elevata eterogeneità genetica (2, 4, 6, 13).

In questo studio viene segnalata una coinfezione da CPV-2a e FPV in un gatto, che ha portato alla comparsa di una variante virale avente caratteristiche intermedie tra CPV e FPV, confermando che, in natura, possono instaurarsi infezioni multiple con diverse specie di parvovirus. Un gattino maschio, di 3 mesi d'età, meticcio ("Prillium"), proveniente da una colonia felina è stato ricoverato all'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Bologna per diarrea, letargia ed anoressia. All'esame clinico il gatto si presentava depresso, in decubito laterale, ipotermico e con moderata disidratazione. Un prelievo di sangue

venoso è stato eseguito per un esame emocromocitometrico e un profilo biochimico di base completo e le feci sono state analizzate per cercare eventuali parassiti intestinali e il parvovirus. Il profilo ematobiochimico mostrava panleucopenia e panipoprotidemia. La sintomatologia clinica è peggiorata nei giorni successivi, con la comparsa di una diarrea acquosa emorragica, vomito, grave depressione ed il gatto è deceduto nonostante il trattamento intensivo a cui è stato sottoposto.

Sulla base della sintomatologia clinica è stato avanzato il sospetto di parvovirosi, successivamente confermato dal test immunocromatografico (SNAP canine parvovirus antigen test, IDEEX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, USA) eseguito sulle feci raccolte durante la fase acuta della malattia. Dai campioni fecali è stato estratto il DNA virale utilizzando un kit di estrazione a colonnine, il *nucleospin tissue mini kit* (Macherey-Nagel, Düren, Germany) seguendo le istruzioni rilasciate dal produttore. I geni completi VP2 ed NS sono stati amplificati utilizzando un set di *primers* specifici per il parvovirus canino e felino (2).

I prodotti di amplificazione sono stati clonati nel vettore PCR 4/TOPO utilizzando il TOPO cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, California), e 10 cloni ricombinanti per ogni gene sono stati purificati e sequenziati. Le sequenze nucleotidiche complete dei geni VP2 ed NS sono state comparate ed allineate utilizzando l'interfaccia web di CLUSTAL W. Numerose analisi statistiche relative alla diversità nucleotidica e variabilità di sequenza sono state condotte sul set dei dati di sequenza utilizzando il software DNASP

Tabella 1. Parametri indicativi della variabilità di sequenza.

Cloni	S	π	SynDif	NSynDif	Cloni mutati (%)	Totale mutazioni/basi sequenziate	Frequenza di mutazione
VP2 (n = 10)	34	0,00913 (SE 0,00266)	19	15	60 (6/10)	34/17.450	2×10^{-3}
NS (n = 10)	6	0,00075 (SE 0,00026)	3	3	30 (3/10)	6/17.450	$3,4 \times 10^{-4}$

S = siti polimorfici; π = diversità nucleotidica; n = numero sequenze; SynDif = numero totale delle mutazioni sinonime; NSynDif = numero totale delle mutazioni non sinonime

versione 5.10.00 (9). Per valutare la diversità genetica della popolazione virale si sono utilizzati come indicatori la frequenza di mutazione (numero totale di mutazioni/numero totale di basi sequenziate) e la percentuale dei cloni mutati.

Poiché si è visto che i fenomeni di ricombinazione intervengono nell'evoluzione dei parvovirus (11), il set di sequenze è stato analizzato per individuare eventi ricombinanti utilizzando il metodo GARD (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*) implementato nell'interfaccia web di Datamonkey (8). L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei 10 cloni del gene VP2 ha evidenziato che il clone 6 e il clone 20 sono completamente identici fra loro, come sono uguali fra loro i cloni 1, 3, 4 e 7; gli altri cloni mostrano una similarità di sequenza che varia dal 98,3 al 99,9%. L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei 10 cloni del gene NS ha evidenziato che i cloni 1 e 10 sono identici fra loro, come lo sono i cloni 2, 4, 5, 7, 8, 9; gli altri cloni presentano una similarità di sequenza che varia dal 99,7 al 99,9%.

La frequenza di mutazione rilevata nel campione era nell'ordine di 2×10^{-3} , un valore analogo ad un RNA virus, e più elevato rispetto al tasso di sostituzione per anno stimato per i parvovirus dei carnivori che è nell'ordine dei $10^4 - 10^5$ nt. (12). Questo risultato supporta l'importanza della coinfezione con più specie di parvovirus come potenziale fonte di complessità e diversità genetica (Tabella 1).

L'analisi dei residui critici della proteina VP2 che influenzano lo spettro d'ospite felino e canino del CPV e FPV, ha evidenziato che i cloni 6, 15 e 20 erano CPV-2a, mentre i cloni 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13 erano FPV; questo dato conferma la presenza di un'infezione mista con la presenza di 2 specie di parvovirus nello stesso paziente. Nel clone 15 vi è la contemporanea presenza dei residui caratterizzanti il CPV-2a e il FPV, per cui il clone 15 lo si può considerare un virus intermedio tra il CPV e il FPV. Poiché l'analisi con Datamonkey ha escluso che si siano verificati eventi ricombinanti,

si è ipotizzato che tali mutazioni siano il risultato di un adattamento del virus nella nuova specie ospite.

In particolare la presenza del clone 15, che contiene gli epitopi specifici del FPV e CPV, sottolinea l'importanza del meccanismo di mutazioni *multistep* nel generare nuove varianti e nell'emergenza di nuovi virus. Questo tipo di adattamento a *multistep* è già stato documentato durante l'emergenza del CPV (7) e sulla base dei nostri risultati, si può ipotizzare che il CPV abbia iniziato un nuovo processo di ri-adattamento nell'ospite felino, confermando l'importanza del meccanismo di *host switching* nell'emergenza di nuovi virus.

Ad oggi, non vi sono studi disponibili relativamente al decorso clinico e alla prognosi dei casi che presentano una coinfezione CPV-FPV. Analogamente a quello che avviene nel corso delle infezioni multiple nell'uomo (10), il decorso clinico della parvovirosi potrebbe essere alterato e il CPV potrebbe accelerare il decorso e la gravità dell'infezione poiché il CPV rappresenta un nuovo patogeno per il gatto (9). In alternativa la coinfezione potrebbe avere implicazioni dirette sulla persistenza virale, l'interazione ospite-virus e la patogenesi (15).

Non è ancora stata chiarita quale sia la patogenicità delle varianti di CPV per il gatto, in quanto i risultati sono ad oggi controversi. Il CPV è stato di frequente isolato dalle feci di gatti clinicamente sani, suggerendo che il CPV possa determinare nel gatto forme subcliniche o miti di malattia. Inoltre il CPV è stato isolato dalle cellule mononucleate del sangue (PBMCs) dei gatti, suggerendo che il CPV possa persistere nei gatti infetti nonostante la presenza di anticorpi neutralizzanti (11).

Concludendo, le infezioni multiple potrebbero aumentare le possibilità che si stabiliscano infezioni persistenti nell'ospite felino, avvalorando il ruolo epidemiologico del gatto come serbatoio e fonte di nuove varianti di parvovirus.

Bibliografia

1. Alizon S. & van Baalen M. 2008. Multiple infections, immune dynamics, and evolution of virulence. *Am Nat*, **172**, E150-E168.
2. Battilani M., Gallina L., Vaccari F. & Morganti L. 2007. Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Vet Res Commun*, **31** (1), 209-212.
3. Battilani M., Scagliarini A., Ciulli S., Morganti L. & Proserpi S. 2006. High genetic diversity of the VP2 of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology*, **352** (1), 22-26.
4. Gottschalck E., Alexandersen S., Cohn A., Poulsen L.A., Bloom M.E. & Aasted B. 1991. Nucleotide sequence analysis of Aleutian mink disease parvovirus shows that multiple virus types are present in infected mink. *J Virol*, **65**, 4378-4386.
5. Hoelzer K., Shackelton L., Holmes E.C. & Parrish C.R. 2008. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. *J Virol*, **82** (22), 11096-11105.
6. Hueffer K., Parker J.S.L., Weichert W.S., Geisel R.E., Sgro J.-Y. & Parrish C.R. 2003. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol*, **77** (3), 1718-1726.
7. Kosakovsky Pond S.L., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H. & Frost S.D. 2006. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol*, **23**, 1891-1901.
8. Librado P. & Rozas J.A. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
9. Lin L., Verslype C., Van Pelt J., Van Ranst M. & Fevery J. 2006. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *Eur J Gastroen Hepat*, **18**, 1311-1319.
10. Miyazawa T., Ikeda Y., Nakamura K., Naito R., Mochizuki M., Tohya Y., Vu D., Mikami T. & Takahashi E. 1999. Isolation of feline parvovirus from peripheral blood mononuclear cells of cats in northern Vietnam. *Microbiol Immunol*, **43** (6), 609-612.
11. Shackelton L.A., Hoelzer K., Parrish C.R. & Holmes E.C. 2007. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol*, **88**, 3294-3301.
12. Shackelton L.A., Parrish C.R., Truyen U. & Holmes E.C. 2005. High rate of evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *PNAS*, **102** (2), 379-384.
13. Srivastava G., Wong K.Y., Chiang A.K.S., Lam K.Y. & Tao Q. 2000. Coinfection of multiple strains of Epstein-Barr virus in immunocompetent normal individuals: reassessment of the viral carrier state. *Blood*, **95** (7), 2443-2445.
14. Vieira M.J., Silva E., Desario C., Decaro N., Carvalheira J., Buonavoglia C. & Thompson G. 2008. Natural coinfection with parvovirus variants in dog. *Emerg Infect Dis*, **14** (4), 678-679.
15. Zhang P., Sadland G.J., Feng A., Xu D. & Minchella D.J. 2007. Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. *J Theor Biol*, **248**, 225-240.