

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXXI

**Settore Concorsuale: 07/H3**

**Settore Scientifico Disciplinare: VET/05**

**Epidemiologia molecolare di piccoli virus a DNA a  
singolo filamento**

**Presentata da:** Dott. Stefano De Arcangeli

**Coordinatore Dottorato**

Prof. Arcangelo Gentile

**Supervisore**

Prof.ssa Mara Battilani

**Esame finale anno 2019**



# Indice

<b>Indice</b> .....	1
<b>Lista delle abbreviazioni</b> .....	5
<b>Introduzione</b> .....	7
<b>1. ANALISI MOLECOLARE DEI PROTOPARVOVIRUS DEI CARNIVORI RILEVATI NEI LEUCOCITI DI GATTI NATURALMENTE INFETTI</b> .....	9
<b>1.1 I protoparvovirus dei carnivori</b> .....	9
<i>1.1.1 Introduzione</i> .....	9
<i>1.1.2 Tassonomia</i> .....	10
<i>1.1.3 Struttura virale</i> .....	12
<i>1.1.4 Tropismo tissutale e spettro d'ospite</i> .....	14
<i>1.1.5 Proprietà emoagglutinanti</i> .....	15
<i>1.1.6 Resistenza</i> .....	15
<b>1.2 Le infezioni da FPV nel gatto</b> .....	17
<i>1.2.1 Patogenesi</i> .....	17
<i>1.2.2 Sintomatologia</i> .....	19
<i>1.2.3 Lesioni anatomopatologiche</i> .....	19
<b>1.3 Il CPV-2: emergenza ed ampliamento dello spettro d'ospite al gatto</b> .....	21
<i>1.3.1 Emergenza ed evoluzione del CPV-2</i> .....	21
<i>1.3.2 Infezioni da CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c nel gatto</i> .....	24
<i>1.3.3 Il gatto come carrier di CPV-2</i> .....	25
<b>1.4 Obiettivi dello studio</b> .....	26
<b>1.5 Materiali e metodi</b> .....	27
<i>1.5.1 Disegno dello studio</i> .....	27
<i>1.5.2 Fonte del virus e campionamento</i> .....	27
<i>1.5.3 Separazione del buffy coat ed estrazione del DNA</i> .....	30
<i>1.5.4 Diagnosi di infezione da protoparvovirus mediante SYBR green Real-Time PCR</i> 30	

1.5.5	<i>Amplificazione e sequenziamento di una porzione del gene codificante per la proteina VP2</i> .....	32
1.5.6	<i>Caratterizzazione ed analisi molecolare delle sequenze virali</i> .....	35
1.5.7	<i>Valutazione del titolo anticorpale mediante inibizione dell'emoagglutinazione</i> ....	36
1.6	<b>Risultati</b> .....	39
1.6.1	<i>Diagnosi di infezione da protoparvovirus mediante SYBR green Real-Time PCR</i>	39
1.6.2	<i>Caratterizzazione molecolare delle sequenze virali</i> .....	40
1.6.3	<i>Valutazione del titolo anticorpale mediante inibizione dell'emoagglutinazione</i> ....	43
1.7	<b>Discussione</b> .....	46
1.8	<b>Conclusioni</b> .....	50
1.9	<b>Bibliografia</b> .....	51
<b>2.</b>	<b>INDAGINE MOLECOLARE SULLA DIFFUSIONE DEL CIRCOVIRUS CANINO IN CANIDI DOMESTICI E SELVATICI</b> .....	59
2.1	<b>I circovirus ed il circovirus canino</b> .....	59
2.1.1	<i>Introduzione</i> .....	59
2.1.2	<i>Storia</i> .....	59
2.1.3	<i>Classificazione</i> .....	60
2.1.4	<i>Struttura virale e caratteristiche genomiche</i> .....	62
2.1.5	<i>Proprietà fisiche e biologiche</i> .....	64
2.1.6	<i>Epidemiologia</i> .....	64
2.1.7	<i>Aspetti clinici e patologici</i> .....	65
2.2	<b>Obiettivi degli studi</b> .....	67
2.3	<b>Studio 1: messa a punto di un saggio di SYBR Green Real-Time PCR specifico per CanineCV</b> .....	69
2.3.1	<i>Introduzione</i> .....	69
2.3.2	<i>Materiali e metodi</i> .....	69
2.3.2.1	<i>Disegno dei primer</i> .....	69
2.3.2.2	<i>Allestimento dello standard di riferimento</i> .....	71

2.3.2.3 <i>SYBR Green Real-Time PCR</i> .....	73
2.3.2.4 <i>Determinazione dell'efficienza, della sensibilità e della specificità della Real-Time PCR</i> .....	74
<b>2.3.3 Risultati</b> .....	76
<b>2.3.4 Discussione</b> .....	80
<b>2.4 Studio 2: indagine sulla circolazione del CanineCV in cani positivi per CPV-2 e in una popolazione di volpi rosse</b> .....	82
2.4.1 <i>Introduzione</i> .....	82
2.4.2 <i>Materiali e Metodi</i> .....	82
2.4.2.1 <i>Disegno dello studio</i> .....	82
2.4.2.2 <i>Cani: popolazione di studio</i> .....	82
2.4.2.3 <i>Cani: ricerca del DNA di CanineCV</i> .....	89
2.4.2.4 <i>Cani: analisi della sopravvivenza, tempo di ricovero e variabili clinico-patologiche</i> .....	89
2.4.2.5 <i>Volpi: popolazione di studio</i> .....	90
2.4.2.6 <i>Volpi: ricerca del DNA di CanineCV</i> .....	90
2.4.2.7 <i>Amplificazione e sequenziamento dei circovirus identificati</i> .....	92
2.4.2.8 <i>Rolling Circle Amplification</i> .....	94
2.4.2.9 <i>Analisi bioinformatiche</i> .....	95
<b>2.4.3 Risultati</b> .....	96
2.4.3.1 <i>Cani: popolazioni di studio e ricerca del DNA di CanineCV mediante SYBR Green Real-Time PCR</i> .....	96
2.4.3.2 <i>Cani: analisi statistica delle variabili cliniche e clinico-patologiche</i> .....	96
2.4.3.3 <i>Volpi: popolazione di studio</i> .....	99
2.4.3.4 <i>Volpi: ricerca del DNA di CanineCV mediante SYBR Green Real-Time PCR</i> ...	99
2.4.3.5 <i>Amplificazione e sequenziamento</i> .....	99
2.4.3.6 <i>Risultati analisi bioinformatiche</i> .....	100
<b>2.4.4 Discussione</b> .....	104
<b>2.5 Conclusioni</b> .....	108

<b>2.6 Bibliografia .....</b>	<b>109</b>
<b>Appendice .....</b>	<b>113</b>
<b><i>Pubblicazione allegata:</i> .....</b>	<b>113</b>
Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., Battilani, M., 2018. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. BMC Vet Res. 14(1):41. ....	113

## Lista delle abbreviazioni

A-72:	cellule di fibroma canino
BFVD:	<i>Beak and feather disease virus</i> (virus della malattia del becco e delle penne)
bp:	base pair (paia di basi)
BTBS:	Bis-Tris buffered saline
°C:	gradi centigradi
CaCl <sub>2</sub> :	cloruro di calcio
CAdV-1:	<i>Canine adenovirus 1</i>
CanineCV:	<i>Canine circovirus</i> (Circovirus canino)
CAV:	<i>Chicken anaemia virus</i> (virus dell'anemia infettiva del pollo)
CDV:	<i>Canine distemper virus</i> (virus del cimurro)
CLINLAB:	Servizio di Patologia Clinica
CCoV:	<i>Canine coronavirus</i> (coronavirus canino)
CPV-1:	canine parvovirus 1 (parvovirus canino tipo 1)
CPV-2:	canine parvovirus 2 (parvovirus canino tipo 2)
CRFK:	Crandell Rees feline kidney
Crm1:	chromosomal maintenance 1
Ct:	ciclo soglia
D17:	cellule di osteosarcoma canino
DIMEVET:	Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie; Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
DNA:	deoxyribonucleic acid (acido deossiribonucleico)
dNTP:	deossinucleotidi trifosfato
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid (acido etilendiamminotetraacetico)
FAM:	carbossifluorescina
FCWF:	felis catus whole foetus
FPV:	feline panleukopenia virus (virus della panleucopenia felina)
g:	grammi
H <sub>2</sub> O:	acqua
HA:	emoagglutinazione
HAU:	unità emoagglutinanti
HI:	hemagglutination inhibition (inibizione dell'emoagglutinazione)
INFLAB:	Laboratorio di Diagnostica delle Malattie Infettive
IR:	regioni intergeniche
IZSLER:	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna “Bruno Ubertini”
kb:	kilobase
Kg:	chilogrammi
LOD:	limite di detection

M:	molare
MCV:	minute virus of canines (virus minute del cane)
MDCK:	Madin-Darby canine kidney
MEV:	mink enteritis virus (virus dell'enterite del visone)
MgCl <sub>2</sub> :	cloruro di magnesio
min:	minuti
ML:	Maximum Likelihood (massima verosimiglianza)
mM:	millimolare
μl:	microlitri
μM:	micromolare
ml:	millilitro
nm:	Nanometro
NaCl:	cloruro di sodio
NGS:	sequenziamento di nuova generazione
nt:	Nucleotide
ORF:	open reading frame
PBMC:	peripheral blood mononuclear cell (cellule mononucleate del sangue periferico)
PBS:	phosphate buffered saline (tampone fosfato salino)
PCR:	polymerase chain reaction (reazione a catena della polimerasi)
PCV-1:	<i>Porcine circovirus 1</i> (circovirus suino tipo 1)
PCV-2:	<i>Porcine circovirus 2</i> (circovirus suino tipo 2)
PK-15:	Porcine Kidney (rene suino)-15
RBC:	eritrociti
RCA:	rolling circle amplification
RCF:	relative centrifugal force (forza centrifuga relativa)
rpm:	rotazioni per minuto
RPV:	raccoon parvovirus (parvovirus del procione)
RNA:	ribonucleic acid (acido ribonucleico)
sec:	secondi
SPF:	specific pathogen free
ssDNA	DNA singolo filamento
TAE:	Tris-acetato EDTA
TfR:	transferrin receptor (recettore per la transferrina)
T <sub>m</sub> :	temperatura di melting
UHA:	unit of hemagglutination (unità emoagglutinanti)
UV:	raggi ultravioletti
VERO:	cellule di rene di scimmia verde africana
WRCC:	Walter Reed canine cells

## Introduzione

I parvovirus ed i circovirus sono tra i più piccoli virus in grado di infettare e causare patologie negli animali e possiedono un genoma molto semplice, formato da una sola, breve molecola di DNA a singolo filamento (ssDNA), lineare nei primi e circolare nei secondi (MacLachlan e Dubovi, 2017).

I virus con genoma a ssDNA presentano tassi di mutazione e sostituzione nucleotidica più elevati rispetto ai virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) e più simili a quelli dei virus a RNA (Shackelton et al., 2005). Questa caratteristica è alla base dell'emergenza e dell'evoluzione del parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), originatosi alla fine degli anni '70 probabilmente da un parvovirus circolante nei carnivori selvatici, e poi evolutosi molto rapidamente con la comparsa di tre varianti antigeniche (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) che hanno completamente soppiantato la variante originaria. Le nuove varianti avevano inoltre acquisito la capacità di infettare il gatto, il cui ruolo nell'epidemiologia del CPV-2, non è ancora stato del tutto chiarito (Clegg et al., 2012).

L'elevata variabilità genetica è una caratteristica propria anche dei circovirus ed è stata estensivamente studiata nel *Porcine circovirus 2*, il quale presenta delle dinamiche evolutive strettamente connesse alla pressione selettiva esercitata dall'utilizzo di vaccini negli allevamenti suinicoli (Franzo et al., 2016). Negli ultimi anni, l'avvento delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione ha permesso l'identificazione di numerosi nuovi circovirus, tra cui il *Canine circovirus* (CanineCV), un virus in grado di infettare il cane ed i canidi domestici (Kapoor et al., 2012; Bexton et al., 2015). Fin dalla prima identificazione del CanineCV, numerosi studi ne hanno indagato l'eventuale ruolo patogeno nella specie canina, senza tuttavia giungere a risultati conclusivi (Caddy et al., 2018). A conferma della variabilità genetica esistente all'interno del genere *Circovirus*, notevoli differenze sono state evidenziate a livello di sequenze nucleotidiche tra i CanineCV rilevati nei cani e quelli rilevati nelle volpi (Zaccaria et al., 2016). E' quindi necessario, nell'ambito di indagini epidemiologiche e diagnostiche, utilizzare metodiche di rilevamento del virus che non siano inficcate da tali differenze genetiche.

- Bexton, S., Wiersma, L.C., Getu, S., van Run, P.R., Verjans, G.M.G.M., Schipper, D., Schapendonk, C.M.E., Bodewes, R., Oldroyd, L., Haagmans, B.L., Koopmans, M.M.P., Smits, S.L., 2015. Detection of Circovirus in Foxes with Meningoencephalitis, United Kingdom, 2009–2013. *Emerg Infect Dis* 21, 1205–1208.
- Caddy, S.L., 2018. New viruses associated with canine gastroenteritis. *Vet J* 232, 57–64.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2012. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Vet Microbiol* 157, 78–85.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci Rep* 6.
- Kapoor, A., Dubovi, E.J., Henriquez-Rivera, J.A., Lipkin, W.I., 2012. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol* 86, 7018.
- MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J., 2017. *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Academic Press, Boston, Massachusetts.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 379–384.
- Zaccaria, G., Malatesta, D., Scipioni, G., Di Felice, E., Campolo, M., Casaccia, C., Savini, G., Di Sabatino, D., Lorusso, A., 2016. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology* 490, 69–74.

# 1. ANALISI MOLECOLARE DEI PROTOPARVOVIRUS DEI CARNIVORI RILEVATI NEI LEUCOCITI DI GATTI NATURALMENTE INFETTI

## 1.1 I protoparvovirus dei carnivori

### 1.1.1 Introduzione

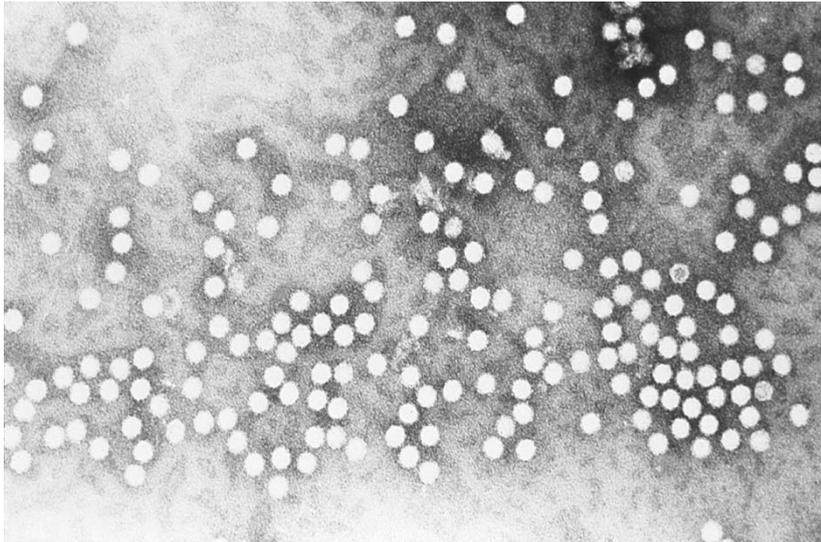
I parvovirus (dal latino *parvus*, piccolo; **Figura 1.1**) sono piccoli virus che infettano un'ampia varietà di ospiti vertebrati ed invertebrati, compresi numerosi membri dell'ordine *Carnivora* (Steinel et al., 2001; Liu et al., 2011).

All'interno della specie *Carnivore protoparvovirus 1* sono contemplati alcuni virus strettamente correlati tra loro in grado di causare gravi patologie nei carnivori domestici e selvatici (Balboni et al., 2018; ICTV, 2018). Due di questi virus, il virus della panleucopenia felina (FPV) ed il parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), rappresentano una seria minaccia per la salute di gatti e cani non adeguatamente immunizzati (Clegg et al., 2012).

La panleucopenia felina, sostenuta da FPV, è una patologia nota da più di cento anni ed è stata la prima malattia infettiva del gatto di cui è stata riconosciuta l'eziologia virale; infatti, sebbene l'agente eziologico sia stato isolato in coltura solo nel 1965, le prime evidenze che la malattia fosse causata da un agente filtrabile risalgono agli anni '20 del secolo scorso (Verge e Christoforoni, 1928; Johnson et al., 1967; van Vuuren et al., 2000). Il FPV mostra uno spettro d'ospite limitato al gatto ed ai felidi selvatici e non colpisce i canidi, sebbene nel cane sia stata osservata, in condizioni sperimentali, l'infezione del timo e del midollo osseo senza diffusione sistemica ed eliminazione virale (Parrish, 1999; Steinel et al., 2000).

Alla fine degli anni '70 un parvovirus strettamente correlato al FPV è emerso nella popolazione canina e si è rapidamente diffuso in tutto il mondo (Appel et al., 1979). Tale virus venne denominato CPV-2 al fine di distinguerlo dal virus minuto del cane (MCV), chiamato anche parvovirus canino tipo 1 (CPV-1). Il CPV-2 causava enteriti emorragiche e miocarditi nei cani ma non infettava i gatti (Clegg et al., 2012). Il processo evolutivo

del CPV-2 originale è poi proseguito con notevole rapidità, portando all'emergenza di nuove varianti antigeniche (CPV-2a, 2b e 2c) che si sono diffuse in tutto il mondo fino a soppiantare completamente il ceppo originario, ad oggi estinto in natura. Le nuove varianti, a differenza del CPV-2 originale, avevano acquisito la capacità di infettare e replicare anche nell'ospite felino (Truyen et al., 1996a).



**Figura 1.1:** numerosi virioni di parvovirus in una immagine ottenuta tramite microscopia elettronica a trasmissione (modificato da <https://phil.cdc.gov>)

### **1.1.2 Tassonomia**

La tassonomia dei parvovirus può generare confusione poiché è basata principalmente sulle caratteristiche molecolari dei virus piuttosto che sul loro ospite di origine (MacLachlan e Dubovi, 2017). Inoltre, nel 2013 è avvenuta una profonda riorganizzazione della nomenclatura e della tassonomia della famiglia *Parvoviridae* che ha portato alla definizione di nuovi generi e specie ed al conseguente abbandono di quelli storicamente utilizzati (Cotmore et al., 2014; MacLachlan e Dubovi, 2017; ICTV, 2018). La classificazione adottata nel 2013 ha mantenuto la suddivisione della famiglia *Parvoviridae* nelle due sottofamiglie *Densovirinae* e *Parvovirinae* in base allo spettro d'ospite: alla prima sottofamiglia appartengono i parvovirus infettanti gli artropodi, mentre nella seconda vengono inclusi quelli infettanti i vertebrati (Cotmore et al, 2014).

L'organizzazione dei generi e delle specie all'interno delle due sottofamiglie ha invece subito modifiche sostanziali (Cotmore et al., 2014).

Attualmente nella sottofamiglia *Densovirinae* sono inclusi cinque generi, mentre nella sottofamiglia *Parvovirinae* otto (**Tabella 1.1**) (ICTV, 2018).

Sottofamiglia	Genere
<i>Densovirinae</i>	<i>Ambidensovirus</i>
	<i>Brevidensovirus</i>
	<i>Hepandensovirus</i>
	<i>Iteradensovirus</i>
	<i>Penstyldensovirus</i>
<i>Parvovirinae</i>	<i>Amdoparvovirus</i>
	<i>Aveparvovirus</i>
	<i>Bocaparvovirus</i>
	<i>Copiparvovirus</i>
	<i>Dependoparvovirus</i>
	<i>Erythroparvovirus</i>
	<i>Protoparvovirus</i>
<i>Tetraparvovirus</i>	

**Tabella 1.1:** classificazione tassonomica della famiglia *Parvoviridae* (modificato da: <https://talk.ictvonline.org/>)

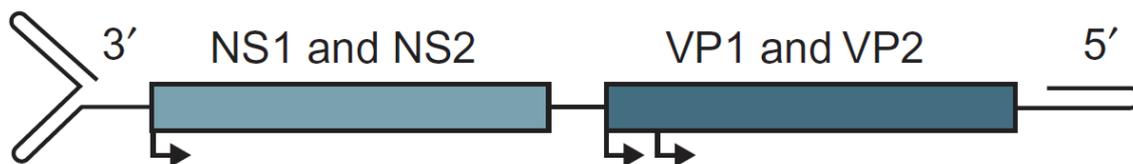
Il genere *Protoparvovirus* (*Parvovirus* secondo la classificazione precedente) include la maggior parte dei parvovirus patogeni per gli animali e comprende undici specie virali: *Carnivore protoparvovirus 1*, *Chiropteran protoparvovirus 1*, *Eulipotyphla protoparvovirus 1*, *Primate protoparvovirus 1*, *Primate protoparvovirus 2*, *Primate protoparvovirus 3*, *Rodent protoparvovirus 1*, *Rodent protoparvovirus 2*, *Rodent protoparvovirus 3*, *Ungulate protoparvovirus 1* e *Ungulate protoparvovirus 2* (MacLachlan e Dubovi, 2017; ICTV, 2018).

Secondo l'attuale classificazione, il virus della panleucopenia felina, il parvovirus canino tipo 2, il virus dell'enterite del visone (MEV) ed il parvovirus del procione (RPV) sono

considerati come varianti d'ospite di un'unica specie: il *Carnivore protoparvovirus 1* (Cotmore et al., 2014).

### 1.1.3 Struttura virale

I parvovirus sono piccoli virus (25 nm di diametro) sprovvisti di envelope e con un capsido a simmetria icosaedrica. Il loro genoma è costituito da un singolo filamento di DNA di circa 5000 basi, all'interno del quale sono presenti due ORF principali (Cotmore e Tattersall, 1987; Chapman e Rossmann, 1993). L'ORF posto nella metà 3' del genoma codifica, mediante splicing alternativo degli RNA messaggeri, per le proteine non strutturali (NS1 e NS2) mentre quello posto nella metà 5' codifica, mediante lo stesso meccanismo di splicing, per le proteine strutturali (VP1 e VP2). Entrambe le estremità del genoma terminano con sequenze palindromiche di circa 150 basi ripiegate a formare delle strutture a forcina. Tali sequenze sono fondamentali per la replicazione del DNA virale (**Figura 1.2**) (Reed et al., 1988; Parrish, 1999).



**Figura 1.2:** rappresentazione schematica dell'organizzazione genomica del *Carnivore protoparvovirus 1* (modificato da MacLachlan e Dubovi, 2017).

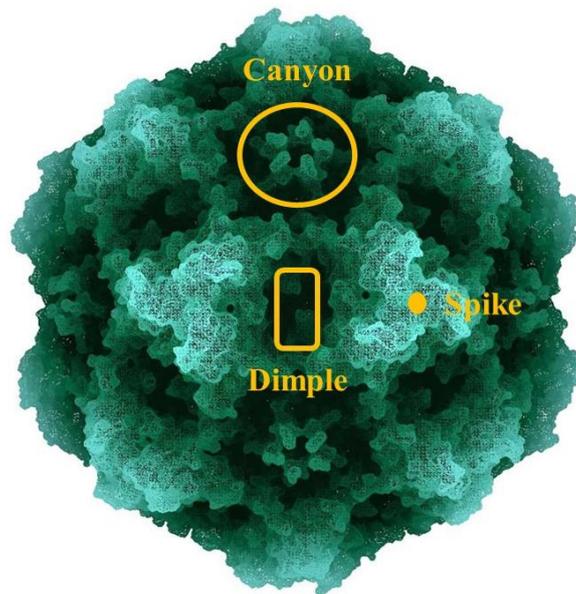
Il capsido dei parvovirus presenta una struttura a simmetria icosaedrica T=1 ed è costituito da 60 subunità costituite in larga parte dalla proteina virale VP2 (54-55 copie) ed in minor misura dalle proteine VP1 (5-6 copie) (Tsao et al., 1991). Le sequenze amminoacidiche delle proteine VP1 (727 residui) e VP2 (584 residui) differiscono solo per la presenza di 143 amminoacidi aggiuntivi all'estremità N-terminale della VP1 (Agbandje et al., 1993). Nei virioni maturi (chiamati “full” poiché possiedono il genoma) si rinviene anche una terza proteina, la VP3, derivante dalla proteina VP2 attraverso un processo di clivaggio enzimatico (Weichert et al., 1998).

Le proteine strutturali e non strutturali svolgono numerose funzioni biologiche, come controllare il processo di replicazione virale e determinare il tropismo d'ospite e l'antigenicità dei parvovirus (**Tabella 1.2**) (Kailasan et al., 2015).

La cristallografia a raggi X ha permesso di determinare la struttura tridimensionale dei parvovirus. La superficie esterna del capsido è resa irregolare dalla presenza di protrusioni, dette *spike*, lungo agli assi di simmetria ternari, depressioni definite *dimple-like* in corrispondenza degli assi di simmetria binari e altre depressioni circolari, i *canyon*, attorno gli assi di simmetria quinari (**Figura 1.3**) (Agbandje et al., 1993; Tsao et al., 1991; Xie e Chapman, 1996).

<b>Proteina</b>	<b>Funzione</b>
NS1	Proteina nucleare coinvolta nel controllo del processo di replicazione del DNA virale: riconosce il DNA virale durante la replicazione, forma i “ <i>nicks</i> ” ed è dotata di attività elicastica. Controlla inoltre l'impacchettamento del genoma virale all'interno del capsido e l'apoptosi cellulare.
NS2	Si rinviene nel nucleo e nel citoplasma, dove viene attivamente trasportata dalla proteina Crm1 e facilita un efficiente assemblaggio del capsido.
VP2	Forma il capsido. Presiede l'interazione virale con i recettori cellulari per la transferrina (TfR) e con l'acido sialico, determinando il tropismo d'ospite e le proprietà emoagglutinanti; controlla l'impacchettamento del DNA virale nel capsido. Presenta gli epitopi antigenici principali.
VP1	Oltre a funzioni strutturali simili alla VP2, presenta attività fosfolipasica A2 importante per il processo di infezione cellulare.

**Tabella 1.2:** Proteine strutturali e non strutturali dei parvovirus e loro funzioni (modificato da Parrish e Kawaoka, 2005).



*Figura 1.3: Rappresentazione schematica di un virione di CPV-2 da analisi cristallografiche (modificato da Xie e Chapman, 1996)*

#### ***1.1.4 Tropismo tissutale e spettro d'ospite***

I parvovirus non contengono né codificano una DNA polimerasi virale; di conseguenza per poter copiare il proprio genoma utilizzano la DNA polimerasi delle cellule ospiti, replicando esclusivamente nel nucleo di cellule in attiva divisione (Cotmore e Tattersall, 1987). Questo aspetto della replicazione virale è alla base del tropismo tissutale dei protoparvovirus dei carnivori e dei diversi esiti che l'infezione può avere a seconda dell'età dell'ospite. Nella vita fetale o neonatale, in cui tutti i tessuti sono in piena attività mitotica, si osservano infezioni generalizzate; in animali di età superiore alle quattro settimane, invece, il virus manifesta uno spiccato tropismo per i tessuti emopoietici e per l'epitelio intestinale, poiché questi ultimi mantengono un'elevata attività mitotica anche nell'età adulta (Parrish, 1995; Kailasan et al., 2015).

La penetrazione dei protoparvovirus dei carnivori all'interno delle cellule ospiti è legata all'interazione tra i siti di legame presenti sul capsido virale ed i TfR esposti sulla superficie cellulare; l'indisponibilità dei recettori per la transferrina impedisce l'adsorbimento virale (Parker et al., 2001; Ros et al., 2017). I virus presentano siti di legame anche per i residui di acido sialico presente sulla superficie di alcuni tipi cellulari, come ad esempio gli eritrociti. Tale legame, seppur importante nel meccanismo di

emoagglutinazione, non sembra avere un ruolo fondamentale nel determinare l'infezione; ciò è confermato dal fatto che i virioni privati dei recettori per l'acido sialico mantengono la capacità infettante (Barbis et al., 1992). La specificità dei siti di legame capsidici per i recettori della transferrina delle varie specie animali è alla base delle differenze nello spettro d'ospite tra i diversi membri della specie *Carnivore protoparvovirus 1* (Goodman et al. 2010); proprio l'acquisizione della capacità di legare i recettori della transferrina canina da parte di un parvovirus strettamente correlato al FPV avrebbe portato all'emergenza del CPV-2 (Parrish and Kawaoka, 2005).

### ***1.1.5 Proprietà emoagglutinanti***

I ceppi di *Carnivore protoparvovirus 1* presentano la capacità di agglutinare gli eritrociti di diverse specie animali a determinate condizioni di temperatura e di pH. Tale capacità è legata all'interazione tra i virioni e i residui di acido sialico presenti sulla superficie delle emazie. In particolare, il CPV-2 manifesta la capacità di agglutinare gli eritrociti di suino, macaco reso, cavallo e gatto a valori di pH compresi tra 6.0 e 7.2. Il FPV possiede capacità emoagglutinanti nei confronti degli eritrociti di suino, macaco reso e cavallo a valori di pH inferiori a 6,8 (Carmichael et al., 1980; Senda et al., 1986; Barbis et al., 1992).

Questa proprietà di determinare emoagglutinazione è frequentemente sfruttata in laboratorio a scopo diagnostico, sia per rilevare il virus che per valutare l'immunità umorale di un soggetto mediante il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

### ***1.1.6 Resistenza***

I parvovirus mostrano elevata resistenza alle condizioni ambientali e ad un'ampia varietà di agenti fisici e chimici (Scagliarini et al., 2013). Il riscaldamento a 56 °C non comporta una diminuzione del titolo virale e se conservati a 4 °C o a temperatura ambiente all'interno di materiale organico i virioni mantengono la capacità infettante per oltre un anno (Poole, 1972; Scagliarini et al., 2013). I parvovirus resistono al trattamento con calore secco per 10 minuti ad 80 °C e 1 minuto a 90 °C; sono stabili a valori di pH compresi tra 3 e 9 e non vengono inattivati da solventi lipidici, tripsina, cloroformio, alcoli, fenoli e sali quaternari dell'ammonio (Eterpi et al., 2009; Scagliarini et al., 2013)

I virioni risultano invece suscettibili ai raggi ultravioletti, alla formalina, al beta-proprionaltone, all'idrossilamina e a numerosi agenti ossidanti, come il cloro e l'acido paracetico. Il calore umido determina l'inattivazione virale in 10 minuti ad 80 °C e 1 minuto a 90 °C (Siegl et al., 1985; Eterpi et al., 2009; Scagliarini et al., 2013).

## 1.2 Le infezioni da FPV nel gatto

### *1.2.1 Patogenesi*

Come detto in precedenza, i parvovirus non contengono al loro interno l'enzima DNA polimerasi né presentano geni atti a codificarla. A causa di questa limitazione hanno bisogno di sfruttare i meccanismi replicativi delle cellule nella fase S del ciclo cellulare per potersi replicare; ciò spiega lo spiccato tropismo dei protoparvovirus per i tessuti con intensa attività mitotica, quali ad esempio il midollo osseo, l'epitelio intestinale ed il tessuto linfoide (Stuetzer e Hartmann, 2014).

La trasmissione dei protoparvovirus dei carnivori avviene per via oro-fecale, sia direttamente, a seguito del contatto con animali infetti, sia indirettamente, tramite ambienti o fomite contaminati (Stuetzer e Hartmann, 2014).

La patogenesi della parvovirosi nel gatto è stata chiarita per quanto riguarda la variante specifica per la specie felina (FPV) (Csiza et al., 1971a; Csiza et al., 1971b). Dopo l'ingresso per via oro-nasale, il virus va incontro ad una prima replicazione nel tessuto linfatico oro-faringeo; questa fase avviene dalle 18 alle 24 ore post-infezione ed è seguita, nell'arco di 2-7 giorni, da una fase di viremia (Csiza et al., 1971a; Csiza et al., 1971b). Sebbene la viremia comporti la disseminazione del virus in tutto l'organismo, le lesioni più importanti si rinvencono nei tessuti caratterizzati da maggiore attività mitotica. L'infezione dei tessuti linfoidei causa necrosi e citolisi con conseguente linfopenia, aggravata dal passaggio dei linfociti nei tessuti. L'interessamento delle cellule progenitrici mieloidi nel midollo osseo comporta una drastica diminuzione anche delle restanti cellule della linea bianca, causando panleucopenia e grave immunosoppressione (Parrish, 1995).

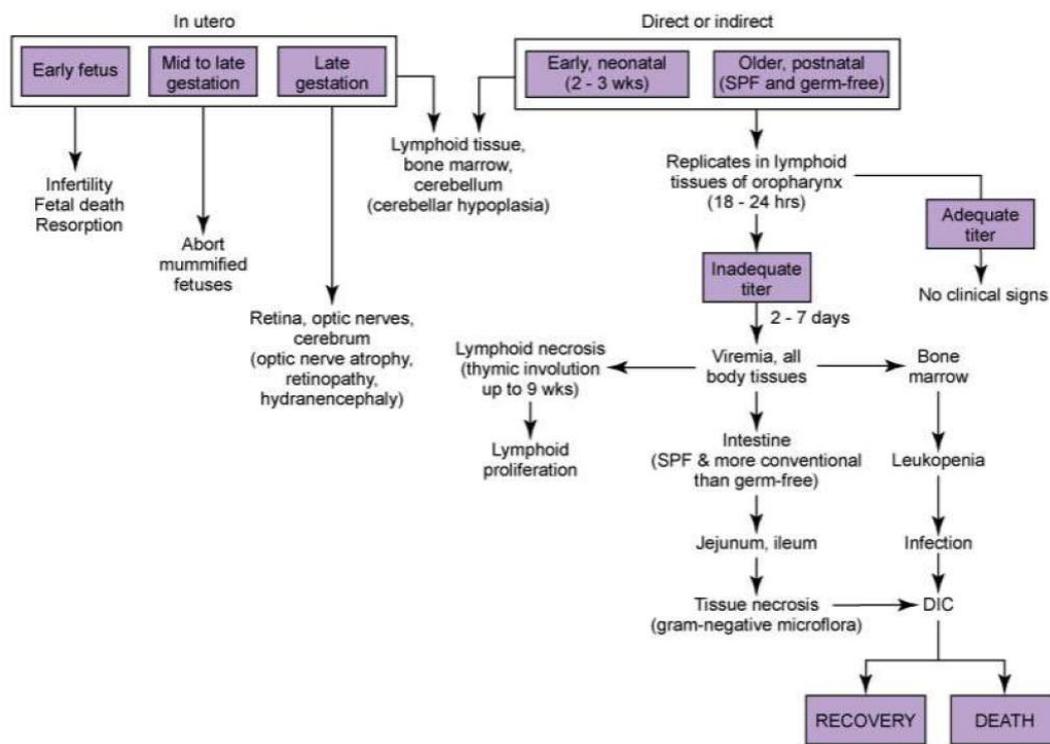
A livello intestinale il virus infetta le cellule germinali poste più in profondità nelle cripte Lieberkühn, poiché, a differenza delle cellule mature che rivestono i villi, possiedono una intensa attività mitotica. La distruzione delle cellule delle cripte intestinali inficia il fisiologico turnover dell'epitelio intestinale portando all'accorciamento dei villi (con conseguente malassorbimento) e ad aumento della permeabilità della mucosa. La perdita di integrità della mucosa favorisce inoltre la traslocazione batterica dal lume intestinale

al torrente ematico, aumentando così il rischio di sviluppare setticemia (Stuetzer e Hartmann, 2014).

Il virus è inoltre in grado di attraversare la barriera placentare ed infettare i feti, causando, a seconda della fase della gravidanza, un'ampia varietà di disturbi. Infezioni precoci possono portare a morte, aborto, riassorbimento o mummificazione dei feti, mentre infezioni più tardive causano generalmente danni al cervello, cervelletto, retina e nervi ottici. Le infezioni tardive esitano frequentemente in ipoplasia cerebellare (Aeffner et al., 2006).

Malgrado gli animali infetti eliminino il virus attraverso tutte le secrezioni, la quantità maggiore di virioni viene eliminata attraverso le feci (Greene, 2012).

La patogenesi dell'infezione da FPV è riassunta nella **Figura 1.4**.



**Figura 1.4:** Patogenesi dell'infezione da FPV (modificato da Greene, 2012)

### ***1.2.2 Sintomatologia***

L'infezione da FPV nel gatto può decorrere in forme cliniche differenti a seconda dell'età dell'animale, della presenza di infezioni concomitanti e dell'immunità nei confronti del virus (Foley et al., 1999).

La forma acuta è la più comune nei gatti non vaccinati di età compresa tra i 3 ed i 5 mesi ed è caratterizzata da elevata morbilità e letalità (Addie et al., 1996; Greene, 2012).

I gatti infetti, dopo un periodo di incubazione della durata di 2 – 10 giorni, possono manifestare segni clinici aspecifici, come depressione, anoressia ed ipertermia a cui generalmente fa seguito la comparsa di vomito non connesso all'assunzione di alimento. Un numero limitato di soggetti, nelle fasi più avanzate dell'infezione, può sviluppare diarrea acquosa o emorragica. Negli stadi finali i gatti possono presentarsi ipotermici, deboli, disidratati e gravemente depressi. Lo sviluppo di setticemia o coagulazione intravasale disseminata concorre ad aggravare il quadro clinico impattando negativamente sulla prognosi. I gatti che riescono a sopravvivere i primi 5 giorni dalla comparsa dei segni clinici generalmente superano la malattia nell'arco di alcuni giorni o settimane (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Una forma di panleucopenia felina iperacuta caratterizzata da morte improvvisa senza sviluppo di segni clinici è stata descritta in gattini di età compresa tra 4 settimane e 12 mesi (Addie et al., 1998).

I gattini nati da madri infettatesi nell'ultima fase della gravidanza possono presentare numerosi segni neurologici, come atassia, ipermetria, cecità, incoordinazione, tremori, convulsioni o alterazioni del comportamento (Greene, 2012; Sykes, 2014)

Nei gatti adulti immunocompetenti, invece, l'infezione può decorrere in maniera asintomatica o paucisintomatica (Sykes, 2014).

### ***1.2.3 Lesioni anatomopatologiche***

Nei gatti affetti da panleucopenia felina le lesioni macroscopiche più evidenti si rinvengono a carico dell'intestino tenue. Le anse intestinali si presentano dilatate, ispessite ed iperemiche; sia la superficie sierosa che quella mucosa possono essere interessate da lesioni emorragiche. Il contenuto intestinale è generalmente liquido, emorragico e con odore fetido. I linfonodi mesenterici possono apparire megalici, edematosi ed emorragici (Marcato, 2002; Greene, 2012; Sykes 2014).

I gattini infettatisi durante la vita fetale possono presentare ipoplasia cerebellare, idrocefalia ed idranencefalia (Greene et al., 2012).

Le lesioni istopatologiche nel tratto intestinale si concentrano a carico del digiuno e dell'ileo e consistono in una dilatazione delle cripte di Lieberkuhn con necrosi delle cellule epiteliali che le rivestono, accumulo di detriti cellulari, infiltrazione neutrofilica, perdita dei villi e edema della sottomucosa. Nei tessuti linfoidei si notano deplezione linfocitaria causata da linfocitolisi. Il midollo osseo emopoietico può presentarsi ipoplastico (Marcato, 2002; Greene, 2012; Sykes 2014).

## **1.3 Il CPV-2: emergenza ed ampliamento dello spettro d'ospite al gatto**

### ***1.3.1 Emergenza ed evoluzione del CPV-2***

Il parvovirus canino tipo 2 venne identificato per la prima volta nel 1978 negli Stati Uniti d'America associato ad una malattia ad elevata mortalità caratterizzata da enterite emorragica nei cani giovani e miocarditi nei cuccioli (Appel et al., 1979). Dal momento della prima descrizione, il virus si diffuse rapidamente in tutto il mondo (Carmichael et al., 1994; Carmichael, 2005). Indagini sierologiche successive condotte in Europa hanno permesso di evidenziare come il virus circolasse in Belgio dal 1976 e probabilmente in Grecia dal 1974; questi risultati confermano quanto indicato da recenti analisi filogenetiche, che datano l'emergenza del CPV-2 nella prima metà degli anni '70 (Schwers et al., 1979; Koptopoulos et al., 1986; Hoelzer et al., 2008). Secondo l'ipotesi più accreditata, il CPV-2 deriverebbe dal FPV o più probabilmente da un parvovirus "FPV-like" circolante nei carnivori selvatici (Hoelzer e Parrish, 2010). Il ruolo della fauna selvatica nell'emergenza del CPV-2 è confermato da analisi filogenetiche condotte su diversi virus "FPV-like" campionati negli '60, '70 e '80, le quali hanno evidenziato come il CPV-2 sia strettamente correlato ad un ceppo virale derivante da una volpe artica proveniente da un allevamento in Finlandia (Truyen et al., 1995). Inoltre, una sequenza parziale di DNA di un parvovirus con caratteristiche intermedie tra FPV e CPV-2 è stata identificata da una volpe rossa in Germania (Truyen et al., 1998; Steinel et al., 2001).

Il CPV-2 ed il FPV sono identici a livello genomico per oltre il 98%, ma presentano spettro d'ospite, antigenicità e proprietà emoagglutinanti differenti, riconducibili a limitate differenze nel gene codificante per le proteine del capsido (VP1 e VP2) (Chang et al., 1992; Shackelton et al., 2005). Tali differenze hanno permesso al CPV-2 di acquisire la capacità di legare i recettori per la transferrina canina e quindi infettare il cane, ma allo stesso tempo hanno determinato la perdita della capacità di infettare il gatto (Truyen et al., 1996a; Shackelton et al., 2005). Le differenze tra la proteina VP2 dell'FPV e del CPV-2 sono limitate a sei amminoacidi posti a livello dell'asse di simmetria ternario del capsido (Truyen et al., 1995). Le sostituzioni a carico degli amminoacidi 93 (da Lys a Asn), 103 (da Val a Ala), 323 (da Asp a Asn) sono considerate alla base

dell'acquisizione della capacità di infettare la specie canina, mentre quelle a carico degli amminoacidi 80 (da Lys a Arg), 564 (da Asn a Ser) e 568 (da Ala a Gly) sarebbero responsabili dell'impossibilità di causare infezione nel gatto (Chang et al., 1992; Truyen et al., 1994; Truyen et al., 1995).

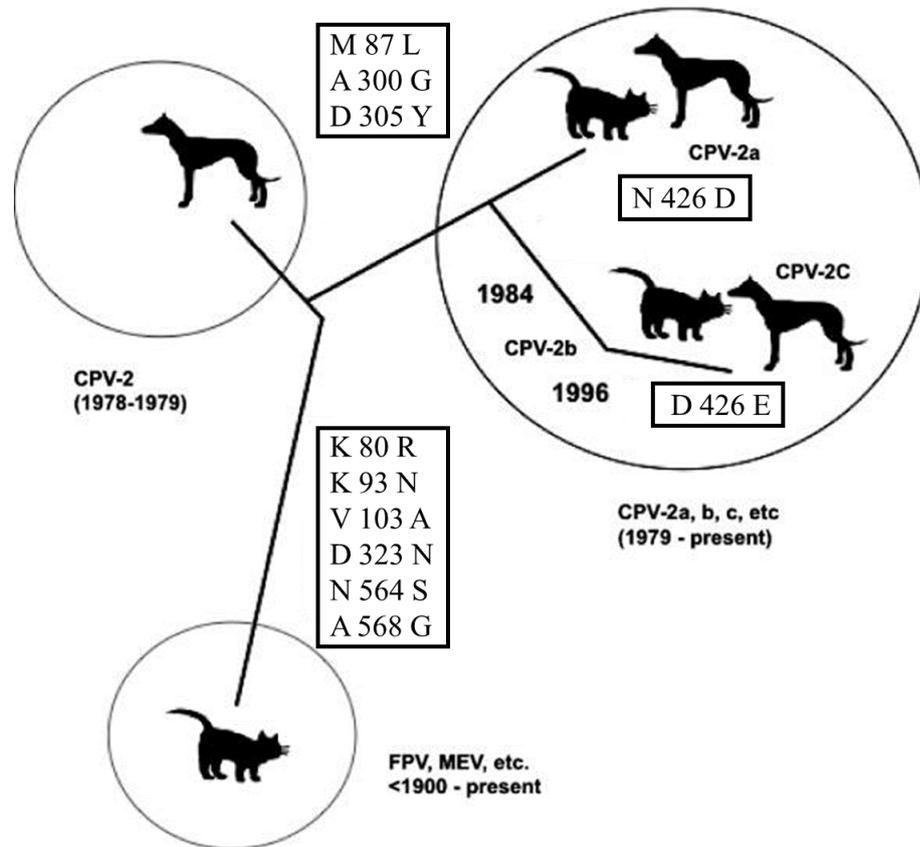
Dalla sua emergenza, il CPV-2 è andato incontro ad un processo evolutivo estremamente rapido che ha portato alla comparsa nel 1979 di una nuova variante antigenicamente e geneticamente distinta, chiamata CPV-2a (Parrish et al., 1988). A differenza del ceppo originario, la nuova variante era in grado di infettare anche la specie felina e sostituì a livello globale il CPV-2 nell'arco di appena due o tre anni, dimostrando di possedere un notevole vantaggio epidemiologico (Parrish et al., 1988). Dal punto di vista amminoacidico il CPV-2 e CPV-2a si distinguono per cinque o sei sostituzioni a carico della proteina VP2; le sostituzioni in posizione 87 (da Met a Leu), 300 (da Ala a Gly) e 305 (da Asp a Tyr) permettono alla variante CPV-2a di infettare e causare malattia nel gatto (Truyen et al., 1996a).

Nel corso degli anni successivi sono state descritte due nuove varianti antigeniche, entrambe patogene per il cane e per il gatto: CPV-2b e CPV-2c. Il CPV-2b venne identificato per la prima volta nel 1984 negli USA mentre la variante CPV-2c fu descritta in Italia nel 2000, sebbene studi successivi ne abbiano accertato la circolazione in Germania già nel 1996 (Parrish et al., 1991; Buonavoglia et al., 2001; Decaro et al., 2007). Le differenze antigeniche tra le tre varianti dipendono dal residuo 426 della proteina del capsido VP2 (Asn nel CPV-2a, Asp nel CPV-2b e Glu nel CPV-2c) (Organtini et al., 2015). In alcuni CPV-2a e CPV-2b, talvolta definiti come "nuovi" CPV-2a e 2b, è stata inoltre descritta un'ulteriore sostituzione (da Ser to Ala) in posizione 297 (Martella et al., 2006).

Le tappe dell'evoluzione del CPV-2 sono riassunte nella **Figura 1.5**.

Il rapido processo evolutivo del CPV-2, accompagnato dalla comparsa di tre varianti antigeniche e dall'acquisizione della capacità di infettare anche il gatto contrasta con la notevole stabilità evolutiva di numerosi altri virus a DNA (Shackelton et al., 2005). La replicazione dei virus a DNA, infatti, avviene mediante DNA polimerasi, di conseguenza dovrebbero presentare tassi di mutazione sovrapponibili a quelli delle cellule ospiti. Tale assunto risulta essere vero per i virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) con genoma di grandi dimensioni ed in parte per quelli con genoma di piccole dimensioni, ma non per

i virus a DNA a singolo filamento (ssDNA), come appunto i parvovirus (Shackelton et al., 2005).



**Figura 1.5:** schema del processo evolutivo che ha portato all'emergenza del CPV-2 e relative varianti. Lo spettro d'ospite, l'anno di emergenza, le relazioni genetiche e mutazioni caratteristiche dei diversi ceppi sono riportate in figura. (modificato da Hoelzer e Parrish, 2010).

Numerose analisi di regressione condotte su sequenze CPV-2 ottenute nel corso del tempo hanno evidenziato come questi parvovirus presentino tassi di mutazione più elevati dei virus a dsDNA e più simili a quelli dei virus a RNA (Parrish et al., 1991; Truyen et al., 1995; Horiuchi et al., 1998). Il CPV-2, inoltre, evolve più rapidamente del FPV: i suoi tassi di mutazione si presentano infatti più elevati, con una media di sostituzioni per sito per anno di  $2 \times 10^{-4}$  contro una media dell' $8 \times 10^{-5}$  per l'FPV (Truyen et al., 1995; Hoelzer et al., 2008; Hoelzer and Parrish 2010). In particolare, per la regione del genoma che codifica le proteine del capsido, è stato stimato un tasso di mutazione prossimo a quelli osservati per virus a RNA in rapida evoluzione (Shackelton et al., 2005).

L'elevata variabilità genetica manifestata dal CPV-2 e dalle relative varianti ha fatto supporre che tali virus possano replicare all'interno dell'ospite secondo una dinamica di quasispecie virale, tipica dei virus a RNA (Domingo et al., 1998). Questa possibilità è stata confermata dalla scoperta di un gatto infetto da dieci differenti popolazioni virali contemporaneamente (Battilani et al., 2006).

### ***1.3.2 Infezioni da CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c nel gatto***

Il CPV-2 originale, che non infettava la specie felina, è stato rapidamente soppiantato dalle nuove varianti virali (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c), ancora oggi circolanti, in grado di infettare tanto il cane quanto il gatto (Martella et al., 2006).

Il ruolo patogeno delle varianti del CPV-2 nella specie felina è stato oggetto di numerosi studi, condotti sia nell'ambito di infezioni naturali che sperimentali.

Ripetuti isolamenti di CPV-2a e CPV-2b dalle feci di gatti asintomatici hanno fatto supporre che queste varianti fossero scarsamente patogene (Mochizuki et al., 1993a; Miyazawa et al., 1999; Ikeda et al., 2000). Gatti SPF infettati sperimentalmente con CPV-2a e CPV-2b hanno sviluppato una sintomatologia molto lieve o sono rimasti completamente asintomatici (Goto et al., 1984; Chalmers et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Gamoh et al., 2003). È importante considerare che, spesso, nei gatti SPF anche il FPV non provoca alcuna patologia e che in uno studio condotto su gatti SPF e gatti convenzionali infettati con lo stesso ceppo di CPV-2a, i gatti convenzionali hanno sviluppato una sintomatologia molto più grave rispetto ai gatti SPF (Carlson et al., 1977; Goto et al., 1983; Goto et al., 1984). Tuttavia, altri studi condotti su gatti e felini selvatici naturalmente infetti indicano che le varianti del CPV-2 siano responsabili di una patologia indistinguibile da quella sostenuta dall'FPV (Steinel et al., 2000; Battilani et al., 2006; Battilani et al., 2011; Miranda et al., 2014). I risultati contrastanti ottenuti in studi basati sull'infezione sperimentale di gatti SPF rispetto a quelli condotti in corso di infezioni naturali sottolineano l'importanza delle infezioni secondarie e dello stato di salute degli animali nella patogenesi delle infezioni parvovirotiche (Ikeda et al., 2002).

Nel gatto inoltre sono stati descritti episodi di co-infezione tra le diverse varianti di CPV-2 o tra queste e l'FPV, che potrebbero favorire fenomeni di ricombinazione genetica (Battilani et al., 2007; Ohshima e Mochizuki, 2009; Battilani et al., 2011).

### ***1.3.3 Il gatto come carrier di CPV-2***

Uno studio recente condotto su gatti provenienti da due rifugi in Inghilterra ha mostrato che questi animali possono infettarsi con le nuove varianti di CPV-2 ed eliminare il virus per via fecale senza manifestare alcun sintomo (Clegg et al., 2012). Questo studio ha inoltre evidenziato che l'eliminazione virale può durare dalle 4 alle 6 settimane anche in assenza di contaminazione ambientale, suggerendo che i gatti possano sviluppare infezioni persistenti non associate ad alcuna sintomatologia clinica e di conseguenza rappresentare una possibile fonte di disseminazione virale sia per altri gatti che per il cane (Clegg et al., 2012).

## 1.4 Obiettivi dello studio

Le varianti del CVP-2 possano causare nel gatto infezioni asintomatiche accompagnate da una prolungata eliminazione virale (Clegg et al., 2012). È stato inoltre dimostrato che il FPV ed il CPV-2 possono essere isolati dalle cellule mononucleate ematiche anche in presenza di elevati titoli anticorpali (Miyazawa et al., 1999; Ikeda et al., 2000).

Sulla base di queste evidenze si è ipotizzato che il gatto possa agire come portatore ed eliminatore asintomatico a lungo termine delle varianti di CPV-2 e che i PBMC possano giocare un ruolo importante nella persistenza del virus.

Alla luce di tali ipotesi, gli obiettivi di questo studio retrospettivo condotto su campioni di sangue e siero di 54 gatti sono stati:

- Indagare la presenza del DNA di virus appartenenti alla specie *Carnivore protoparvovirus 1* negli strati leucocitari-piastrinici (buffy coat) utilizzando una metodica di Real-Time PCR
- Caratterizzare i virus identificati, valutarne la diversità genetica ed effettuare indagini filogenetiche
- Rilevare l'eventuale presenza di anticorpi anti-protoparvovirus nei soggetti risultati positivi alla Real-Time PCR mediante il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione

## 1.5 Materiali e metodi

### 1.5.1 Disegno dello studio

Questo studio retrospettivo è stato condotto su campioni di sangue e siero di 54 gatti originari della provincia di Sassari (Sardegna). Tali campioni erano stati prelevati per indagini diagnostiche di routine nel periodo compreso tra Ottobre 2011 e Marzo 2012 e stoccati presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari.

Il buffy coat ottenuto dai 54 gatti oggetto dello studio è stato testato per la presenza del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* mediante una metodica di Real-Time PCR. La caratterizzazione dei virus rilevati è stata effettuata mediante il sequenziamento di una porzione del gene codificante per la proteina VP2 e le sequenze nucleotidiche ottenute sono state utilizzate per indagini statistiche e filogenetiche. Inoltre, i gatti risultati positivi alla Real-Time PCR sono stati testati per la presenza di anticorpi anti-protoparvovirus mediante inibizione dell'emoagglutinazione.

### 1.5.2 Fonte del virus e campionamento

Lo studio è stato condotto su 54 gatti eterogenei per età, sesso, habitat e stato di salute (**Tabella 1.3**). I gatti sono stati divisi in 6 gruppi (A, B, C, D, E, F). Il gruppo A (gatti n° 4, 5, 6, 7, 8, 52), il gruppo B (gatti n° 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 31, 32, 33) ed il gruppo C (gatti n° 20, 21, 22 e 55) corrispondevano a tre distinte colonie feline appartenenti a tre diversi proprietari. I soggetti 42, 43, 44, 45 e 46 sono stati inclusi nel gruppo D poiché provenienti dal medesimo gattile. Il gruppo E era formato da 5 gatti randagi rinvenuti sul territorio (gatti n° 9, 25, 30, 40, 47) e condotti presso il Pronto Soccorso del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari per patologie di varia natura, principalmente di origine traumatica. Tutti i soggetti restanti sono stati inclusi nel gruppo F: si trattava di gatti di proprietà condotti presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari per motivi diversi.

Ventidue dei 54 (40,7%) gatti oggetto dello studio erano clinicamente sani, 26 (48,1%) presentavano segni clinici attribuibili a varie patologie, 3 (5,6%) mostravano sintomatologia gastro-enterica, mentre per i restanti 3 gatti (5,6%) lo stato clinico era ignoto. Nessuna informazione era disponibile in merito allo stato vaccinale dei gatti inclusi nello studio, tuttavia è ipotizzabile che i gatti randagi non fossero vaccinati.

<b>Gatto N°</b>	<b>Data di campionamento</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Razza</b>	<b>Sesso</b>	<b>Età</b>	<b>Motivo della visita</b>	<b>Habitat</b>
01	06/10/2011	F	Europeo	mc	2A	Letargia, dispnea, dimagrimento	All'aperto
02	11/10/2011	F	Europeo	mc	3A	Dimagrimento, ittero, CKD	In casa
03	13/10/2011	F	Europeo	f	6A	Visita di controllo	All'aperto
04	12/10/2011	A	Siamese	f	10A	Visita di controllo	All'aperto
05	12/10/2011	A	Siamese	m	4A	Visita di controllo	All'aperto
06	13/10/2011	A	Europeo	m	ND	Visita di controllo	ND
07	13/10/2011	A	Europeo	ND	ND	Visita di controllo	ND
08	13/10/2011	A	Europeo	ND	ND	Visita di controllo	ND
09	20/10/2012	E	Europeo	f	8M	Frattura esposta arto anteriore destro	All'aperto
10	25/10/2011	F	Europeo	f	15A	Visita di controllo	In casa
11	27/10/2011	B	Europeo	fs	10A	Visita di controllo	All'aperto
12	27/10/2011	B	Europeo	fs	4A	Visita di controllo	All'aperto
13	03/11/2011	B	Europeo	f	7A	Visita di controllo	All'aperto
14	08/11/2011	F	Europeo	f	3A	Vomito, diarrea	In casa
15	20/09/2011	B	Europeo	f	ND	ND	All'aperto
16	10/11/2011	B	Europeo	m	6A	Segni respiratori	All'aperto
17	10/11/2011	B	Europeo	f	6A	Segni respiratori	All'aperto
18	10/11/2011	B	Europeo	f	5A	Visita di controllo	All'aperto
19	17/11/2011	B	Europeo	f	5A	Visita di controllo	All'aperto
20	12/10/2011	C	Europeo	m	2A	Crescita stentata, segni respiratori	All'aperto
21	11/10/2011	C	Europeo	m	3A	Visita di controllo	All'aperto
22	22/11/2011	C	Europeo	f	6A	Visita di controllo	All'aperto
23	13/12/2011	B	ND	ND	ND	ND	ND
24	11/10/2011	F	Europeo	m	2A	Trauma da investimento	In casa
25	12/01/2011	E	Europeo	m	3A	Massa intracranica, sindrome di Horner	All'aperto
26	24/01/2012	F	Europeo	mc	4A	Visita di controllo	In casa
27	30/01/2012	F	Persiano	f	ND	Inappetenza, disturbi comportamentali	In casa
28	30/01/2012	F	Europeo	ms	6A	Anoressia, perdita di peso, ptosi della terza palpebra	All'aperto
29	09/02/2012	F	Europeo	m	12A	Vomito, diarrea	In casa
30	13/02/2012	E	Europeo	f	7A	Fratture ossee multiple	All'aperto
31	17/02/2012	B	Europeo	m	ND	Visita di controllo	ND

Gatto N°	Data di campionamento	Gruppo	Razza	sessu	ETÀ	Motivo della visita	Habitat
32	21/02/2012	B	Europeo	fs	5A	Ittero	All'aperto
33	21/02/2012	B	Europeo	m	3A	Visita di controllo	All'aperto
34	27/02/2012	F	Europeo	mc	7A	Anoressia, dimagrimento, anemia, lesioni cutanee	In casa
35	28/02/2012	F	Europeo	fs	2A	Granuloma eosinofilo	In casa
36	07/03/2012	F	Europeo	fs	2A	Alopecia e lesioni crostose su naso, orecchie ed arti	In casa
37	08/03/2012	F	Europeo	mc	5A	Lesioni gengivali, mastocitoma mucocutaneo	In casa
38	09/03/2012	F	Europeo	fs	1A	Prurito senza lesioni cutanee	All'aperto
39	09/03/2012	F	Europeo	fs	13A	Neoformazioni toraciche	In casa
40	01/12/2011	E	Europeo	fs	6A	Carcinoma squamo-cellulare su naso, orecchie e occhi	All'aperto
41	29/11/2011	F	Europeo	ms	15A	CKD	In casa
42	13/03/2012	D	Europeo	f	8A	Visita di controllo	ND
43	12/03/2012	D	Europeo	f	10A	Visita di controllo	All'aperto
44	13/03/2012	D	Europeo	m	7A	Visita di controllo	ND
45	12/03/2012	D	Europeo	m	7A	Visita di controllo	ND
46	12/03/2012	D	Europeo	f	6A	Visita di controllo	ND
47	14/03/2012	E	Europeo	f	7A	Cecità	All'aperto
48	14/03/2012	F	Europeo	f	5A	Disuria, ematuria	All'aperto
49	15/03/2012	F	Europeo	mc	ND	Disuria, stranguria	In casa
50	21/03/2012	F	Europeo	mc	9A	Granuloma eosinofilo, otite monolaterale	In casa
52	26/03/2013	A	Europeo	f	2A	Lesioni cutanee	All'aperto
54	23/03/2012	F	Europeo	m	ND	ND	In casa
55	27/03/2012	C	ND	m	ND	Visita di controllo	All'aperto
56	27/03/2012	F	ND	ND	ND	Visita di controllo	In casa

**Tabella 1.3:** Gatti inclusi nello studio (m: maschio; f: femmina; mc: maschio castrato; fs: femmina sterilizzata; A: anni; M: mesi; CKD: malattia renale cronica; ND: dato non disponibile)

Per ogni gatto era disponibile un campione di sangue periferico in provette contenenti anticoagulante (EDTA) ed un campione di siero. I campioni di sangue EDTA e di siero sono stati conservati rispettivamente a + 4 °C e a - 20 °C fino al momento dell'uso.

### ***1.5.3 Separazione del buffy coat ed estrazione del DNA***

La separazione del buffy coat è stata effettuata mediante centrifugazione del sangue EDTA con l'aggiunta del reagente Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA) secondo il seguente protocollo:

1. 3 ml di Histopaque-1077 e 3 ml di sangue EDTA sono stati miscelati all'interno di una provetta a fondo conico tipo Falcon da 15 ml;
2. la miscela di sangue e Histopaque è stata centrifugata a 400 RCF per 30 minuti a temperatura ambiente;
3. il buffy coat è stato delicatamente prelevato e trasferito in una nuova provetta tipo Falcon da 15 ml;
4. nella provetta contenente il buffy coat sono stati aggiunti 10 ml di PBS 1X. La provetta è stata agitata delicatamente e sottoposta a centrifugazione per 10 minuti a 250 RCF, al termine della quale il surnatante è stato rimosso;
5. il pellet ottenuto è stato quindi sottoposto a due ulteriori lavaggi con PBS come riportato al punto 4.

Al termine dei lavaggi, il pellet è stato sottoposto ad estrazione del DNA mediante il kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore. Il DNA estratto è stato eluito in 100 µl di acqua ultrapura priva di enzimi DNasi e RNasi e conservato a - 20 °C fino al momento del suo utilizzo.

### ***1.5.4 Diagnosi di infezione da protoparvovirus mediante SYBR green Real-Time PCR***

Per la ricerca del DNA di *Carnivore protoparvovirus 1* è stata utilizzata una metodica di SYBR green Real-Time PCR utilizzata di routine presso il laboratorio di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET). Tale saggio impiega una coppia di primer (A-for e B-rev, **Tabella 1.4**) aventi come target un tratto di 99 paia di basi del gene codificante per la proteina VP2 e permette di rilevare tutte le varianti virali incluse nella specie *Carnivore protoparvovirus 1*.

Il limite di detection della Real-Time PCR impiegata corrisponde a 1 copia di DNA per  $\mu\text{l}$  di estratto.

Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato il kit SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio inc., Shiga, Japan) ed il sistema Rotor-Gene 3000 (QIAGEN, Hilden, Germany). L'acquisizione del segnale fluorescente è avvenuta sul canale FAM al termine di ogni fase di estensione.

La mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 1.5**.

Primer	Sequenza primer 5'-3'	Posizione	Amplicone
A-for	AGCTACTATTATGAGACCAGCTGAG	3767-3791	99 bp
B-rev	CCTGCTGCAATAGGTGTTTAA	3844-3865	

**Tabella 1.4:** Primer utilizzati per la Real-Time PCR. La posizione dei primer si riferisce alla sequenza nucleotidica del ceppo di referenza di FPV CU-4 (numero di accesso GenBank M38246).

Mix di reazione			
Reagente	Concentrazione iniziale	Volume	Concentrazione finale
Master Mix	2X	12,5 $\mu\text{l}$	1X
Primer A-for	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,4 $\mu\text{M}$
Primer B-rev	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	0,4 $\mu\text{M}$
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	8,5 $\mu\text{l}$	-
DNA templatato	-	2 $\mu\text{l}$	-
Volume finale		25 $\mu\text{l}$	
Ciclo di reazione			
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo	
Attivazione della Hot-Start polimerasi	95 °C	30 sec	} 40X
Denaturazione	95 °C	10 sec	
Annealing	60 °C	20 sec	
Estensione	72 °C	30 sec	
Determinazione T <sub>m</sub>	Da 65 °C a 95 °C con incrementi di 1 °C/min		

**Tabella 1.5:** Mix e ciclo di reazione riferiti alla Real-Time PCR (Primer A-for e B-rev)

La curva standard, necessaria per la quantificazione del DNA rilevato, è stata generata utilizzando diluizioni seriali in base 10 di un plasmide pCR 4 (Invitrogen) ricombinante contenente una copia della sequenza target.

Per ogni reazione sono state testate in duplicato: 6 diluizioni in base 10 dello standard plasmidico ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ), i campioni ignoti ed un bianco di reazione (mix di reazione più H<sub>2</sub>O ultrapura).

I campioni sono stati considerati positivi se per entrambi i replicati la curva di fluorescenza registrata durante la reazione mostrava un incremento esponenziale e se la curva di melting era caratterizzata da un picco ad una temperatura specifica (81,8 - 82 °C).

#### ***1.5.5 Amplificazione e sequenziamento di una porzione del gene codificante per la proteina VP2***

Al fine di poter differenziare tra i vari ceppi di *Carnivore protoparvovirus 1* si è proceduto ad amplificare e sequenziare, per tutti i virus identificati, un frammento di 569 bp del gene codificante per la proteina VP2. Il frammento selezionato conteneva i codoni codificanti per i residui 297, 300, 305, 323 e 426, fondamentali per la differenziazione dei vari ceppi virali.

L'amplificazione di tale porzione genica è stata effettuata mediante una metodica di semi-nested PCR basata sui primer C-for, D-rev ed E-rev (**Tabella 1.6**). Nella prima reazione, utilizzando i primer C-for e D-rev, si ottiene un amplicone di 881 bp, mentre nella seconda, con i primer C-for ed E-rev, uno di 569 bp. L'amplicone ottenuto nella seconda PCR è stato successivamente sequenziato.

<b>Primer</b>	<b>Sequenza primer 5'-3'</b>	<b>Posizione primer</b>	<b>Amplicone</b>
C-for (P3 <sup>a</sup> )	CCATTTCTAAATTCTTTG	3651-3668	C-D: 881 bp
D-rev (VPrev <sup>b</sup> )	TTTCTAGGTGCTAGTTGAG	4513-4531	
E-rev (P4 <sup>a</sup> )	AAGTCAGTATCAAATTCTT	4201-4219	C-E: 569 bp

**Tabella 1.6:** Primer utilizzati per la semi-nested PCR. La posizione dei primer si riferisce alla sequenza nucleotidica del ceppo di referenza di FPV CU-4 (numero di accesso GenBank M38246). (Mochizuki et al., 1993b)<sup>a</sup>, (Battilani et al., 2001)<sup>b</sup>.

Entrambe le reazioni sono state effettuate utilizzando la *Taq* DNA polimerasi (Qiagen) ed il termociclatore Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Le mix di reazione ed i cicli di amplificazione delle due PCR sono riportati nelle **Tabelle 1.7 e 1.8**. La prima reazione è stata effettuata su un volume finale di 25 µl, mentre la seconda reazione su 50 µl al fine di ottenere una maggiore quantità di prodotto di PCR per il successivo sequenziamento.

In entrambe le reazioni è stato incluso un controllo positivo, costituito dal ceppo FPV 1033/09, ed un controllo negativo, costituito da acqua ultrapura (Battilani et al., 2011).

<b>Mix di reazione</b>			
<b>Reagente</b>	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Buffer	10X	2,5 µl	1X
Qsolution	5X	5 µl	1X
dNTP mix	2,5 mM ognuno	2 µl	0,2 mM ognuno
Primer C-for	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Primer D-rev	20 µM	0,5 µl	0,4 µM
Taq polimerasi	5 unità/µl	0,5 µl	2,5 unità/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	11,5 µl	-
DNA templatato	-	2,5 µl	-
Volume finale		25 µl	
<b>Ciclo di reazione</b>			
<b>Fase del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min	
Denaturazione	94 °C	30 sec	} 45X
Annealing	48 °C	1 min	
Estensione	72 °C	1 min	
Estensione finale	72 °C	10 min	

**Tabella 1.7:** Mix e ciclo di amplificazione riferiti alla prima reazione della PCR semi-nested (primer C-for e D-rev)

<b>Mix di reazione</b>			
<b>Reagente</b>	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Buffer	10X	5 $\mu$ l	1X
Qsolution	5X	10 $\mu$ l	1X
dNTP mix	2,5 mM ognuno	4 $\mu$ l	0,2 mM ognuno
Primer C-for	20 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Primer E-rev	20 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Taq polimerasi	5 unità/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	2,5 unità/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	23,5 $\mu$ l	-
DNA templat <sup>a</sup>	-	5 $\mu$ l	-
Volume finale		50 $\mu$ l	

<b>Ciclo di reazione</b>		
<b>Fase del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min
Denaturazione	94 °C	30 sec
Annealing	49 °C	1 min
Estensione	72 °C	45 sec
Estensione finale	72 °C	10 min

**Tabella 1.8:** Mix e ciclo di amplificazione riferiti alla seconda reazione della PCR semi-nested (primer C-for ed E-rev). (Il DNA templat<sup>a</sup> consisteva nel prodotto della 1° PCR)<sup>a</sup>

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5  $\mu$ l ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel di agarosio al 2% in standard TAE buffer e visualizzati mediante raggi UV dopo colorazione con bromuro di etidio.

I prodotti della seconda PCR sono stati successivamente purificati mediante il kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) secondo le istruzioni fornite dal produttore e sequenziati. La sequenza nucleotidica dei prodotti di PCR purificati è stata ottenuta, sia con il primer C-for che con il E-rev, utilizzando il sequenziatore ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA).

L'elettroferogramma di uno dei virus identificati (41/2011) mostrava numerose ambiguità, suggerendo la presenza di una popolazione virale mista. Per meglio caratterizzare tale popolazione, il prodotto di PCR è stato clonato mediante il vettore plasmidico pCR4/TOPO con il TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ed inserito in cellule di *Escherichia coli* DH5-*alpha*, secondo il protocollo fornito dal produttore. Dieci cloni ricombinanti sono stati quindi sequenziati utilizzando sia il primer C-for che il primer E-rev.

#### ***1.5.6 Caratterizzazione ed analisi molecolare delle sequenze virali***

Le sequenze nucleotidiche parziali del gene codificante per la proteina VP2 ottenute sono state assemblate e tradotte in sequenze aminoacidiche utilizzando il programma BioEdit sequence alignment editor version 7.0.5 (Hall, 1999). Gli amminoacidi in posizione 300, 305, 323 e 426 sono stati utilizzati per la classificazione dei vari ceppi virali. Le sequenze nucleotidiche assemblate sono state analizzate con l'interfaccia web dell'applicativo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ed allineate con sequenze di referenza di FPV e CPV-2, incluse quelle di ceppi vaccinali, disponibili nel database di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). L'allineamento è stato effettuato utilizzando il metodo ClustalW implementato nel programma BioEdit.

Le sequenze nucleotidiche sono state organizzate in 2 differenti gruppi (FPV e CPV-2) a seconda del ceppo di appartenenza, mentre i 10 cloni ottenuti dal campione 41/2011 sono stati inseriti in un terzo gruppo distinto. Per ogni gruppo di sequenze sono stati valutati, mediante il software DnaSP versione 5.10.01 (Librado e Rozas, 2009), i seguenti parametri: numero totale di mutazioni ( $\eta$ ), diversità nucleotidica ( $\pi$ ) ed errore standard (SE), numero totale delle mutazioni sinonime (SynDif) e non-sinonime (NSynDif). La frequenza delle mutazioni (numero totali delle mutazioni/numero totale di basi sequenziate) e la percentuale di cloni mutati sono state usate come indicatori di diversità genetica per il gruppo del virus (41/2011).

Le relazioni filogenetiche tra i ceppi virali identificati in questo studio e le sequenze di referenza sono state valutate utilizzando il software MEGA versione 7.0.20 (Kumar et al., 2016). Il miglior modello di sostituzione nucleotidica è stato determinato mediante l'apposita funzione presente nel software MEGA. Gli alberi filogenetici sono stati

costruiti con il metodo Maximum Likelihood ed i valori di bootstrap, indicativi del livello di confidenza di ogni nodo, sono stati determinati su 1000 replicati.

### ***1.5.7 Valutazione del titolo anticorpale mediante inibizione dell'emoagglutinazione***

Il titolo anticorpale nei confronti dei protoparvovirus dei carnivori dei gatti risultati positivi alla reazione di amplificazione in Real-Time PCR è stato valutato mediante HI. A tal scopo è stato usato come antigene virale un ceppo di CPV-2b (115/2010) isolato (7° passaggio) su cellule CRFK (Crandell Rees feline Kidney) presso il Laboratorio di Virologia del DIMEVET a partire dalle feci di un cane affetto da gastroenterite. Le cellule CRFK sono state ottenute dalla Biobanca Veterinaria dell'IZSLER (<http://www.ibvr.org/Services/CellCultures.aspx>).

Per effettuare la prova di HI è necessaria una quantità standardizzata di virus corrispondente ad 8 unità emoagglutinanti. Al fine di ottenere tale quantità standardizzata è stata effettuata una prova di emoagglutinazione utilizzando il surnatante cellulare ottenuto dalla coltura virale su cellule CRFK in tre differenti concentrazioni: tal quale, diluito 1:10 e diluito 1:100.

Per la prova di emoagglutinazione sono stati utilizzati:

- BTBS (pH 6,2 a 4 °C, **Tabella 1.9**)
- Eritrociti di suino
- Piastra da 96 pozzetti con fondo a V
- Ceppo virale CPV-2b 115/10

<b>Reagente</b>	<b>Quantità</b>
Bis-Tris Base	4,184 g
NaCl	8,88 g
Albumina sierica bovina	1 g
Acqua	950 ml
Soluzione contenente 1M MgCl <sub>2</sub> e 0,3M CaCl <sub>2</sub>	2,5 ml
Volume finale	1000 ml

***Tabella 1.9: composizione del BTBS***

Gli eritrociti di suino sono stati preparati secondo il seguente protocollo:

1. 2 ml di sangue suino in EDTA sono stati addizionati di 10 ml di BTBS (pH 6,2 a 4 °C);
2. la miscela ottenuta è stata centrifugata per 10 min a 400 RCF e il surnatante è stato rimosso;
3. il lavaggio con PBS (punti 1 e 2) è stato ripetuto per almeno 3 volte, o comunque fino a che il surnatante non è divenuto limpido;
4. il pellet ottenuto dopo l'ultima centrifugazione è stato utilizzato per preparare una soluzione allo 0,5% di eritrociti suini in BTBS: 40 ml di BTBS + 200 µl di RBC (pellet).

La reazione di emoagglutinazione è stata effettuata in una piastra da 96 pozzetti con fondo a V secondo il seguente protocollo:

1. 25 µl di BTBS sono stati distribuiti in ciascun pozzetto;
2. 25 µl di surnatante della coltura virale del CPV-2b 115/10 sono stati aggiunti al primo pozzetto di ogni fila e quindi diluiti in base 2 lungo la piastra;
3. il processo è stato ripetuto per 3 diluizioni del virus: 1:1, 1:10 (10 µl di virus + 90 µl di BTBS), 1:100 (1 µl di virus + 99 µl di BTBS);
4. 50 µl della soluzione allo 0,5% di eritrociti sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, successivamente la piastra è stata sottoposta ad agitazione;
5. la piastra è stata incubata una notte a 4°C per consentire ai globuli rossi di precipitare.

Il titolo emoagglutinante è stato determinato come la più alta diluizione del virus capace di provocare una emoagglutinazione evidente (> 50% delle cellule agglutinate).

I titoli emoagglutinanti rilevati per le 3 diluizioni virali sono stati utilizzati per calcolare la diluizione necessaria ad avere 8 UHA sulla base della formula: (diluizione virale x titolo HA)/8. Le 8 UHA sono state calcolate utilizzando la media dei valori delle 3 diluizioni.

I sieri da testare sono stati decomplesati, poiché le proteine del complemento possono inficiare la reazione di HI. La decomplesazione è stata ottenuta mediante il seguente protocollo:

1. i sieri sono stati incubati 30 min a 56 °C;

2. per ogni 100  $\mu$ l di siero sono stati aggiunti 300  $\mu$ l di Caolino al 25% in BTBS, la soluzione è stata quindi vortexata;
3. la soluzione è stata incubata 20 min a temperatura ambiente e successivamente centrifugata 15 min a 600 RCF;
4. il surnatante è stato raccolto e per ogni 100  $\mu$ l di surnatante sono stati aggiunti 25  $\mu$ l di eritrociti suini; il prodotto ottenuto è stato incubato per una notte a 4 °C;
5. dopo l'incubazione, il prodotto è stato centrifugato per 15 min a 600 RCF ed il surnatante ottenuto è stato utilizzato per le reazioni di HI.

La piastra per la reazione di HI è stata allestita utilizzando il seguente protocollo:

1. 25  $\mu$ l di BTBS sono stati distribuiti in ciascun pozzetto;
2. 25  $\mu$ l di siero deplementato sono stati aggiunti al primo pozzetto e diluiti in base 2 lungo la piastra;
3. 25  $\mu$ l di 8 HAU sono state aggiunte ad ogni pozzetto, la piastra è stata agitata e poi incubata a temperatura ambiente per 1 ora;
4. 50  $\mu$ l della soluzione allo 0,5% di RBC sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e la piastra di nuovo agitata;
5. La piastra è stata incubata a 4 °C per una notte.

Tutti i sieri dei gatti risultati positivi alla Real-Time PCR sono stati testati in duplicato in due piastre differenti. Diluizioni in base due di un siero iperimmune commerciale canino contenente anticorpi anti-CPV-2, anti-CDV e anti-CAdV-1 (Stagloban, ATI, Ozzano Emilia, BO, Italia) sono state utilizzate come controllo positivo.

Per ogni campione di siero è stato calcolato il valore medio dei due risultati; per i valori medi inclusi tra due successive diluizioni, è stato riportato il titolo inferiore. I gatti con un titolo  $HI \geq 1:8$  sono stati considerati positivi, mentre i gatti con un titolo  $HI \geq 1:80$  sono stati considerati, come tradizionalmente riportato, protetti dall'infezione.

## 1.6 Risultati

### 1.6.1 Diagnosi di infezione da protoparvovirus mediante SYBR green Real-Time PCR

Gli estratti di DNA ottenuti dal buffy coat di 54 gatti sono stati testati in duplicato per la presenza di *Carnivore protoparvovirus 1* utilizzando un saggio SYBR Green Real-Time PCR.

Nove dei 54 soggetti testati (16,7%) sono risultati positivi (gatti n° 18, 21, 22, 38, 41, 46, 52, 55 e 56; **Tabella 1.10**). I gatti positivi appartenevano ai gruppi A, B, C, D e F. Dei 9 soggetti risultati positivi, 4 erano clinicamente sani (4 su 22 gatti sani, il 18,2%), 3 mostravano segni clinici di varia natura (3 su 26 gatti con segni clinici, l'11,5%) e per 2 gatti i dati inerenti allo stato clinico al momento del campionamento non erano disponibili. Nessuno dei gatti risultati positivi mostrava sintomatologia gastro-enterica.

Gatto	Gruppo	Razza	Sesso	Età	Motivo della visita	Habitat
18	B	Europeo	F	5a	Visita di controllo	All'aperto
21	C	Europeo	M	3a	Visita di controllo	All'aperto
22	C	Europeo	F	6a	Visita di controllo	All'aperto
38	F	Europeo	FS	1a	Prurito	All'aperto
41	F	Europeo	MC	15a	CKD	In casa
46	D	Europeo	F	6a	Visita di controllo	ND
52	A	Europeo	F	2a	Lesioni cutanee	All'aperto
55	C	ND	M	ND	ND	All'aperto
56	F	ND	ND	ND	ND	In casa

**Tabella 1.10:** Gatti risultati positivi in Real-Time PCR (M: maschio intero, F: femmina intera, MC: maschio castrato, FS: femmina sterilizzata, a: anni, ND: non disponibile, CKD: malattia renale cronica).

Nei campioni risultati positivi la quantità di DNA di protoparvovirus dei carnivori era compresa tra  $10^0$  e  $10^2$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$  di estratto. L'analisi della curva di melting

mostrava un unico picco tra 81,8° e 82 °C per le diluizioni plasmidiche utilizzate come standard e tra 81° e 82 °C per i campioni ignoti risultati positivi.

### ***1.6.2 Caratterizzazione molecolare delle sequenze virali***

Le sequenze nucleotidiche parziali del gene per la proteina VP2 sono state ricavate da tutti i campioni positivi e dai 10 cloni ricombinanti ottenuti del campione 41/2011. Tali sequenze presentavano una lunghezza di 532 paia di basi codificanti per 177 amminoacidi, corrispondenti ai residui 295-471 del ceppo FPV di riferimento CU-4 (Numero di accesso GenBank M38246).

Sulla base dell'analisi della sequenza amminoacidica parziale del gene VP2 è stato possibile determinare che i protoparvovirus rilevati nei gatti 21, 22, 38, 52 appartenessero alla variante FPV, quelli rilevati nei gatti 18, 55, e 56 a quella CPV-2b, mentre quello rilevato nel gatto 46 apparteneva alla variante CPV-2c.

Nel gatto 41 è stato possibile evidenziare la presenza di 6 differenti popolazioni virali. I cloni C02, C05, C06, C08 e C10 mostravano le stesse caratteristiche nucleotidiche degli FPV rilevati nei gatti 21, 22, 38 e 52. I cloni C01 e C03, pur essendo della variante di ceppo FPV, mostravano sostituzioni peculiari: il clone C01 in posizione 312 (da Lys a Arg) ed il clone C03 in posizione 391 (da Thr ad Ala) e 461 (da Pro a Ser). Il C09 è risultato essere un tipico CPV-2c mentre il C04, pur essendo un CPV-2c, presentava una sostituzione in posizione 437 (da Gly ad Arg). Il clone C08 presentava i residui tipici di FPV in posizione 297, 300, 305 e 323 ma in posizione 426 era presente un residuo di acido glutammico (da Asn a Glu), peculiare del CPV-2c.

Le sostituzioni amminoacidiche a carico della proteina VP2 nei protoparvovirus identificati in questo studio sono riassunte nella **Tabella 1.11**.

Dalla comparazione delle sequenze sono emerse numerose sostituzioni sinonime e non sinonime, come riportato nella **Tabella 1.12** e **1.13**. I virus appartenenti alla variante FPV mostravano un numero totale di mutazioni leggermente superiore a quello esibito dai CPV-2; tuttavia in questi ultimi le mutazioni erano principalmente non sinonime, mentre negli FPV prevalevano quelle sinonime.

Campione	Gruppo	297	300	305	312	323	359	371	375	391	418	426	437	461	Ceppo
FPV		Ser	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Ala	Asp	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	
CPV-2 <sup>b</sup>		-	-	-	-	Asn	-	-	Asn	-	-	-	-	-	
CPV-2a <sup>c</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPV-2b <sup>d</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Asp	-	-	
CPV-2a <sup>e</sup>		Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPV-2b <sup>f</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Asp	-	-	
CPV-2c <sup>g</sup>		Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	
18/2011	B	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
21/2011	C	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-	-	-	-	FPV
22/2011	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
38/2012	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
46/2012	D	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	CPV-2c
52/2012	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
55/2012	C	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
56/2012	F	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
41/2011-C01	F	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C02	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C03	F	-	-	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	Ser	FPV
41/2011-C04	F	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	Arg	-	CPV-2c
41/2011-C05	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C06	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C07	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C08	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu	-	-	FPV
41/2011-C09	F	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	CPV-2c
41/2011-C10	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV

**Tabella 1.11:** sostituzioni amminoacidiche a carico dei residui della proteina VP2 nei virus identificati in questo studio (<sup>a</sup>prototipo FPV: ceppo FPV-b (M38246); <sup>b</sup>prototipo CPV tipo 2: ceppo CPV-b (M38245); <sup>c</sup>prototipo CPV tipo 2a: ceppo CPV-15 (M24003); <sup>d</sup>prototipo CPV tipo 2b: ceppo CPV-39 (M74849); <sup>e</sup>ceppo di referenza CPV tipo 2a: CPV-677 (AF306445); <sup>f</sup>ceppo di referenza CPV tipo 2b: CPV-637 (AF306450); <sup>g</sup>ceppo di referenza CPV tipo 2c: CPV-695 (AF01519))

<b>Gruppo</b>	$\eta^a$	$\pi^b$	<b>SynDif<sup>c</sup></b>	<b>NSynDif<sup>d</sup></b>
FPV (n <sup>e</sup> = 4)	6	0,00627 (SE 0,00149)	5	1
CPV-2 (n = 4)	4	0,00376 (SE 0,00199)	1	3
41/2011 (n =10)	15	0,01032 (SE 0,00281)	5	10

**Tabella 1.12:** Analisi statistiche condotte sulle sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio. (<sup>a</sup> $\eta$ : numero totale di mutazioni; <sup>b</sup> $\pi$ : diversità nucleotidica; <sup>c</sup>SynDif: numero totale delle mutazioni sinonime; <sup>d</sup>NSynDif: numero totale delle mutazioni non sinonime; <sup>e</sup>n: numero sequenze).

<b>Gruppo</b>	<b>% Cloni mutati</b>	<b>Mutazioni totali/basi sequenziate</b>	<b>Frequenza di mutazione</b>
FPV (n <sup>a</sup> = 4)	-	-	-
CPV-2 (n = 4)	-	-	-
41/2011 (n =10)	60 (6/10)	15/5320	$2,8 \times 10^{-3}$

**Tabella 1.13:** Analisi statistiche condotte sulle sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio. (<sup>a</sup>n: numero sequenze).

Il campione 41/2011 mostrava un'elevata complessità genetica generatasi all'interno dell'ospite e la sua variabilità di sequenza era più alta rispetto agli altri dati di sequenza analizzati in questo studio, come testimoniato dai valori del parametro  $\pi$ . Il campione 41/2011, inoltre, presentava una frazione non sinonima più ampia, indicante una chiara prevalenza del numero di sostituzioni non sinonime nel campione: su 15 mutazioni totali, 10 erano non sinonime. La proporzione di cloni virali mutati nel campione 41/2011 è risultata essere del 60%, con una frequenza di mutazioni del  $2,8 \times 10^{-3}$ .

L'albero filogenetico costruito sulla base delle dell'allineamento delle sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio con sequenze di referenza mostrava l'esistenza di due cluster principali riferibili a FPV e CPV-2 (**Figura 1.7**); la sequenza del clone 41/2011-C8 formava un ramo monofiletico all'intero della clade FPV. Le sequenze nucleotidiche dei ceppi di FPV vaccinali utilizzati come vaccini vivi attenuati disponibili in GenBank sono risultate distinguibili da tutte le sequenze di FPV e CPV-2 ottenute in

questo studio e l'albero filogenetico non aveva messo in evidenza alcuna relazione tra di loro.

### ***1.6.3 Valutazione del titolo anticorpale mediante inibizione dell'emoagglutinazione***

I titoli emoagglutinanti per le 3 differenti concentrazioni di surnatante della coltura virale cellulare sono riportati nella **Tabella 1.14**. Da ognuna dei 3 titoli HA è stata ricavata la diluizione necessaria per avere 8 UHA mediante la formula  $(\text{diluizione virale} \times \text{titolo HA})/8$  e dai valori ottenuti è stata ricavata una media, ottenendo come risultato finale la diluizione di 1:32 (**Tabella 1.14**).

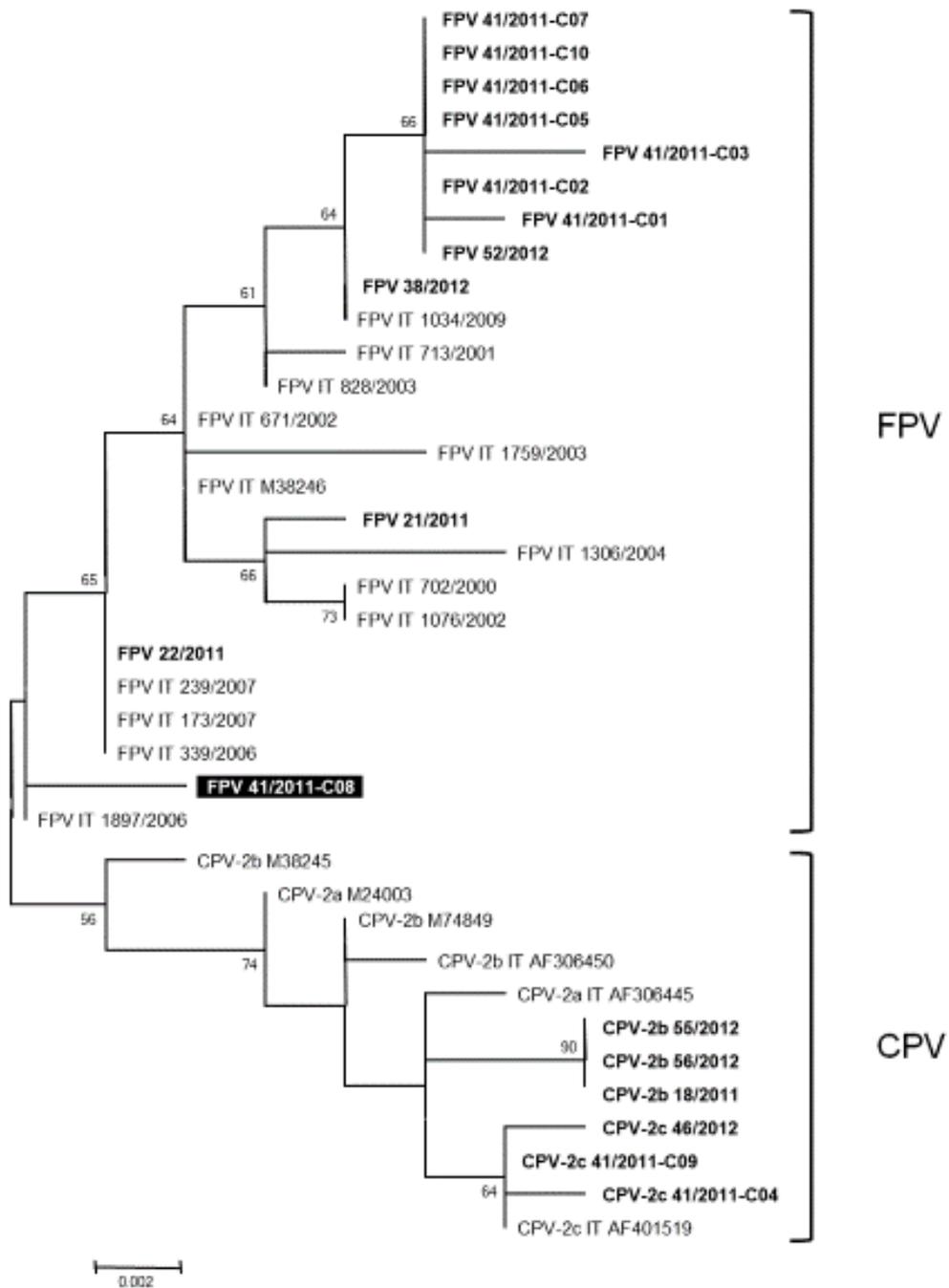
<b>Diluizione virale</b>	<b>Titolo HA</b>	<b>Diluizione per 8 UHA</b>
Tal quale	1:256	$(1 \times 256)/8 = 1:32$
1:10	1:32	$(10 \times 32)/8 = 1:40$
1:100	1:2	$(100 \times 2)/8 = 1:25$
<b>Valore medio</b>		<b>1:32</b>

**Tabella 1.14:** Titoli emoagglutinanti rilevati per le 3 diluizioni del ceppo virale CPV-2b 115/2010 adattato su CRFK.

La prova di inibizione dell'emoagglutinazione è stata condotta sui 9 cani risultati positivi alla Real-Time PCR e in tutti è stato possibile evidenziare la presenza di anticorpi anti-prototoparvovirus (**Tabella 1.15**). Solamente nei soggetti 22/2011 e 56/2012 il titolo anticorpale è risultato superiore a 1:80, un titolo tradizionalmente ritenuto protettivo nei confronti dell'infezione.

<b>Campione</b>	<b>Titolo HI</b>
18/2011	1:32
21/2011	1:32
22/2011	1:256
38/2012	1:16
41/2011	1:64
46/2012	1:32
52/2012	1:32
55/2012	1:256
56/2012	1:16
Stagloban	1:256

**Tabella 1.15:** *Titolo HI dei gatti risultati positivi alla Real-Time PCR, media dei valori ottenuti su due piastre di reazione*



**Figura 1.7:** Albero filogenetico non radicato costruito con le sequenze nucleotidiche parziali del gene VP2 ottenute in questo studio e con sequenze di referenza di FPV e CPV-2 disponibili in GenBank. L'albero è stato costruito con il metodo del Maximum Likelihood e utilizzando il modello Tamura 3-parametri che è risultato il più adatto per il set di sequenze considerate nell'analisi (incluse le sequenze di referenza). I valori di bootstrap maggiori del 50%, calcolati su 1000 replicati, sono indicati sui rispettivi rami. Le sequenze di FPV e CPV-2 identificate in Italia ed incluse nell'analisi filogenetica ma non rilevate in questo studio sono caratterizzate dalla sigla IT. In grassetto: sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio. Evidenziato in nero: sequenza del clone 41/2011-C8.

## 1.7 Discussione

Il presente studio ha indagato la presenza di DNA del *Carnivore protoparvovirus 1* in una popolazione di gatti, valutando inoltre la risposta anticorpale al virus da parte degli ospiti felini.

Cinquantaquattro gatti sani ed affetti da varie patologie, campionati in Sardegna durante il periodo 2011-2012, sono stati testati per la presenza del DNA di protoparvovirus dei carnivori utilizzando un saggio di Real-Time PCR; la sequenza parziale del gene codificante per la proteina VP2 di tutti i parvovirus rilevati è stata poi sequenziata e caratterizzata.

I parvovirus vengono comunemente isolati dalle feci degli animali infetti in quanto l'eliminazione di virioni infettati riflette la replicazione virale in atto nell'ospite; in questo studio si è però scelto di ricercare il DNA virale nei leucociti, poiché queste cellule, insieme alle cellule delle cripte intestinali, al midollo osseo ed ai tessuti linfoidei, rappresentano i maggiori target virale sia nel gatto che nel cane (Greene, 2012). Inoltre, dato che i parvovirus possono essere isolati da gatti con alti titoli anticorpali virus-neutralizzanti, il titolo anticorpale nei confronti dei virus è stato valutato nei gatti risultati positivi alla Real-Time PCR mediante HI, una metodica che mostra un'elevata correlazione tra il titolo rilevato e la presenza di anticorpi neutralizzanti.

Nove (16,7%) dei 54 gatti testati in questo studio sono risultati positivi per la presenza del DNA di protoparvovirus, con quantità di DNA virale compreso tra  $10^2$  e  $10^0$  copie/ $\mu$ l di estratto. Il genoma virale era quindi rilevabile in un numero relativamente elevato di soggetti, anche se in quantità piuttosto basse; inoltre, tutti i gatti risultati positivi alla Real-Time PCR presentavano anticorpi anti-parvovirus.

I gatti positivi comprendevano sia gatti sani che gatti affetti da varie patologie, però, nessuno dei soggetti con sintomi gastro-enterici è risultato positivo alla Real-Time PCR. La presenza del DNA di FPV e CPV-2 in campioni di feci e sangue periferico di gatti sani è stata riportata in studi precedenti, facendo nascere numerosi interrogativi in merito al ruolo del gatto nell'epidemiologia del *Carnivore protoparvovirus 1* (Mochizuki et al., 1993a; Miyazawa et al., 1999; Ikeda et al., 2000; Nakamura et al., 2001; Battilani et al., 2011). In questo studio, l'assenza di segni clinici compatibili con parvovirosi nei gatti risultati positivi alla Real-Time PCR e la bassa quantità di DNA virale rilevato,

suggeriscono che gli animali possano aver sviluppato un'infezione asintomatica oppure che una piccola quantità di DNA virale possa rimanere nell'organismo dopo il superamento dell'infezione acuta. Inoltre, il riscontro del DNA virale nei leucociti rivela la presenza del virus nel midollo osseo o in altri tessuti linfoidei, il che potrebbe riflettere un'infezione cronica o latente.

Il riscontro del DNA di CPV-2 in gatti apparentemente sani conferma quanto emerso da uno studio precedente, in cui il CPV era stato rilevato nel 37% dei gatti sani campionati in due differenti rifugi nel Regno Unito (Clegg et al., 2012). Il DNA di virus CPV-2 *like* è stato rilevato anche in tessuti di carnivori selvatici che non mostravano alcun sintomo riconducibile all'infezione, di conseguenza è probabile che questi virus siano in grado di causare infezioni latenti o persistenti non solo nei gatti domestici (Allison et al., 2014).

Alcuni parvovirus animali, come il *Rodent protoparvovirus 1* ed il parvovirus della malattia del visone aleutino, possono causare infezioni persistenti nell'ospite (Best e Bloom, 2005; Janus et al., 2008). La capacità di persistere nell'ospite è stata dimostrata anche per quanto riguarda il parvovirus umano B19; il DNA di tale virus è stato infatti rilevato in un'ampia varietà di tessuti e nel midollo osseo di adulti asintomatici, sebbene nella maggior parte dei casi il virus non fosse in una forma in grado di replicare attivamente (Cassinotti et al., 1997; Söderlund-Venemo et al., 2002; Corcioli et al., 2008). Il sequenziamento e la caratterizzazione della sequenza parziale del gene codificante per la proteina VP2 hanno permesso di evidenziare che dei 9 gatti risultati positivi per la presenza del DNA di protoparvovirus dei carnivori, 4 albergavano DNA di FPV, 4 di CPV-2 (3 CPV-2b e 1 CPV-2c), mentre il gatto 41/2011 mostrava una complessità genetica insolita, dovuta alla contemporanea presenza del DNA riferibile a FPV e CPV-2.

La patogenicità delle varianti del CPV-2 nella specie felina non è ancora stata chiarita completamente. Alcuni studi suggeriscono che queste varianti abbiano lo stesso potenziale patogeno del FPV, mentre in altri studi sono state osservate infezioni clinicamente asintomatiche caratterizzate solo da una transitoria leucopenia (Mochizuki et al., 1996; Truyen et al., 1996b; Decaro et al., 2010; Battilani et al., 2011; Decaro et al., 2011). Questi risultati contrastanti hanno portato a speculare che il CPV-2, rispetto al FPV, possa causare più frequentemente infezioni asintomatiche e persistenti. In questo studio è stata rilevata una eguale prevalenza di CPV-2 e FPV nei campioni esaminati;

questo risultato potrebbe essere correlato al tipo di popolazione felina campionata, costituita principalmente da gatti sani e da gatti con segni clinici non riconducibili alle infezioni da parvovirus. In alternativa ciò potrebbe essere dovuto al fatto che in questo studio sono stati analizzati i buffy coat, mentre generalmente questo tipo di indagini vengono condotte sulle feci.

I tassi di variazione delle sequenze nucleotidiche di FPV e CPV-2 analizzate in questo studio erano simili, sebbene la differenza genetica nelle sequenze di FPV fosse riconducibile principalmente a mutazioni sinonime che non hanno prodotto sostituzioni amminoacidiche. Tale risultato appare congruente con il comportamento evolutivo di FPV, il quale, fin dalla sua identificazione nel 1920, non è andato incontro a modifiche sostanziali riguardanti le caratteristiche antigeniche e biologiche. Il FPV infatti mostra un basso tasso di mutazioni dovute a casuali drift genetici che non ne hanno modificato lo spettro d'ospite (Shackelton et al., 2005).

Per quanto riguarda le sequenze di CPV-2 ottenute in questo studio, le maggior parte delle mutazioni rilevate era di tipo non sinonimo. Anche questo risultato è compatibile con il pattern evolutivo osservato per il CPV-2: fin dalla sua emergenza negli anni '70 il virus ha subito un'evoluzione guidata da una forte selezione positiva, che ha portato all'emergenza di nuove varianti che hanno completamente soppiantato il CPV-2 originale (Shackelton et al., 2005).

Un'inusuale complessità genetica è stata rilevata nel campione 41/2011, con 6 differenti DNA virali riconducibili a FPV e CPV-2c. Malgrado le co-infezioni sostenute da più parvovirus siano rare, un simile caso è stato descritto in un gatto che è risultato contemporaneamente infettato da FPV e CPV-2a (Battilani et al., 2013). La frequenza di mutazione rilevata nel campione corrispondeva a circa  $2,8 \times 10^{-3}$ , un valore alla base della dinamica di popolazione "a quasispecie" tipica di alcuni virus a RNA. Questo risultato, assieme con il rilevamento di CPV-2c, che è stato già riportato in infezioni multiple caratterizzate da elevata complessità genetica, conferma che le co-infezioni con vari protoparvovirus in ospiti felini possano portare ad un'elevata variabilità genetica e alla potenziale emergenza di nuovi virus (Battilani et al., 2006; Battilani et al., 2007; Battilani et al., 2011).

Malgrado le informazioni inerenti alla storia vaccinale dei gatti testati non fossero disponibili, la presenza di mutazioni distintive tra le sequenze di DNA di FPV rilevate in

questo studio e quelle dei vaccini vivi attenuati disponibili permette di escludere la possibilità che il DNA virale rilevato sia di origine vaccinale e non consente di speculare riguardo una possibile persistenza di ceppi vaccinali di FPV nei leucociti felini. Quest'ultima possibilità può quindi essere esclusa anche se nei cani vaccinati con ceppi attenuati di CPV-2 è stata riportata una viremia persistente della durata di 24 giorni (Decaro et al., 2014).

## 1.8 Conclusioni

L'identificazione del DNA di FPV e CPV-2 nei leucociti di gatti apparentemente sani, malgrado la presenza di anticorpi anti-parvovirus, e la notevole variabilità genetica rilevata in uno dei campioni, suggeriscono che il gatto possa avere un ruolo rilevante nell'epidemiologia dei virus appartenenti alla specie *Carnivore protoparvovirus 1*. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire completamente la natura ed il significato clinico di tali risultati e l'effettivo ruolo del gatto come carrier di CPV-2. Studi futuri dovrebbero indagare la presenza del virus nelle feci al fine di valutare l'eliminazione virale, testare la vitalità e l'infettività dei virus rilevati mediante l'isolamento in coltura e tentare di determinare se i virus siano in attiva replicazione utilizzando RT-PCR aventi come target gli mRNA virali.

## 1.9 Bibliografia

- Addie, D.D., Jarrett, O., Simpson, J., Thompson H., 1996. Feline parvovirus in pedigree kittens. *Vet Rec* 138, 119.
- Addie, D.D., Toth, S., Thompson, H., Greenwood, N., Jarrett, J.O., 1998. Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Vet Rec* 142, 353–356.
- Aeffner, F., Ulrich, R., Schulze-Rückamp, L., Beineke, A., 2006. Cerebellar hypoplasia in three sibling cats after intrauterine or early postnatal parvovirus infection. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 113, 403–406.
- Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L., Parrish, C.R., 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 16, 155–171.
- Allison, A.B., Kohler, D.J., Ortega, A., Hoover, E.A., Grove, D.M., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2014. Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLoS Pathog.* 10(11):e1004475.
- Appel, M.J., Cooper, B.J., Greisen, H., Scott, F., Carmichael, L.E., 1979. Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet* 69, 123–133.
- Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., Battilani, M., 2018. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. *BMC Vet Res.* 14(1):41.
- Barbis, D.P., Chang, S.-F., Parrish, C.R., 1992. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* 191, 301–308.
- Battilani, M., Scagliarini, A., Ciulli, S., Morganti, L., Prosperi, S., 2006. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology* 352, 22–26.
- 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, 209–212.
- Battilani, M., Balboni, A., Scagliarini, A., Prosperi, S., 2011. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Vet Res.* 42:43.
- Battilani, M., Balboni, A., Giunti, M., Prosperi, S., 2013. Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat. *Vet Ital.* 49(1):127-9.

- Best, S.M., Bloom, M.E., 2005. Pathogenesis of Aleutian Mink Disease Parvovirus and Similarities to B19 Infection. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 52, 331–334.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* 82, 3021–3025.
- Carlson, J.H., Scott, F.W., Duncan, J.R., 1977. Feline Panleukopenia I. Pathogenesis in Germfree and Specific Pathogen-Free Cats. *Vet Pathol* 14, 79–88.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1980. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res* 41, 784–791.
- Carmichael, L.E., Schlafer, D.H., Hashimoto, A., 1994. Minute Virus of Canines (MVC, Canine Parvovirus Type-1): Pathogenicity for Pups and Seroprevalence Estimate. *J Vet Diagn Invest* 6, 165–174.
- Carmichael, L.E., 2005. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 303–311.
- Cassinotti, P., Burtonboy, G., Fopp, M., Siegl, G., 1997. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol* 53, 229–232.
- Chalmers, W.S.K., Truyen, U., Greenwood, N.M., Baxendale, W., 1999. Efficacy of feline panleukopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet Microbiol* 69, 41–45.
- Chang, S F, Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol* 66, 6858–6867.
- Chapman, M.S., Rossmann, M.G., 1993. Structure, Sequence, and Function Correlations among Parvoviruses. *Virology* 194, 491–508.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2012. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Vet Microbiol* 157, 78–85.
- Corcioli, F., Zakrzewska, K., Rinieri, A., Fanci, R., Innocenti, M., Civinini, R., Giorgi, V.D., Lollo, S.D., Azzi, A., 2008. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol* 80, 2005–
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33, 91–174.

- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Söderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Arch Virol* 159, 1239–1247.
- Csiza, C.K., De, L., Scott, F.W., Gillespie, J.H., 1971a. Pathogenesis of feline panleukopenia virus in susceptible newborn kittens. II. Pathology and immunofluorescence. *Infect Immun* 3, 838–846.
- Csiza, C. K., Scott, F.W., Lahunta, A.D., Gillespie, J.H., 1971b. Pathogenesis of Feline Panleukopenia Virus in Susceptible Newborn Kittens I. Clinical Signs, Hematology, Serology, and Virology. *Infect Immun* 3, 833–837.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007. The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infect Dis* 13, 1222–1224.
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Lucente, M.S., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C., 2010. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci* 89, 275–278.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C., 2011. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet J* 187(2):195-9.
- Decaro, N., Crescenzo, G., Desario, C., Cavalli, A., Losurdo, M., Colaianni, M.L., Ventrella, G., Rizzi, S., Aulicino, S., Lucente, M.S., Buonavoglia, C., 2014. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine* 32, 3850–3853.
- Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martín-Hernández, A.M., Sáiz, J.C., Escarmís, C., 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 4, 521–527.
- Eterpi, M., McDonnell, G., Thomas, V., 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect* 73, 64–70.
- Foley, J.E., Orgad, U., Hirsh, D.C., Poland, A., Pedersen, N.C., 1999. Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 214, 67–70, 43–44.
- Gamoh, K., Shimazaki, Y., Makie, H., Senda, M., Itoh, O., Inoue, Y., 2003. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *J Vet Med Sci* 65, 1027–1029.
- Greene, C. E. 2012. *Infectious Diseases of the Dog and the Cat (Fourth Edition)*. Elsevier, Athens, Georgia.

- Goodman, L.B., Lyi, S.M., Johnson, N.C., Cifuentes, J.O., Hafenstein, S.L., Parrish, C.R., 2010. Binding Site on the Transferrin Receptor for the Parvovirus Capsid and Effects of Altered Affinity on Cell Uptake and Infection. *J Virol* 84, 4969–4978.
- Goto, H., Hosokawa, S., Ichijo, S., Shimizu, K., Morohoshi, Y., Nakano, K., 1983. Experimental infection of feline panleukopenia virus in specific pathogen-free cats. *Nippon Juigaku Zasshi* 45, 109–112.
- Goto, H., Hirano, T., Uchida, E., Watanabe, K., Shinagawa, M., Ichijo, S., Shimizu, K., 1984. Comparative studies of physicochemical and biological properties between canine parvovirus and feline panleukopenia virus. *Nippon Juigaku Zasshi* 46, 519–526.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2008. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* 89, 2280–2289.
- Hoelzer, K., Parrish, C.R., 2010. The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 41(6):39.
- Horiuchi, M., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., Mochizuki, M., Nagasawa, H., Toyoda, Y., Ishiguro, N., Shinagawa, M., 1998. Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Virology* 249, 440–452.
- ICTV, 2018: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/circoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae). Ultimo accesso 30/10/2018
- Ikeda, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., Takahashi, E., 2000. Predominance of Canine Parvovirus (CPV) in Unvaccinated Cat Populations and Emergence of New Antigenic Types of CPVs in Cats. *Virology* 278, 13–19.
- Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mochizuki, M., 2002. Feline Host Range of Canine parvovirus: Recent Emergence of New Antigenic Types in Cats. *Emerg Infect Dis* 8, 341–346.
- Janus, L.M., Mähler, M., Köhl, W., Smoczek, A., Hedrich, H.J., Bleich, A., 2008. Minute Virus of Mice: Antibody Response, Viral Shedding, and Persistence of Viral DNA in Multiple Strains of Mice. *Comp Med* 58, 360–368.
- Johnson, R.H., Margolis, G., Kilham, L., 1967. Identity of feline ataxia virus with feline panleukopenia virus. *Nature* 214(5084):175-7.
- Kailasan, S., Agbandje-McKenna, M., Parrish, C.R., 2015. Parvovirus Family Conundrum: What Makes a Killer? *Annual Rev Virol* 2, 425–450.

- Koptopoulos, G., Papadopoulos, O., Papanastasopoulou, M., Cornwell, H.J., 1986. Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. *Vet Rec* 118, 332–333.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870–1874.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Liu, H., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Yi, X., Jiang, D., 2011. Widespread Endogenization of Densoviruses and Parvoviruses in Animal and Human Genomes. *J Virol* 85, 9863–9876.
- MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J., 2017. *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Academic Press, Boston, Massachusetts.
- Marcato, P.S., 2002. *Patologia sistematica veterinaria*. Edagricole, Bologna, Italia.
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and Implicance for Antigenic/Genetic Characterization. *Virus Genes* 33, 11–13.
- Miranda, C., Parrish, C.R., Thompson, G., 2014. Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease. *J Vet Diagn Invest* 26, 462–464.
- 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, 609–612.
- Mochizuki, M., Harasawa, R., Nakatani, H., 1993a. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet Microbiol* 38, 1–10.
- Mochizuki, M., San Gabriel, M.C., Nakatani H., Yoshida, M., Harasawa, R., 1993b. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci* 55(1):60-3.
- Mochizuki, M., Horiuchi, M., Hiragi, H., San Gabriel, M.C., Yasuda, N., Uno, T., 1996. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J Clin Microbiol* 34, 2101–2105.
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kawakami, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mikami, T., Mochizuki, M., 2001. Pathogenic Potential of Canine Parvovirus Types 2a and 2c in Domestic Cats. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 663–668.

- Ohshima, T., Mochizuki, M., 2009. Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. *J Vet Med Sci* 71, 403–408.
- Organtini, L.J., Allison, A.B., Lukk, T., Parrish, C.R., Hafenstein, S., 2015. Global Displacement of Canine Parvovirus by a Host-Adapted Variant: Structural Comparison between Pandemic Viruses with Distinct Host Ranges. *J Virol* 89, 1909–1912.
- Parker, J.S.L., Murphy, W.J., Wang, D., O’Brien, S.J., Parrish, C.R., 2001. Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *J Virol* 75, 3896–3902.
- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988. The Global Spread and Replacement of Canine Parvovirus Strains. *J Gen Virol* 69, 1111–1116.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–6552.
- Parrish, C.R., 1995. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin. Haematol.* 8, 57–71.
- Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69, 29–40.
- Parrish, C.R., Kawaoka, Y., 2005. The Origins Of New Pandemic Viruses: The Acquisition of New Host Ranges by Canine Parvovirus and Influenza A Viruses. *Annu Rev Microbiol* 59, 553–586.
- Poole, G.M., 1972. Stability of a Modified, Live Panleucopenia Virus Stored in Liquid Phase. *Appl Microbiol* 24, 663–664.
- Reed, A.P., Jones, E.V., Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* 62, 266–276.
- Ros, C., Bayat, N., Wolfisberg, R., Almendral, J.M., 2017. Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses* 9(11).
- Scagliarini, A., M. Battilani, S. Ciulli, A. Balboni, and L. Gallina., 2013. *Manuale Di Virologia Veterinaria*. Bononia University Press, Bologna, Italia.
- Schwers, A., Pastoret, P.-P., Burthonboy, G., Thiry, E., 1979. Fréquence en Belgique de l’infection à Parvovirus chez le chien, avant et après l’observation des premiers cas cliniques. *Annales de Médecine Vétérinaire*.
- Senda, M., Hirayama, N., Yamamoto, H., Kurata, K., 1986. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 12, 1–6.

- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 379–384.
- Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E., Tattersall, P., 1985. Characteristics and Taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23, 61–73.
- Söderlund-Venermo, M., Hokynar, K., Nieminen, J., Rautakorpi, H., Hedman, K., 2002. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol Biol* 50, 307–316.
- Steinel, A., Munson, L., van Vuuren, M., Truyen, U., 2000. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J Gen Virol* 81, 345–350.
- Steinel, A., Parrish, C.R., Bloom, M.E., Truyen, U., 2001. Parvovirus Infections in Wild Carnivores. *J Wildl Dis* 37, 594–607.
- Stuetzer, B., Hartmann, K., 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet J* 201, 150–155.
- Sykes, J.E., 2014. *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier/Saunders, Saint Louis, Missouri.
- Truyen, U., Agbandje, M., Parrish, C.R., 1994. Characterization of the Feline Host Range and a Specific Epitope of Feline Panleukopenia Virus. *Virology* 200, 494–503.
- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S.F., Obermaier, B., Veijalainen, P., Parrish, C.R., 1995. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol* 69, 4702–4710.
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996a. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. *Virology* 215, 186–189.
- Truyen, U., Platzer, G., Parrish, C.R., 1996b. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec* 138, 365–366.
- Truyen, U., Müller, T., Heidrich, R., Tackmann, K., Carmichael, L.E., 1998. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol Infect* 121, 433–440.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Et, A., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456–1464.

- Van Vuuren, M., Steinel, A., Goosen, T., Lane, E., Van der Lugt, J., Pearson, J., Truyen, U., 2000. Feline panleukopenia virus revisited: molecular characteristics and pathological lesions associated with three recent isolates. *J S Afr Vet Assoc* 71(3),140-3.
- Verge, J., e Christoforoni, N., 1928. La gastroenterite infectieuse des chats; est-elle due a un virus filtrable? *Comptes Rendus des Sciences de la Société de Biologie et de ses filiales* 99: 312.
- Weichert, W.S., Parker, J.S.L., Wahid, A.T.M., Chang, S.-F., Meier, E., Parrish, C.R., 1998. Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and Its Role in Infection. *Virology* 250, 106–117.
- Xie, Q., Chapman, M.S., 1996. Canine Parvovirus Capsid Structure Analyzed at 2.9 Å Resolution. *J Mol Biol* 264, 497–520.

## **2. INDAGINE MOLECOLARE SULLA DIFFUSIONE DEL CIRCOVIRUS CANINO IN CANIDI DOMESTICI E SELVATICI**

### **2.1 I circovirus ed il circovirus canino**

#### ***2.1.1 Introduzione***

Il genere *Circovirus* comprende numerose specie virali ospite-specifiche, alcune delle quali di notevole interesse veterinario, come il *Porcine circovirus 2* (PCV-2) ed il *Beak and feather disease virus* (BFVD) degli psittacidi (Rosario et al., 2017).

Recentemente è stata descritta una nuova specie, il *Canine circovirus* (CanineCV), in grado di infettare i canidi domestici e selvatici (Kapoor et al., 2012; Bexton et al., 2015). Le informazioni attualmente disponibili in merito alle caratteristiche biologiche, fisiche ed epidemiologiche del CanineCV sono scarse, di conseguenza per questi aspetti si fa generalmente riferimento alle specie virali più studiate del genere *Circovirus*, come PCV-2 e BFVD.

#### ***2.1.2 Storia***

La prima descrizione di un circovirus risale al 1974, quando Tischer e colleghi identificarono il circovirus suino (PCV) in linee cellulari di rene suino PK-15 contaminate; i virioni vennero inizialmente descritti come particelle virali papovavirus-like e picornavirus-like (Tischer et al., 1974). Il nome circovirus venne proposto nel 1982, poiché si evidenziò che tali virus possedevano un genoma costituito da singola molecola di DNA monocatenario chiuso a formare una struttura circolare (Tischer et al., 1982). Il PCV venne considerato apatogeno fino al 1997, anno in cui una nuova specie virale, il PCV-2, venne isolata da suini affetti da una sindrome da deperimento (Allan et al., 1998; Fields et al., 2013). Al fine di poterli distinguere, il ceppo originale venne denominato PCV-1, mentre quello patogeno PCV-2 (Fields et al., 2013).

Parallelamente all'identificazione nella specie suina, nuovi circovirus patogeni vennero isolati da varie specie di uccelli (Fields et al., 2013). Nel 1979 venne isolato il *Chicken*

*anaemia virus* (CAV), mentre, nel 1989, il BFDV venne identificato nei pappagalli cacatua (Yuasa et al., 1979; Ritchie et al., 1989).

Negli ultimi anni, l'impiego di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e PCR con primer degenerati hanno permesso l'identificazione di numerose nuove specie di circovirus infettanti pesci, uccelli e mammiferi, tra cui il cane.

Il CanineCV è stato rilevato per la prima volta nel 2012 negli Stati Uniti d'America in campioni sierici di cani di cui non era noto lo stato clinico e negli anni seguenti è stato identificato anche in cani affetti da varie patologie sistemiche e gastro-intestinali (Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013a; Dowgier et al., 2017). Successivamente alla sua identificazione nel cane domestico, il CanineCV è stato rilevato anche nei lupi e nelle volpi rosse (Bexton et al., 2015; Zaccaria et al., 2016). Numerosi studi hanno evidenziato un possibile ruolo patogeno del CanineCV nei canidi domestici e selvatici, tuttavia l'effettivo potenziale patogeno e spettro d'ospite del virus devono ancora essere definitivamente elucidati (Li et al., 2013a; Decaro et al., 2014; Bexton et al., 2015; Thaiwong et al., 2016; Zaccaria et al., 2016)

### **2.1.3 Classificazione**

Fino al 2015 all'interno della famiglia *Circoviridae* erano annoverati due generi: *Circovirus*, contenente varie specie infettanti uccelli e suini e *Gyrovirus*, contenente il solo CAV. In tempi recenti, tuttavia, l'impiego di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e PCR con primer degenerati ha permesso l'identificazione di nuovi circovirus in un'ampia varietà di specie ospiti, tra cui pesci, mammiferi ed invertebrati. Tali metodi, inoltre, hanno portato alla scoperta di un ulteriore tipo di virus strettamente correlato ai circovirus ed inclusi in un genere di nuova creazione, denominato *Cyclovirus*. Contemporaneamente, nuove indagini inerenti alla struttura e alle caratteristiche genomiche del CAV hanno evidenziato come questo virus sia in realtà più simile ai membri della famiglia *Anelloviridae*, alla quale, di conseguenza, il genere *Gyrovirus* è stato riassegnato. Attualmente, quindi, la famiglia *Circoviridae* comprende il genere *Circovirus*, composto da 29 specie (**Tabella 2.1**), ed il genere *Cyclovirus*, composto da 45 specie (MacLachlan e Dubovi, 2017; Rosario et al., 2017; ICTV, 2018).

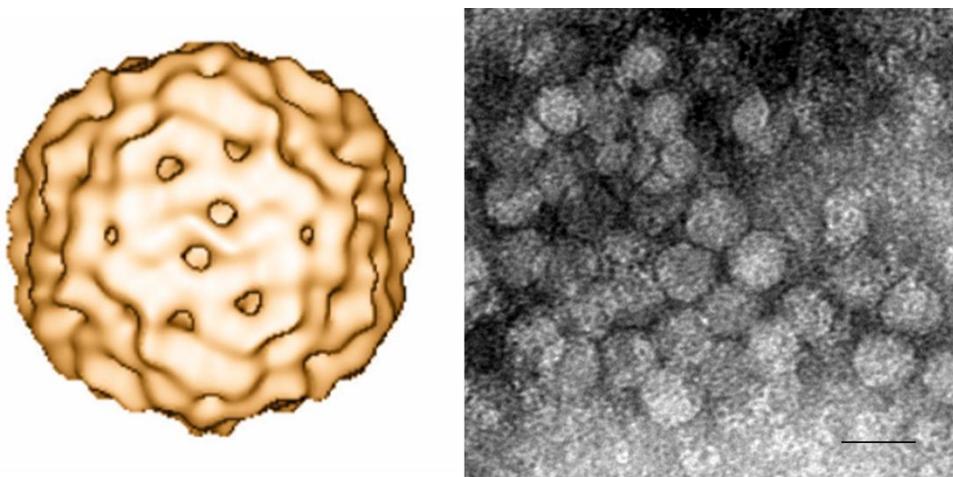
<b>Specie</b>	<b>Abbreviazione</b>
<i>Porcine circovirus 1</i>	PCV-1
<i>Porcine circovirus 2</i>	PCV-2
<i>Porcine circovirus 3</i>	PCV-3
<i>Beak and feather disease virus</i>	BFVD
<i>Duck circovirus</i>	DuCV
<i>Finch circovirus</i>	FiCV
<i>Gull circovirus</i>	GuCV
<i>Pigeon circovirus</i>	PiCV
<i>Starling circovirus</i>	StCV
<i>Zebra finch circovirus</i>	ZfiCV
<i>Raven circovirus</i>	RaCV
<i>Swan circovirus</i>	SwCV
<i>Goose circovirus</i>	GoCV
<i>Canary circovirus</i>	CaCV
<i>Canine circovirus</i>	CanineCV
<i>Mink circovirus</i>	MiCV
<i>Bat associated circovirus 1</i>	BatACV1
<i>Bat associated circovirus 2</i>	BatACV2
<i>Bat associated circovirus 3</i>	BatACV3
<i>Bat associated circovirus 4</i>	BatACV4
<i>Bat associated circovirus 5</i>	BatACV5
<i>Bat associated circovirus 6</i>	BatACV6
<i>Bat associated circovirus 7</i>	BatACV7
<i>Bat associated circovirus 8</i>	BatACV8
<i>Bat associated circovirus 9</i>	BatCV-9
<i>Chimpanzee associated circovirus 1</i>	ChimpACV
<i>Human associated circovirus 1</i>	HuACV1
<i>European catfish circovirus</i>	EcatfishCV
<i>Barbel circovirus</i>	BarCV

**Tabella 2.1:** Specie incluse nel genere *Circovirus* (modificato da [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus))

Il criterio di demarcazione della specie attualmente utilizzato per la famiglia *Circoviridae*, si basa sul grado di similarità nucleotidica dell'intera sequenza genomica, con un valore di cut-off corrispondente all'80% (Rosario et al., 2017).

#### **2.1.4 Struttura virale e caratteristiche genomiche**

I circovirus (**Figura 2.1**) sono virus di piccole dimensioni (15-20 nm), privi di envelope, con un capsid a simmetria icosaedrica T=1 costituito da 60 copie proteiche organizzate in 12 unità morfologiche pentameriche piatte (Crowther et al., 2003).

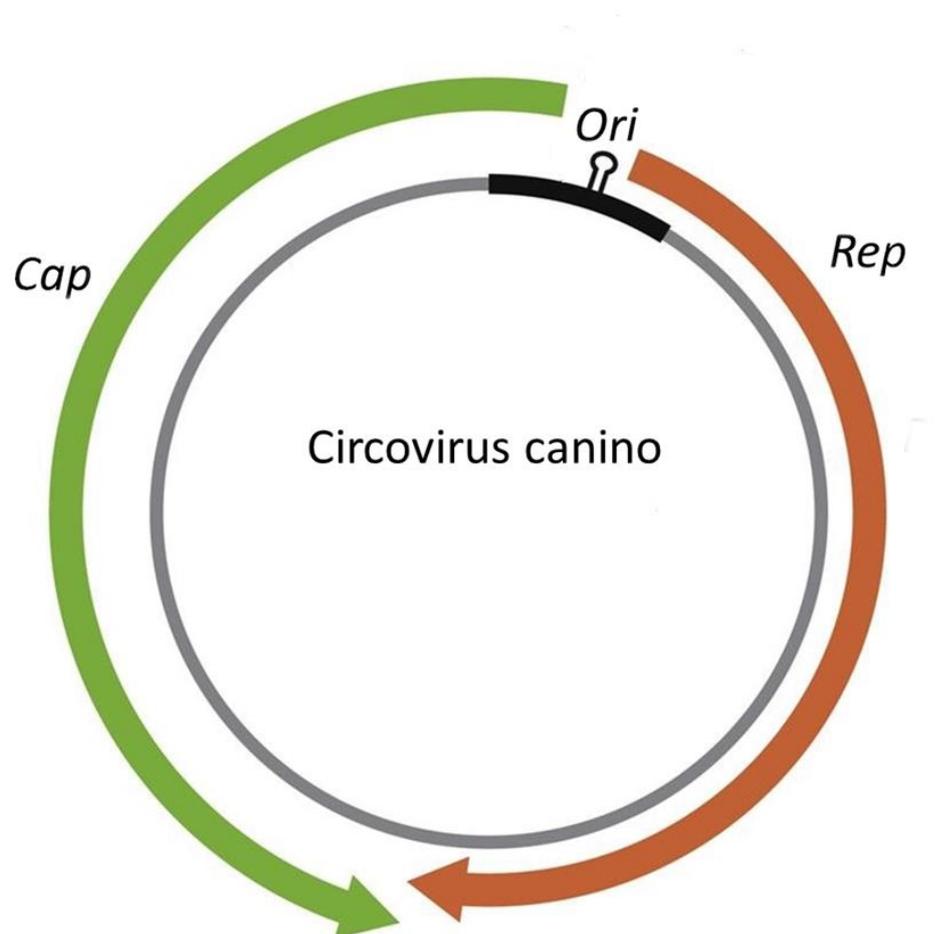


**Figura 2.1:** (Sinistra) ricostruzione 3D di un virione di PCV-2 basata su microscopia crio-elettronica (modificato da Crowther et al., 2003). (Destra) Virioni di PCV-2 al microscopio elettronico a trasmissione con colorazione negativa (modificato da [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus)).

I circovirus sono dotati un genoma molto semplice di circa 2000 basi, costituito da una molecola di DNA a singolo filamento (ssDNA) saldata alle estremità da legami covalenti a formare una struttura circolare (Rosario et al., 2017).

Tutti i genomi dei membri del genere *Circovirus* presentano due ORF principali. Questi ultimi sono disposti, in direzione opposta, sui due filamenti complementari di un intermedio replicativo di DNA a doppio filamento (dsDNA). Il primo ORF (ORF1) è localizzato sul filamento di DNA presente nel virione e codifica per una o più proteine associate alla replicazione (Rep) tradotte mediante splicing alternativo, mentre il secondo (ORF2) è disposto sul filamento di DNA complementare dell'intermedio replicativo e codifica per la proteina del capsid (Cap) (**Figura 2.2**; Rosario et al., 2017).

Nel genoma dei circovirus sono inoltre presenti due regioni intergeniche (IR) non codificanti, una posta tra le estremità 5' dei due principali ORF ed una tra le estremità 3' (Biagini et al., 2011). La prima di queste due regioni non codificanti presenta una caratteristica sequenza di 9 nucleotidi (TAGTATTAC), che funge da origine (*ori*) del meccanismo replicativo a cerchio rotante (rolling circle replication); questa sequenza è localizzata all'apice di un segmento "ad ansa" (stem-loop) termodinamicamente stabile (Cheung, 2012).



**Figura 2.2:** rappresentazione schematica del genoma di CanineCV. *Cap*: ORF codificante per la proteina del capsid; *Rep*: ORF codificante per la proteina associata alla replicazione; *Ori*: origine della replicazione a cerchio rotante (modificato da Rosario et al., 2017).

Il CanineCV presenta un genoma della lunghezza di 2063 nt, di cui 912 compongono l'ORF 1 e 813 l'ORF 2. La IR posta tra le estremità 3' dei due ORF si estende per 204 nt, mentre quella posta tra le estremità 5' per 135 (Kapoor et al., 2012).

I circovirus sono caratterizzati da notevole variabilità genetica, evidente soprattutto nei due ORF principali, riconducibile anche a fenomeni di ricombinazione (Franzo et al., 2016; Piewbang et al., 2018).

### **2.1.5 Proprietà fisiche e biologiche**

La maggior parte delle informazioni disponibili sulle caratteristiche fisiche e biologiche dei circovirus derivano da ricerche effettuate su PCV-1 e PCV-2. Ciò è dovuto al fatto che questi due virus, oltre ad essere conosciuti da decenni e possedere notevole impatto economico sull'allevamento suinicolo, sono gli unici membri del genere *Circovirus* isolabili in coltura (Fields et al., 2013). Ad oggi, infatti, i tentativi di coltivazione del CanineCV su linee cellulari MDCK (Madin-Darby canine kidney), D17 (cellule di osteosarcoma canino), A-72 (cellule di fibroma canino), VERO (cellule di rene di scimmia verde africana), WRCC (Walter Reed canine cells), CRFK (Crandell Rees feline Kidney) e FCWF (felis catus whole foetus) oppure su omogenati di fegato di cane e linfonodo di lupo non hanno avuto successo (Decaro et al., 2014; Zaccaria et al., 2016). I virioni dei circovirus presentano elevata stabilità e resistenza alla degradazione in condizioni ambientali (Todd, 2000). Il PCV-1 mantiene la sua infettività a pH 3 e dopo un trattamento a 70 °C per 15 minuti, è inoltre resistente ai solventi organici (Allan e Ellis, 2000). I virioni di PCV-1 mostrano un coefficiente di sedimentazione di 57 Svedberg e una densità di galleggiamento in cloruro di cesio di 1.33–1.37 g cm<sup>-3</sup> (Tischer et al., 1982, Allan and Ellis 2000). Sebbene nessuna informazione sia attualmente disponibile in merito alla resistenza dei virioni di CanineCV, è ipotizzabile che essa sia paragonabile a quella dei circovirus suini.

### **2.1.6 Epidemiologia**

La principale via di trasmissione dei circovirus è quella oro-fecale, sia diretta che indiretta, quest'ultima favorita dalla notevole resistenza dei virioni alle condizioni ambientali (Biagini et al., 2011). La possibilità di una trasmissione verticale è stata inoltre evidenziata per il PCV-2 e per alcuni circovirus degli uccelli e dei pesci (Duchatel et al., 2005, Rose et al., 2012, Li et al., 2014; Lőrincz et al., 2011).

Nessuno studio sperimentale ha fino ad oggi indagato le modalità di trasmissione del CanineCV; è tuttavia probabile che, come gli altri circovirus, si trasmetta principalmente per via oro-fecale.

Tutte le informazioni disponibili in merito alla diffusione del CanineCV derivano da indagini condotte con metodiche molecolari, in particolare Real-Time PCR, poiché ad oggi non sono state descritte altre tecniche, dirette o indirette, in grado di rilevare il virus. Lo spettro d'ospite del CanineCV comprende canidi domestici e selvatici. Nel cane domestico il virus è stato rilevato in USA, in Europa ed in Asia, con prevalenze comprese tra il 2,9% ed il 32,4% (Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013a; Dowgier et al., 2017; Piewbang et al., 2018).

Per quanto riguarda i canidi selvatici il virus è stato identificato nel lupo (*Canis lupus*) in Italia e nelle volpi rosse (*Vulpes vulpes*) nel Regno Unito e in Croazia (Bexton et al., 2015; Lojkic et al., 2016; Zaccaria et al., 2016).

Il riscontro del DNA di CanineCV in un campione di intestino di un tasso (*Meles meles*) in Italia suggerisce che lo spettro d'ospite del virus possa essere più ampio di quanto precedentemente ipotizzato e non limitato esclusivamente ai canidi (Zaccaria et al., 2016).

### **2.1.7 Aspetti clinici e patologici**

Nel corso degli ultimi anni numerosi studi hanno indagato l'impatto del CanineCV sulla salute dei cani domestici, malgrado ciò l'effettivo ruolo patogeno del virus non è ancora stato completamente chiarito.

La prima associazione tra il virus e lo sviluppo di stati patologici è stata riportata nel 2013: il DNA del CanineCV venne riscontrato nel fegato di un cane con gastroenterite emorragica, vasculite necrotizzante e linfadenite granulomatosa (Li et al., 2013a). Il cane risultò infetto anche da un nuovo bocavirus canino, di conseguenza l'effettivo ruolo del CanineCV nel determinare le patologie descritte non è stato accertato (Li et al., 2013b). Gli autori, tuttavia, rilevarono il DNA di CanineCV in altri 3 cani con lesioni anatomo-patologiche simili a quelle del primo cane positivo (Li et al., 2013a).

A seguito di quella prima descrizione, diverse indagini molecolari sono state condotte per valutare l'importanza del CanineCV come causa di gastroenteriti nel cane, indagando la prevalenza del DNA virale in gruppi di cani malati rispetto a gruppi di controllo costituiti da soggetti sani. Tre studi, condotti rispettivamente negli USA, in Germania ed in Italia,

non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nella prevalenza del virus tra i cani affetti da sindromi gastroenteriche ed i cani sani, mentre due studi condotti a Taiwan ed in Germania sono giunti a conclusioni opposte, rilevando una prevalenza dell'infezione significativamente più alta nei cani affetti da gastroenterite (Li et al., 2013a; Hsu et al., 2016; Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Gentil et al., 2017). Nel corso di alcuni studi venne evidenziata una maggiore prevalenza del CanineCV in cani contemporaneamente positivi anche per altri virus, quali CPV-2, coronavirus canino (CCoV) e virus del cimurro (CDV) (Zaccaria et al., 2016; Dowgier et al., 2017). Questi risultati, assieme al riscontro di una mortalità più alta nei cani con co-infezioni da CPV-2 e CanineCV rispetto ai cani infettati dal solo CPV-2, hanno permesso di ipotizzare che il CanineCV manifesti il proprio potere patogeno soprattutto in corso di co-infezioni, analogamente a quanto avviene per il PCV-2 (Segalés, 2012; Anderson et al., 2017). Il ruolo del CanineCV come agente causale di patologie nervose nel cane non è mai stato indagato, benchè nelle volpi sia stata rilevata una maggiore prevalenza del DNA di CanineCV nel siero di soggetti con sintomatologia neurologica rispetto a soggetti sani (Bexton et al., 2015)

## 2.2 Obiettivi degli studi

La prima descrizione del CanineCV nel 2012 in sieri di cani senza alcuna storia clinica ha determinato un notevole interesse verso la comprensione dell'effettivo ruolo patogeno del virus nella specie canina (Kapoor et al., 2012). Diversi studi sono stati condotti al fine di rilevare un'eventuale associazione tra la positività molecolare nei confronti del virus e lo sviluppo di sintomatologia gastroenterica, raggiungendo tuttavia conclusioni discordanti (Li et al., 2013a; Hsu et al., 2016; Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Gentil et al., 2017). Alcuni di questi studi hanno evidenziato una elevata prevalenza dell'infezione da CanineCV in soggetti infetti da CPV-2 (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017). Anderson e colleghi hanno inoltre riscontrato una più alta mortalità nei cani con co-infezione CanineCV+CPV-2 rispetto a quelli infettati dal solo CPV-2. Sulla base di questi risultati è stato ipotizzato che il CanineCV possa aggravare gli stati patologici causati dal CPV-2 piuttosto che agire come agente patogeno primario (Anderson et al., 2017).

I circovirus sono considerati strettamente ospite-specifici, e mentre in Italia la ricerca del virus nelle volpi rosse non ha dato risultati positivi, il CanineCV è stato recentemente rilevato anche in volpi rosse nel Regno Unito ed in Croazia (Bexton et al., 2015; Lojkić et al., 2016). Tuttavia, l'analisi delle sequenze nucleotidiche di riferimento disponibili nel database di GenBank, ha evidenziato l'esistenza di notevoli differenze genetiche tra i CanineCV circolanti nelle volpi rispetto a quelli circolanti nei cani (Zaccaria et al., 2016). Se tali differenze siano riconducibili all'esistenza di due o più popolazioni virali deve essere ancora chiarito, però esse devono essere tenute in considerazione nell'ambito di programmi di sorveglianza epidemiologica per il CanineCV nei canidi domestici e selvatici, impiegando metodiche diagnostiche la cui efficacia non risenta di questa variabilità genetica.

Alla luce di queste evidenze, la presente ricerca si è posta i seguenti obiettivi:

1. Mettere a punto un saggio di SYBR Green Real-Time PCR avente come target una regione genomica altamente conservata tra i CanineCV circolanti nei canidi domestici e selvatici (**Studio 1**);
2. Determinare la prevalenza dell'infezione da CanineCV in cani affetti da parvovirosi e confrontare i dati relativi ai parametri clinico-patologici, ai giorni di

ricovero e alla mortalità tra i soggetti che presentavano una co-infezione da CanineCV e CPV-2 rispetto a quelli infetti dal solo CPV-2, al fine di evidenziare differenze statisticamente significative tra i 2 gruppi in grado di confermare l'ipotesi che il CanineCV possa aggravare il decorso clinico delle infezioni da CPV-2 (**Studio 2**);

3. Indagare la circolazione del CanineCV in una popolazione di volpi rosse italiane (**Studio 2**).
4. Ottenere e caratterizzare le sequenze genomiche dei circovirus rilevati ed analizzarle filogeneticamente al fine di evidenziare le relazioni esistenti con le sequenze depositate nelle banche dati (**Studio 2**).

## **2.3 Studio 1: messa a punto di un saggio di SYBR Green Real-Time PCR specifico per CanineCV**

### ***2.3.1 Introduzione***

L'evidenza che il CanineCV possa infettare, oltre al cane domestico, anche i canidi selvatici, ha reso necessario lo sviluppo di una metodica molecolare in grado di rilevare i virus circolanti tanto nei primi quanto nei secondi (Zaccaria et al., 2016). La messa a punto di tale metodica è stata effettuata presso il Laboratorio di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET).

### ***2.3.2 Materiali e metodi***

#### ***2.3.2.1 Disegno dei primer***

Per disegnare una coppia di primer in grado di rilevare il DNA del più elevato numero possibile di CanineCV, tutte le sequenze nucleotidiche complete dei due ORF principali depositate presso il database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) sono state recuperate (Numeri di accesso delle sequenze utilizzate: MG737386; MG737385; MG737384; MG737383; MG737382; MG737381; MG737380; MG737379; MG737378; MF797786; MG266899; KF887949; JQ821392; NC\_020904; MF457592; KT734828; KT734827; KT734826; KT734825; KT734824; KT734823; KT734822; KT734821; KT734820; KT734819; KT734818; KT734817; KT734816; KT734815; KT734814; KT734813; KT734812; KT946839; KT283604; KJ530972; KC241984; KC241983; KC241982; KP260927; KP260926; KP260925; KP941114). Le sequenze sono state quindi allineate sfruttando l'algoritmo ClustalW implementato nel software BioEdit sequence alignment editor versione 7.0.5. (Hall, 1999). Grazie all'allineamento prodotto, è stato possibile identificare un target genomico altamente conservato, corrispondente alla regione intergenica posta tra le estremità 3' dei due ORF principali (**Figura 2.3**). È stata quindi disegnata una coppia di primer amplificante un frammento di 132 basi nella regione conservata (**Tabella 2.2**).



**Figura 2.3:** Allineamento della regione intergenica posta tra le estremità 3' dei due ORF principali delle sequenze di riferimento utilizzate per sviluppare il saggio di Real-Time SYBR Green PCR effettuato mediante il software BioEdit 7.0.5 (Nella colonna di sinistra sono riportati i numeri di accesso GenBank delle sequenze; i numeri in alto indicano la posizione dei singoli nucleotidi rispetto alla sequenza di referenza JQ821392; i puntini indicano che il nucleotide in quella determinata posizione è conservato rispetto alla sequenza di referenza JQ821392).

La coppia di primer è stata analizzata in silico mediante l'interfaccia web dell'applicativo Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) al fine di predirne la temperatura di melting e la tendenza a formare strutture secondarie o dimeri così come ad amplificare sequenze target diverse da quella attesa. Sulla base di queste prove in silico, la coppia di primer è stata ritenuta idonea per lo sviluppo del saggio di Real-Time PCR.

Primer	Sequenza	Posizione <sup>a</sup>	Amplicone
qCanineCV-For	5'-CTGAAAGATAAAGGCCTCTCGCT-3'	909-931	132
qCanineCV-Rev	5'-AGGGGGGTGAACAGGTAAACG-3'	1020-1040	

**Tabella 2.2:** Primer utilizzati per la messa a punto della SYBR Green Real-Time PCR. (<sup>a</sup>posizione dei primer rispetto alla sequenza di referenza JQ821392).

Una copia del frammento target di 132 nucleotidi è stata sintetizzata dalla ditta BioFab Research (Roma, Italia) sulla base della sequenza di referenza JQ821392 ed utilizzata per le successive fasi del processo di messa a punto.

### 2.3.2.2 Allestimento dello standard di riferimento

Per allestire lo standard della reazione di Real-Time PCR è stato prodotto un vettore plasmidico pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenente una copia della sequenza target. Il frammento di DNA da inserire nel vettore è stato ottenuto amplificando la copia sintetica della sequenza target mediante PCR convenzionale. Per la reazione di PCR è stata utilizzata la *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) e la coppia di primer precedentemente selezionata. Il ciclo di amplificazione utilizzato prevedeva una fase di estensione finale particolarmente lunga (20 minuti), ciò era necessario per ottenere un frammento dotato di estremità poliadenilate, indispensabili per le successive fasi del clonaggio. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione utilizzati sono riportati rispettivamente nelle **Tabelle 2.3a** e **2.3b**.

Il prodotto della reazione è stato purificato mediante il kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e quindi clonato mediante il TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), secondo le istruzioni fornite dai produttori. Il plasmide ricombinante ottenuto è stato purificato utilizzando il PureLink

Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordo con le istruzioni fornite dal produttore e la purezza del prodotto è stata valutata mediante spettrofotometro sulla base del rapporto 260/280 nm.

Allo scopo di evitare la presenza di DNA plasmidico superavvolto, il plasmide è stato linearizzato mediante l'enzima di restrizione FastDigest BcuI (Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) sfruttando il sito di restrizione a monte dell'inserto. Il plasmide linearizzato è stato visualizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio in buffer TAE; il GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) è stato utilizzato come marker di peso molecolare.

Il DNA plasmidico è stato quantificato misurandone l'assorbanza allo spettrofotometro ed il numero di copie dello standard plasmidico è stato calcolato usando l'equazione descritta dall'US Environmental Protection Agency protocol (2004).

Il DNA plasmidico è stato quindi diluito in acqua ultrapura fino ad ottenere uno stock contenente  $10^8$  copie di DNA/ $\mu$ l. Dallo stock sono state ottenute le diluizioni seriali in base 10 da  $1 \times 10^8$  fino a  $1 \times 10^{-2}$  copie di DNA/ $\mu$ l.

<b>Mix di reazione</b>			
<b>Reagente</b>	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Buffer	10X	5 $\mu$ l	1X
Qsolution	5X	10 $\mu$ l	1X
dNTP mix	2,5 mM ognuno	4 $\mu$ l	0,2 mM ognuno
qCanineCV-For	20 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
qCanineCV-Rev	20 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Taq polimerasi	5 unità/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	2,5 unità/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	27,5 $\mu$ l	-
DNA templato	-	1 $\mu$ l	-
Volume finale		50 $\mu$ l	

**Tabella 2.3a:** Mix amplificazione riferito alla PCR convenzionale utilizzata per amplificare la sequenza nucleotidica da inserire nel plasmide per allestire lo standard di riferimento.

Ciclo di reazione		
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min
Denaturazione	94 °C	30 sec
Annealing	59 °C	30 sec
Estensione	72 °C	30 sec
Estensione finale	72 °C	20 min

**Tabella 2.3b:** Ciclo amplificazione riferito alla PCR convenzionale utilizzata per amplificare la sequenza nucleotidica da inserire nel plasmide per allestire lo standard di riferimento.

### 2.3.2.3 SYBR Green Real-Time PCR

La Real-Time PCR è stata eseguita usando la PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, Stati Uniti) ed il sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, Stati Uniti). Il ciclo termico di amplificazione è stato stabilito sulla base della temperatura di melting predetta in silico per i primer selezionati, delle istruzioni fornite dal produttore della PowerUp SYBR Green Master Mix e della possibilità di poter effettuare la reazione contemporaneamente ad altre metodiche diagnostiche utilizzate presso il laboratorio INFLAB. Il segnale fluorescente è stato acquisito sul canale FAM/SYBR Green con la lettura della fluorescenza alla fine di ogni fase di estensione. La temperatura di melting specifica per l'amplicone atteso è stata determinata sperimentalmente al termine dell'ultima fase di estensione, mediante un aumento della temperatura da 55 °C a 99 °C con incremento di 2 °C/min e acquisizione in continuo del segnale fluorescente. La composizione della mix di reazione ed il ciclo di amplificazione sono riportati nella **Tabella 2.4**.

<b>Mix di reazione</b>			
<b>Reagente</b>	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Master Mix	2X	10 µl	1X
qCanineCV-For	10 µM	1 µl	0,5 µM
qCanineCV-Rev	10 µM	1 µl	0,5 µM
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	8 µl	-
DNA template	-	2 µl	-
Volume finale		20 µl	

<b>Ciclo di reazione</b>			
<b>Fase del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	
Attivazione della Hot-Start polimerasi	95 °C	5 min	
Denaturazione	95 °C	15 sec	} 40X
Annealing ed Estensione	60 °C	60 sec	
Determinazione T <sub>m</sub>	Da 55 °C a 99 °C con incremento di 2 °C/min		

**Tabella 2.4:** Mix e ciclo di amplificazione riferiti alla SYBR Green Real-Time PCR

#### 2.3.2.4 Determinazione dell'efficienza, della sensibilità e della specificità della Real-Time PCR

L'efficienza della reazione è stata determinata utilizzando diluizioni seriali in base 10 del plasmide ricombinante a concentrazione nota ottenuto precedentemente. Tali diluizioni (da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{-2}$  copie/µl) sono state testate in triplicato nella stessa reazione ed utilizzate come standard di quantificazione per costruire una retta di regressione lineare che esprime il rapporto fra concentrazione virale iniziale e ciclo soglia (Ct). La soglia di fluorescenza è stata determinata usando l'apposita funzione presente nel software del sistema StepOnePlus Real-Time PCR. L'efficienza è stata calcolata mediante la formula:  $Eff = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Nella reazione è stato testato in duplicato anche un no-template control, costituito dalla mix di reazione più 2 microlitri di acqua ultrapura.

La sensibilità della metodica è stata valutata calcolando il limite di detection (LOD), definito come la concentrazione più bassa di DNA target che può essere rilevata nel 95% dei replicati (Quorollo et al., 2017). A tale scopo, venti replicati contenenti 3 copie DNA target/µl e 20 contenenti 5 copie di DNA target/µl sono stati testati e la quantità risultata

rilevabile in almeno 19 replicati su 20 è stata assunta come LOD. Contemporaneamente sono stati testate 8 diluizioni (da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^1$ ) seriali in base 10 dello standard plasmidico per verificare la corretta riuscita della reazione ed un no-template control per valutare la presenza di eventuali contaminazioni.

La specificità dell'amplificato è stata valutata analizzando la temperatura di melting di tutti i replicati delle diluizioni plasmidiche utilizzati nella reazione effettuata per stabilire l'efficienza del saggio molecolare.

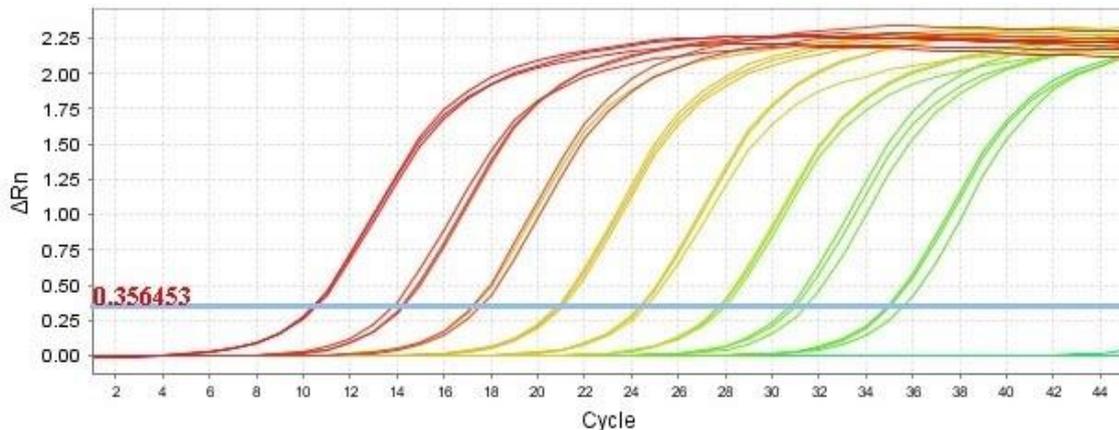
Gli ampliconi ottenuti sono stati inoltre sottoposti ad elettroforesi per verificare la presenza di bande delle dimensioni attese. A tal scopo, cinque microlitri di ogni prodotto di reazione sono stati caricati su gel di agarosio al 2% colorato con bromuro di etidio in TAE all'1% e visualizzati con luce ultravioletta (UV); il GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) è stato utilizzato come marker di peso molecolare. Gli ampliconi sono stati inoltre purificati mediante il kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e sequenziati utilizzando il sequenziatore ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state confrontate con le sequenze di referenza del CanineCV mediante l'interfaccia web dell'applicativo BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

Un'ulteriore prova di specificità è stata effettuata testando in duplicato estratti di DNA precedentemente risultati positivi con metodiche biomolecolari per patogeni di interesse veterinario (CPV-2, FPV, *Babesia spp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Canine adenovirus 1* e *Canine herpesvirus 1*) e mai testati per CanineCV.

### 2.3.3 Risultati

L'efficienza del saggio di SYBR Green Real-Time PCR è stata valutata sulla base di una curva standard ottenuta testando 11 diluizioni seriali in base 10 (da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{-2}$ ) di un plasmide ricombinante a concentrazione nota contenente il frammento target di una regione genomica altamente conservata di CanineCV. Per ognuna delle diluizioni sono stati testati 3 replicati.

Uno solo dei 3 replicati della diluizione  $1 \times 10^0$  è risultato positivo, mentre nessuna amplificazione è avvenuta nei 3 replicati delle diluizioni  $1 \times 10^{-2}$  e  $1 \times 10^{-1}$  (**Figura 2.4**). Di conseguenza tali replicati sono stati esclusi dalle successive analisi e la curva standard è stata costruita con 8 punti. Nessuna amplificazione è stata inoltre evidenziata nel no-template control, evidenziando l'assenza di contaminazioni.

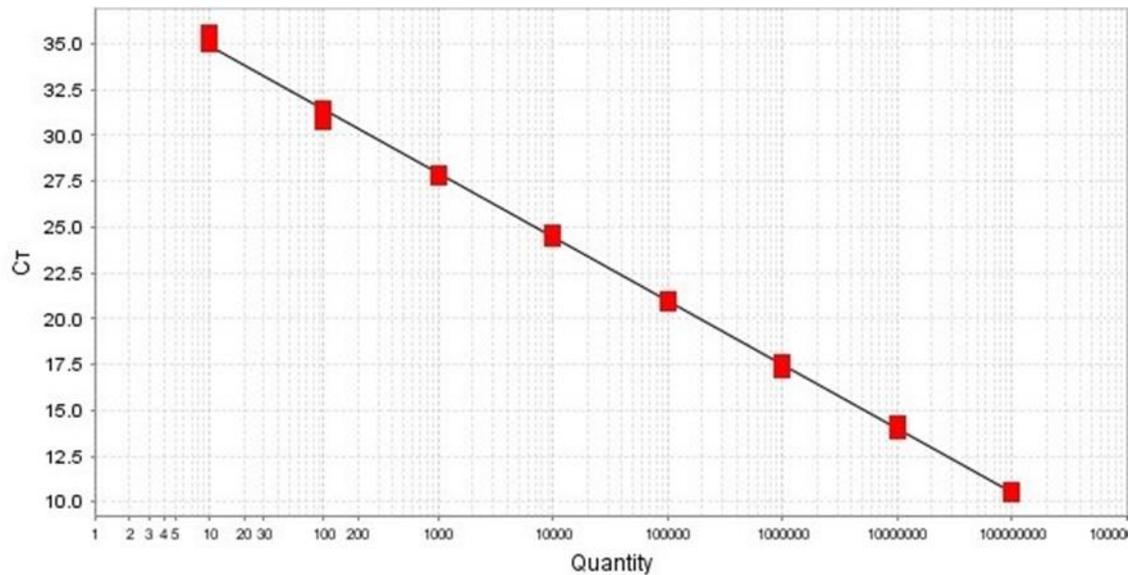


**Figura 2.4:** Tracciato di amplificazione delle diluizioni plasmidiche da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{-1}$ . Il grafico mostra l'entità del segnale fluorescente normalizzato generato in ogni ciclo di amplificazione ( $\Delta Rn$ ) in funzione del ciclo (Cycle).

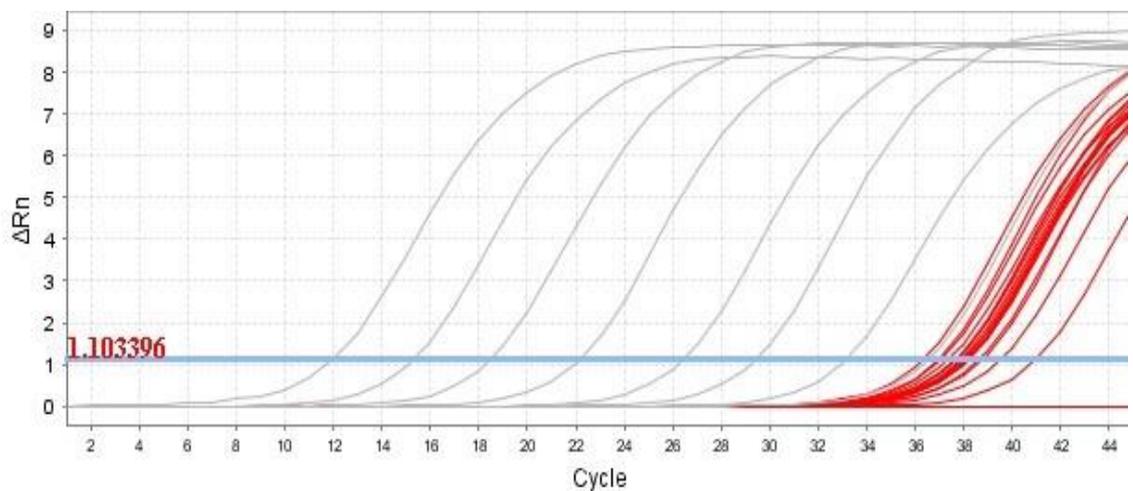
La retta ottenuta (curva standard, **Figura 2.5**) ha mostrato di avere una relazione lineare per 8 diluizioni plasmidiche in base 10 consecutive. La pendenza della retta (slope) era di -3,48 con un coefficiente di determinazione ( $R^2$ )  $> 0,99$  ed una efficienza di reazione del 94%.

Nella reazione effettuata per determinare il LOD, si è osservata una corretta amplificazione delle 8 diluizioni plasmidiche utilizzate come standard e nessuna amplificazione è stata generata dal no-template control. Il LOD è risultato essere di 5 copie di DNA target per reazione, poiché 19 su 20 (95%, **Figura 2.6**) replicati contenenti

tale quantità sono risultati positivi, mentre la positività si è avuta in soli 14/20 (70%) replicati contenenti 3 copie di DNA target.



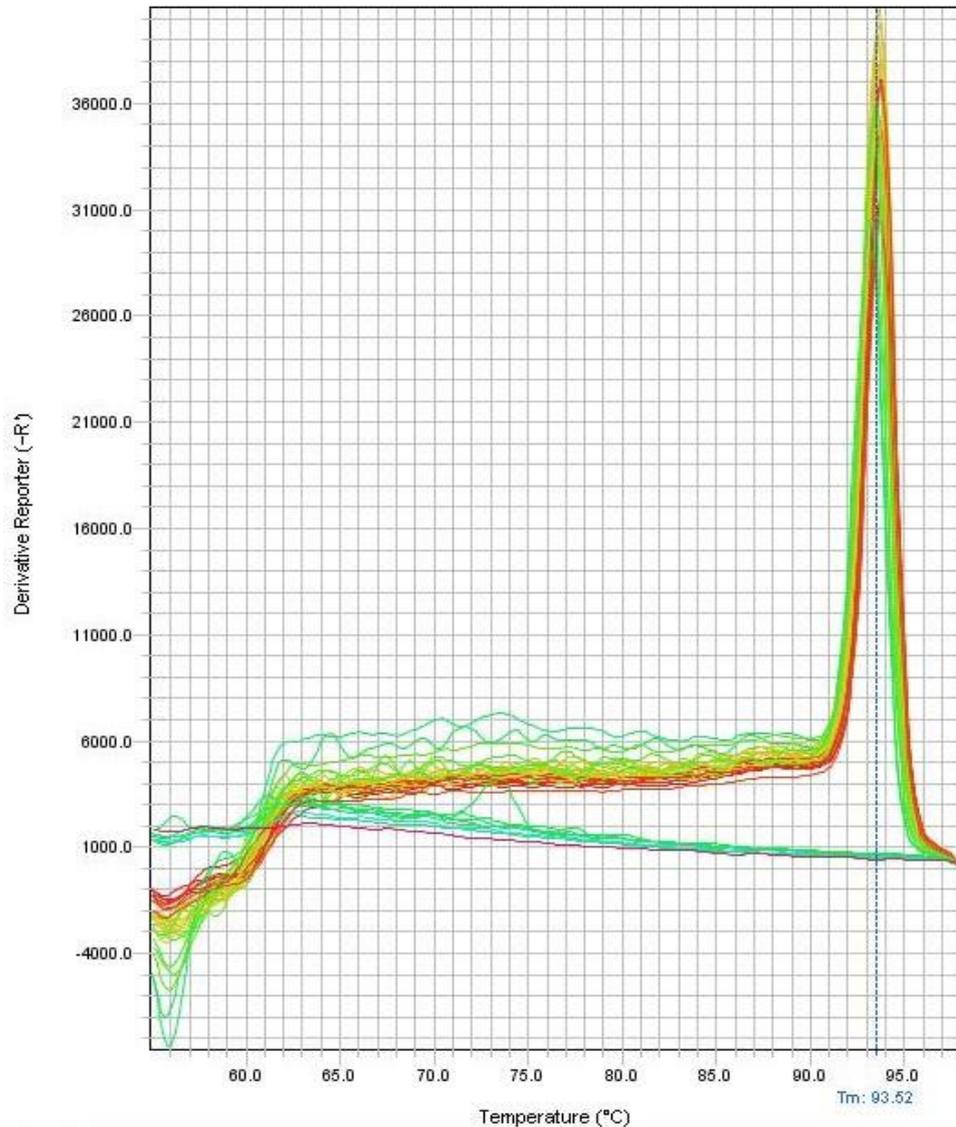
**Figura 2.5:** Curva standard della SYBR Green Real-Time PCR. Ct: Ciclo soglia; Quantity: Quantità rilevata.



**Figura 2.6:** Tracciato di amplificazione della reazione utilizzata per determinare il LOD della metodica. In grigio gli standard da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^1$ ; in rosso i 20 replicati con 5 copie DNA target/μl di estratto.

L'analisi delle curve di melting di tutti i replicati delle diluizioni plasmidiche risultate positive nella reazione effettuata per stabilire l'efficienza del saggio ha evidenziato

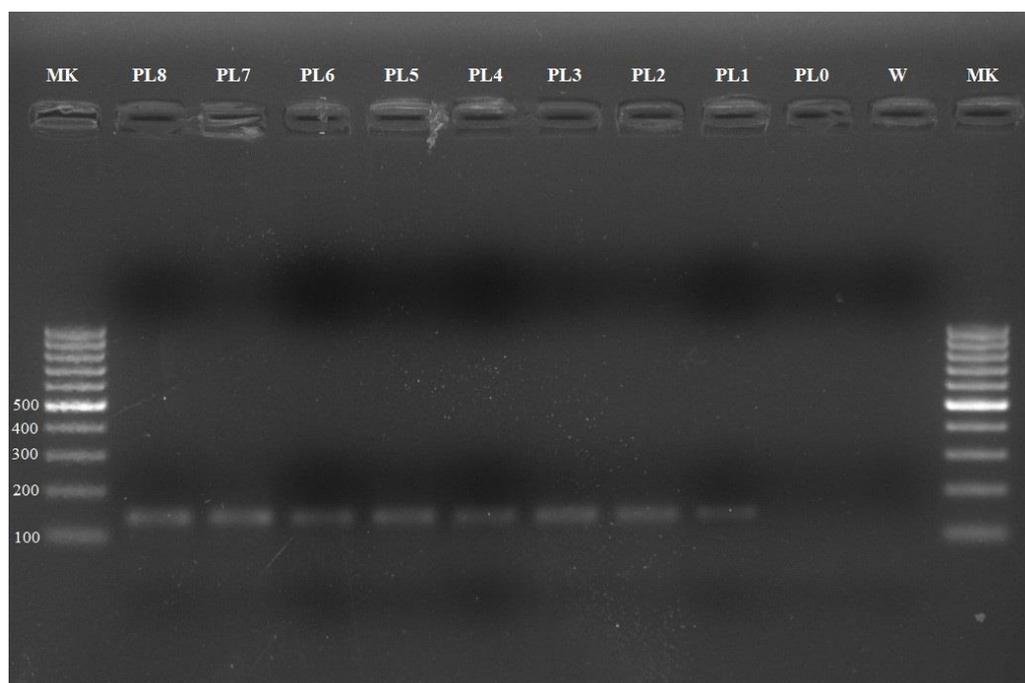
l'esistenza di un unico picco, corrispondente ad una temperatura di  $93,5 \pm 0,3$  °C; tale temperatura è stata quindi assunta come temperatura di melting specifica per questo saggio molecolare (**Figura 2.7**).



**Figura 2.7:** Grafico della curva di melting delle diluizioni plasmidiche testate per stabilire l'efficienza della reazione. Il grafico mostra il segnale fluorescente del reporter derivativo (-R') in funzione della temperatura.

Gli ampliconi ottenuti sono stati testati mediante elettroforesi su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio in buffer TAE e una chiara e ben definita banda specifica di approssimativamente 132 bp è stata visualizzata con luce UV per tutti i replicati delle

diluizioni plasmidiche, ad eccezione della diluizione  $1 \times 10^0$  (**Figura 2.8**). Gli ampliconi sono stati inoltre sequenziati e le sequenze ricavate presentavano un'identità del 100% con il tratto della sequenza di riferimento JQ821392 utilizzata come matrice per sintetizzare il frammento target.



**Figura 2.8:** Elettroforesi dei prodotti della Real-Time PCR effettuata al fine di valutare l'efficienza della metodica. La banda specifica di 132 bp è visibile in tutte le diluizioni plasmidiche testate, con l'eccezione della  $1 \times 10^0$ . MK: marker di peso molecolare, il peso in bp è riportato in corrispondenza delle bande. PL8 – PL0: diluizioni seriali in base 10 dello standard plasmidico da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^0$  copie di DNA/ $\mu$ l. W: bianco di reazione

La specificità diagnostica della metodica sviluppata è stata confermata dalla assenza di amplificazione nei campioni positivi per altri patogeni di interesse veterinario (CPV-2, FPV, *Babesia spp*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Canine adenovirus 1* e *Canine herpesvirus 1*).

#### ***2.3.4 Discussione***

In questo studio è stato messo a punto un saggio di SYBR Green Real-Time PCR in grado di rilevare il DNA di CanineCV con elevata sensibilità (5 copie di DNA target/ $\mu$ l di estratto), specificità ed efficienza.

Per sviluppare il saggio è stato prodotto un allineamento con tutte le sequenze di CanineCV, complete dei due ORF principali, disponibili nel database di GenBank. L'allineamento ha permesso di evidenziare una regione altamente conservata posta tra le estremità 3' dei due ORF principali; sono stati quindi disegnati due primer amplificanti un frammento di 132 basi posto in questa regione.

Nessuna delle metodiche molecolari atte a rilevare il CanineCV attualmente disponibili in letteratura presenta le caratteristiche necessarie per essere utilizzata a scopo diagnostico o di sorveglianza epidemiologica sia nei canidi domestici che selvatici. Ciò è dovuto principalmente al fatto che esse siano state sviluppate nell'ambito di indagini condotte esclusivamente sui cani oppure esclusivamente sulle volpi; di conseguenza nel disegnare i primer non è stata considerata la diversità genetica esistente tra i CanineCV circolanti nei canidi domestici e selvatici.

In un recente studio condotto in Italia, due di queste metodiche di Real-Time PCR (Li et al., 2013a e Bexton et al., 2015) sono state utilizzate per rilevare il DNA virale da campioni di carnivori domestici e selvatici e le loro performance diagnostiche sono state confrontate (Zaccaria et., 2016). La metodica sviluppata da Li e colleghi (rtPCR<sub>DogCV</sub>) è stata disegnata su una sequenza nucleotidica di CanineCV ottenuta da un cane mediante pirosequenziamento, mentre quella di Bexton e colleghi (rtPCR<sub>FoxCV</sub>) su 3 sequenze ottenute da volpi rosse con la medesima metodica. Zaccaria e colleghi hanno testato con entrambe le metodiche 389 campioni di cani, lupi, volpi rosse e tassi. Mediante la metodica rtPCR<sub>DogCV</sub> 32 campioni prelevati da 9 lupi, 8 cani ed 1 tasso sono risultati positivi. Di questi 32, solo 25 sono risultati positivi impiegando la rtPCR<sub>FoxCV</sub> e nessuno dei 389 campioni è risultato positivo alla rtPCR<sub>FoxCV</sub> ma negativo alla rtPCR<sub>DogCV</sub> (Zaccaria et al., 2016). Analizzando le sequenze nucleotidiche virali ottenute nel corso dell'indagine insieme a quelle ricavate dal database di GenBank, gli autori hanno evidenziato l'esistenza di mismatch multipli tra i primer impiegati nella rtPCR<sub>FoxCV</sub> e le sequenze nucleotidiche dei CanineCV rilevati nei cani e nei lupi, ipotizzando che le scarse performance della metodica nel rilevare i virus in questi animali possano essere

riconducibili proprio a tali mancate corrispondenze (Zaccaria et al., 2016). Purtroppo, Zaccaria e colleghi non hanno rilevato il DNA di CanineCV in nessuna delle 24 volpi testate nella loro indagine, di conseguenza non sono disponibili dati circa le performance delle due metodiche con le sequenze virali circolanti in questa specie. Le analisi in silico hanno però mostrato fino a 5 mismatch tra i primer e la probe utilizzati per la  $rtPCR_{DogCV}$  e le sequenze di CanineCV ottenute da volpi rosse in UK, evidenziando, nella regione target del saggio, una notevole variabilità che ne inficia l'applicabilità in questa specie (Zaccaria et al., 2016).

La metodica di Real-Time PCR sviluppata nel presente studio ha come target molecolare una regione del genoma del CanineCV altamente conservata e questo fa sì che il primer forward (qCanineCV-For) non presenti alcun mismatch con nessuna delle sequenze di referenza, mentre il reverse (qCanineCV-Rev) mostri un singolo mismatch con la sola sequenza KP941114. Questo saggio molecolare si presta, quindi, ad essere utilizzato ai fini di indagini diagnostiche e di sorveglianza tanto nei canidi domestici quanto in quelli selvatici, anche alla luce di possibili trasmissioni del virus tra le due popolazioni, senza dover ricorrere all'utilizzo di più metodiche differenti con il conseguente aggravio di costi e tempi che ne deriverebbe.

## **2.4 Studio 2: indagine sulla circolazione del CanineCV in cani positivi per CPV-2 e in una popolazione di volpi rosse**

### ***2.4.1 Introduzione***

Ad oggi, l'effettivo ruolo patogeno del CanineCV nella specie canina non è stato del tutto chiarito, tuttavia è stato ipotizzato che possa mostrare un sinergismo con il CPV-2, aggravando le sindromi cliniche causate da quest'ultimo (Anderson et al., 2017).

La circolazione del CanineCV è stata dimostrata anche nelle volpi rosse in Gran Bretagna ed in Croazia (Bexton et al., 2015; Lojkic et al., 2016). Fino ad ora un solo studio ha indagato la circolazione del virus nelle volpi rosse in Italia, senza rilevare alcun soggetto infetto (Zaccaria et al. 2016). La circolazione del CanineCV tra le volpi rosse presenti in Italia non è quindi ancora stata accertata.

### ***2.4.2 Materiali e Metodi***

#### ***2.4.2.1 Disegno dello studio***

In questo studio retrospettivo sono stati testati, mediante un saggio di SYBR Green Real-Time PCR atto a rilevare la presenza del DNA di CanineCV, estratti di DNA di cani risultati PCR positivi per CPV-2. I dati relativi ai parametri clinico-patologici, ai giorni di ricovero e alla mortalità dei cani positivi sia per CanineCV che CPV-2 sono stati confrontati con quelli positivi solo per CPV-2.

Il CanineCV è stato inoltre ricercato in estratti di DNA ottenuti da 32 volpi rosse provenienti dall'Italia.

Il genoma dei circovirus eventualmente identificati è stato amplificato mediante PCR convenzionali e quindi sequenziato. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate mediante strumenti bioinformatici.

#### ***2.4.2.2 Cani: popolazione di studio***

Lo studio è stato condotto su estratti di DNA di 162 cani risultati positivi per CPV-2 mediante PCR. Tali estratti di DNA erano stati ottenuti in un periodo di tempo compreso tra il 1994 ed il 2017 e costituivano la ceppoteca stoccata presso il Laboratorio di Diagnostica delle Malattie Infettive (INFLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche

Veterinarie (DIMEVET). Tutti gli estratti erano stati ottenuti a partire da campioni di feci o tamponi rettali nell'ambito dell'attività diagnostica di routine o di ricerca condotta presso il laboratorio INFLAB.

Dal momento della loro processazione per rilevare il DNA del CPV-2, gli estratti erano stati conservati a -20 °C.

I cani da cui sono stati ottenuti gli estratti di DNA oggetto del presente studio, unitamente alle informazioni inerenti al segnalamento ed alla data di campionamento sono riportati nella **Tabella 2.5**.

N°	CAMPIONE	DATA	PROVENIENZA	RAZZA	SESSO	ETÀ
1	580/94	1994	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
2	581/94	1994	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
3	582/94	1994	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
4	583/94	1994	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
5	584/94	1994	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
6	586/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
7	589/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
8	590/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
9	591/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1A
10	592/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
11	598/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
12	601/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	6M
13	602/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1A
14	603/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	6M
15	604/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
16	609/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1A
17	610/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	9M
18	611/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
19	613/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	5A
20	615/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1A
21	616/95	1995	Friuli Venezia Giulia	N.D.	N.D.	6M
22	618/95	1995	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
23	620/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M

24	621/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	5M
25	622/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
26	627/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	6M
27	628/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	4M
28	1138B/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
29	631/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
30	632/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
31	633/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
32	634/96	1996	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
33	635/96	1996	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
34	636/96	1996	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	9M
35	637/96	1996	Piemonte	N.D.	N.D.	6M
36	639/96	1996	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
37	649/97	1997	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
38	660/97	1997	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1M
39	662/97	1997	N.D.	N.D.	N.D.	3M
40	663/97	1997	N.D.	N.D.	N.D.	4M
41	669/97	1997	N.D.	N.D.	N.D.	2M
42	670/97	1997	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
43	671/98	1998	N.D.	N.D.	N.D.	2M
44	677/98	1998	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	6A
45	679/98	1998	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
46	683/99	1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
47	684/99	21.05.1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	4M
48	685/99	21.05.1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1,5M
49	686/99	1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1M
50	687/99	1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
51	689/99	1999	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
52	690/00	2000	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	8M
53	691/00	2000	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	3M
54	694/00	2000	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1,5M
55	697/00	2000	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	1A
56	701/00	2000	Basilicata	N.D.	N.D.	2M
57	704/00	2000	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	6M

58	706/00	2000	Abruzzo	N.D.	N.D.	4M
59	707/01	2001	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	7M
60	709/01	2001	Lazio	N.D.	N.D.	6M
61	714/01	2001	Veneto	N.D.	N.D.	N.D.
62	305/02	10.04.2002	Emilia-Romagna	Barbone Toy	N.D.	2M
63	581/03	2003	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
64	1387/03	01.09.2003	Emilia-Romagna	Maltese	f	2M
65	1450/03	09.10.2003	Emilia-Romagna	Meticcio	N.D.	3M
66	113/05	2001	Abruzzo	N.D.	N.D.	4M
67	630/05	14.04.2005	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
68	1805/05	15.12.2005	Veneto	Cocker spaniel	N.D.	1,5M
69	258/06	10.02.2006	Emilia-Romagna	Pinscher	N.D.	1,5M
70	425/06	16.03.2006	Emilia-Romagna	Bracco italiano	f	10M
71	691/06	02.05.2006	Toscana	N.D.	N.D.	N.D.
72	1281/06	19.09.2006	Emilia-Romagna	Y. T.	N.D.	N.D.
73	1401/06	26.09.2006	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
74	158/07	19.01.2007	Emilia-Romagna	Meticcio	f	2A
75	241/07	05.02.2007	Marche	Meticcio	M	7M
76	481/07	28.03.2007	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	N.D.
77	995/07	03.07.2007	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
78	996/07	03.07.2007	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
79	59/08	07.01.2008	Emilia-Romagna	Meticcio	f	2M
80	97/08	02.11.2007	Emilia-Romagna	Meticcio	m	7M
81	192/08	06.02.2008	Emilia-Romagna	Bassotto	f	2A
82	331/08	26.03.2008	Emilia-Romagna	Meticcio	f	2M
83	332/08	21.02.2008	Veneto	L.C.	m	2M
84	947/08	10.10.2008	N.D.	N.D.	N.D.	2M
85	89/09	02/10/2009	Emilia-Romagna	Rottweiler	m	3M
86	109/09	16.02.2009	Est Europa	C. K. C. S.	f	4M
87	212/09	23.03.2009	Est Europa	Maltese	m	2M
88	250/09	31.03.2009	Est Europa	Carlino	N.D.	2M
89	272/09	03.04.2009	Est Europa	Rottweiler	N.D.	2M
90	314/09	23.04.2009	Emilia-Romagna	Pointer	N.D.	2M
91	326/09	24.04.2009	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

92	461/09	13.05.2009	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
93	462/09	13.05.2009	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
94	463/09	13.05.2009	Emilia-Romagna	N.D.	N.D.	2M
95	800/09	23.07.2009	Emilia-Romagna	J. R.T.	f	11M
96	115/10	27.01.2010	Emilia-Romagna	W.H.W.T.	m	4M
97	118/10	08.01.2010	Emilia-Romagna	Meticcio	f	1M
98	120/10	12.01.2010	Emilia-Romagna	P.T.	m	10A
99	121/10	16.01.2010	Emilia-Romagna	Meticcio	m	3M
100	393/10	22.04.2010	Emilia-Romagna	Bolognese	N.D.	2M
101	409/10	29.04.2010	Emilia-Romagna	Meticcio	f	9M
102	540/10	16.06.2010	Emilia-Romagna	Maltese	f	2M
103	541/10	16.06.2010	Emilia-Romagna	N.D.	f	1M
104	04/11	2011	Sicilia	N.D.	N.D.	N.D.
105	53/11	12.05.2011	Emilia-Romagna	P.T.	m	1M
106	88/11	2011	Emilia-Romagna	N.D.	f	3M
107	128/11	05.12.2011	Emilia-Romagna	C.K.C.S.	f	4M
108	134/12	09.01.2012	Emilia-Romagna	Rottweiler	f	3M
109	138/12	2012	Emilia-Romagna	Bassotto nano	m	5M
110	149/12	06.02.2012	Emilia-Romagna	B.B.	f	3M
111	151/12	13.02.2012	Emilia-Romagna	Cane corso	m	4M
112	210/12	17.04.2012	Emilia-Romagna	E.B.	f	2A
113	263/12	18.05.2012	Campania	Bulldog	m	9M
114	294/12	07.06.2012	Emilia-Romagna	Meticcio	m	4M
115	304/12	19.06.2012	Emilia-Romagna	Lagotto	f	4M
116	334/12	03.08.2012	Emilia-Romagna	A.S.T.	m	5M
117	340/12	11.08.2012	Emilia-Romagna	A.S.T.	f	5M
118	341/12	13.08.2012	Emilia-Romagna	A.S.T.	m	5M
119	386/12	18.11.2012	Campania	Maltese	m	4M
120	392/13	31.12.2012	Emilia-Romagna	Corso	m	7M
121	397/13	13.01.2013	Emilia-Romagna	Setter inglese	f	7M
122	509/13	12.06.2013	Emilia-Romagna	Labrador	m	2M
123	517/13	05.07.2013	Emilia-Romagna	Chihuahua	m	2M
124	538/13	26.08.2013	Emilia-Romagna	C.P.M.A.	m	2A
125	545/13	2013	Spagna	M.S.	f	3M

126	546/13	2013	Spagna	M.S.	f	3M
127	547/13	2013	Spagna	Alano	m	2M
128	548/13	2013	Spagna	Beagle	m	2M
129	549/13	2013	Spagna	Barbone nano	m	1,5A
130	550/13	2013	Spagna	Meticcio	f	5M
131	551/13	2013	Spagna	Levriero	f	3M
132	552/13	2013	Spagna	Levriero	f	3M
133	553/13	2013	Spagna	Levriero	f	3M
134	554/13	2013	Spagna	Levriero	f	3M
135	555/13	2013	Spagna	Labrador	m	5M
136	556/13	2013	Spagna	M.S.	f	10M
137	557/13	2013	Spagna	M.T.	m	5M
138	558/13	2013	Spagna	Meticcio	m	3M
139	570/13	07.11.2013	Emilia-Romagna	Shih-tzu	f	6M
140	577/14	29.12.2013	Emilia-Romagna	A.P.B.T.	f	5M
141	595/14	02.01.2014	Emilia-Romagna	Meticcio	m	6A
142	596/14	30.01.2014	Emilia-Romagna	P.T.	f	8A
143	608/14	28.02.2014	Emilia-Romagna	Setter inglese	m	3M
144	673/14	21.05.2016	Emilia-Romagna	Maltese	m	2M
145	791/14	03.11.2014	Emilia-Romagna	Pinscher	f	3M
146	1149/15	06.11.2015	Emilia-Romagna	Dobermann	m	2M
147	1151/15	20.11.2015	Emilia-Romagna	Meticcio	f	3M
148	1154/15	01.12.2015	Emilia-Romagna	Bulldog	f	3M
149	1203/16	17.02.2016	Emilia-Romagna	Meticcio	m	6M
150	1244/16	21.04.2016	Emilia-Romagna	Meticcio	m	4M
151	1247/16	24.04.2016	Emilia-Romagna	C.P.M.A.	m	2M
152	1251/16	28.04.2016	Toscana	Meticcio	m	3M
153	1305/16	30.06.2016	Emilia-Romagna	Meticcio	f	9M
154	1367/16	20.08.2016	Emilia-Romagna	Bulldog	f	2M
155	1378/16	28.09.2016	Toscana	Bloodhound	m	4M
156	1410/16	31.10.2016	Emilia-Romagna	Meticcio	m	6M
157	1418/16	16.11.2016	Emilia-Romagna	Meticcio	f	2M
158	847/17	01.06.2017	Emilia-Romagna	E.B.	m	3M
159	848/17	21.04.2017	Emilia-Romagna	Meticcio	f	2M

160	850/17	09.08.2017	Emilia-Romagna	P.T.	m	3M
161	851/17	14.08.2017	Emilia-Romagna	A.S.T	m	4M
162	934/17	03.09.2017	Emilia-Romagna	J.R.T.	m	3M

**Tabella 2.5:** *Cani positivi per CPV-2 inclusi nello studio. (m: maschio; f: femmina; M: mesi; A: anni; N.D: non disponibile; Y.T: Yorkshire terrier; L.C: Lupo cecoslovacco; C.K.C.S: Cavalier King Charles Spaniel; J.R.T: Jack Russell terrier; W.H.W.T: West Highland white terrier; B.B: bovaro del bernese; E.B: Epagneul Breton; A.S.T: American Staffordshire terrier; C.P.M.A: Cane da pastore maremmano abruzzese; M.S: Mastino spagnolo; A.P.B.T: American Pit Bull Terrier; M.T: Manchester terrier)*

L'estrazione del DNA dalle feci e dai tamponi rettali era avvenuta mediante varie metodiche che sono state impiegate presso in laboratorio nel corso degli anni, dal metodo della bollitura ai moderni kit commerciali a colonnine.

La ricerca del DNA del CPV-2 era stata effettuata utilizzando una metodica di PCR convenzionale basata su una coppia di primer (VP2\_2684-2705\_For 5'-ACC AAC TAA AAG AAG TAA ACC A-3' e VP2\_4544-4570\_Rev 5'-GTA ATA AAC ATA AAA ACA TAG TAA GTA-3') che è in grado di amplificare l'intero gene VP2, producendo ampliconi di circa 1800 paia di basi. Le reazioni sono state effettuate con i diversi kit di reagenti e termociclatori in uso presso l'INFLAB tra il 1994 ed il 2017.

Il ciclo termico impiegato per la reazione di PCR è invece rimasto invariato ed è riportato nella **Tabella 2.6**. I campioni erano stati considerati positivi a seguito della visualizzazione ai raggi UV di bande delle dimensioni attese su gel di agarosio colorato con bromuro di etidio dopo corsa elettroforetica.

Ciclo di reazione		
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	94 °C	5 min
Denaturazione	94 °C	30 sec
Annealing	50 °C	2 min
Estensione	72 °C	2,20 min
Estensione finale	72 °C	10 min

**Tabella 2.6:** *Ciclo di amplificazione riferito alla PCR convenzionale basata sui primer VP2\_2684-2705\_For e VP2\_4544-4570\_Rev 5' utilizzata per rilevare il DNA del Protovirus dei carnivori 1.*

#### *2.4.2.3 Cani: ricerca del DNA di CanineCV*

Tutti gli estratti di DNA dei cani inclusi nello studio sono stati sottoposti ad uno screening per la ricerca del DNA di CanineCV mediante un saggio di SYBR Green Real-Time PCR, le cui caratteristiche e messa a punto sono riportate nel paragrafo 2.3 (Studio 1: messa a punto di un saggio di SYBR Green Real-Time PCR specifico per CanineCV) della presente tesi.

In ogni reazione sono stati testati in duplicato: i campioni ignoti, 8 diluizioni seriali in base 10 (da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^1$ ) dello standard plasmidico ed un no-template control costituito dalla mix di reazione più acqua ultrapura. I campioni sono stati considerati positivi se, in entrambi i replicati, la curva di fluorescenza registrata durante la reazione mostrava un incremento esponenziale corrispondente ad una quantità di DNA target di partenza superiore al LOD (quantificata mediante la curva standard ottenuta per ogni reazione con le 8 diluizioni dello standard plasmidico), se la curva di melting era caratterizzata da un picco specifico ( $93,5 \pm 0,3$  °C) e se nessuna amplificazione era evidente nel no-template control.

#### *2.4.2.4 Cani: analisi della sopravvivenza, tempo di ricovero e variabili clinico-patologiche*

I cani sono stati quindi divisi in due gruppi sulla base del fatto che fossero positivi solo per CPV-2 (gruppo CPV-2) oppure per CPV-2 e CanineCV (CPV-2 + CanineCV). I dati inerenti ai giorni di ricovero, alla sopravvivenza ed ai parametri clinico-patologici dei cani inclusi nei due gruppi sono stati quindi confrontati. Tali dati sono stati ricavati dal software gestionale FENICE® in uso presso il DIMEVET dal 2005, di conseguenza non erano disponibili per i cani campionati in anni antecedenti.

Le informazioni sulla sopravvivenza e sui giorni di recupero erano disponibili solo per i soggetti afferiti e ricoverati presso l'Ospedale Veterinario Universitario (OVU) "Giuseppe Gentile" (precedentemente Ospedale Didattico Veterinario) del DIMEVET.

I parametri clino patologici valutati per i cani inclusi nello studio sono stati: eritrociti/mm<sup>3</sup>, valore ematocrito (%), emoglobina totale (g%), piastrine/mm<sup>3</sup>, leucociti totali/mm<sup>3</sup>, eosinofili/mm<sup>3</sup>, neutrofili/mm<sup>3</sup>, linfociti/mm<sup>3</sup>, monociti/mm<sup>3</sup>, basofili/mm<sup>3</sup>, aspartato aminotransferasi (U/L), alanina aminotransferasi (U/L), creatinina (mg/dl), urea (mg/dl), proteine totali (g/dl), albumina (g/dl), rapporto albumine/globuline (A/G),

bilirubina totale (mg/dl) e proteina C-reattiva (mg/dl). Tutte le misurazioni erano state effettuate presso il laboratorio del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB, precedentemente SEPAC VET) del DIMEVET.

I dati ottenuti sono stati analizzati attraverso statistica descrittiva, ed espressi come mediana e range (valore minimo e massimo). Le variabili oggetto di studio sono state confrontate tra i due gruppi mediante statistica non parametrica (Kruskall Wallis ANOVA). La sopravvivenza tra i due gruppi è stata confrontata utilizzando il test chi-quadrato. Per tutte le analisi effettuate i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di  $P < 0,05$ . I dati sono stati elaborati utilizzando il software MedCalc Statistical Software versione 15.6.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2015).

#### *2.4.2.5 Volpi: popolazione di studio*

Gli estratti di DNA di 32 volpi rosse erano stati ottenuti in occasione di un precedente studio sull'adenovirus canino (Balboni et al., 2013). Le volpi erano state abbattute in provincia di Pisa in due differenti periodi della regolare stagione di caccia 2011: 15 a febbraio e 17 ad ottobre. Dalle 15 volpi abbattute in febbraio erano stati collezionati soltanto campioni fecali, mentre da quelle abbattute ad ottobre anche campioni di milza e fegato. La data ed il luogo di abbattimento, il peso e l'età sono state annotate per ogni volpe e sono riportate nella **Tabella 2.7**. L'età delle volpi è stata determinata sulla base del peso del cristallino (Cavallini e Santini, 1995). Ai fini dello studio sull'adenovirus canino tutte le volpi erano state sottoposte ad un esame post-mortem e, con l'eccezione dei soggetti 113-7 e 113-13 affetti da rogna sarcoptica, tutte erano risultate in buona salute. Il DNA è stato estratto dalle varie matrici mediante il NucleoSpin Tissue Mini Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germania) secondo le istruzioni fornite dal produttore e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *2.4.2.6 Volpi: ricerca del DNA di CanineCV*

La ricerca del CanineCV negli estratti di DNA delle volpi rosse è stata effettuato con le stesse modalità descritte per i cani (vedi paragrafo 2.4.1.3).

<b>Volpe</b>	<b>Data e luogo di abbattimento</b>	<b>Sesso</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Età (anni)</b>	<b>Matrici</b>	
09-1	02/02/2011	Coltano	m	4.1	>1	F
09-2	03/02/2011	Coltano	f	3.5	<1	F
09-3	04/02/2011	Coltano	f	4.2	>1	F
09-4	04/02/2011	Coltano	f	3.7	<1	F
09-5	04/02/2011	Coltano	f	4.5	>1	F
09-6	04/02/2011	Coltano	m	4.7	>1	F
09-7	04/02/2011	Coltano	f	3.8	<1	F
09-8	08/02/2011	San Miniato	m	6.4	>1	F
09-9	08/02/2011	San Miniato	f	5.2	>1	F
09-10	08/02/2011	San Miniato	f	5.3	>1	F
09-11	08/02/2011	San Miniato	m	4.3	<1	F
09-12	08/02/2011	San Miniato	m	4.7	<1	F
09-13	08/02/2011	San Miniato	f	6.1	>1	F
09-15	15/02/2011	Coltano	m	4.7	<1	F
09-16	15/02/2011	Coltano	m	4.9	<1	F
113-1	01/10/2011	Coltano	f	4.6	<1	F, L, K
113-2	01/10/2011	Coltano	m	7.6	>1	F, L, K
113-3	01/10/2011	Coltano	f	4.7	<1	F, L, K
113-4	01/10/2011	San Frediano	f	5.3	>1	F, L, K
113-5	01/10/2011	San Frediano	f	4.4	>1	F, L, K
113-6	01/10/2011	San Frediano	f	5	>1	F, L, K
113-7	01/10/2011	San Frediano	f	4.1	<1	F, L, K
113-8	01/10/2011	San Frediano	m	6.2	>1	F, L, K
113-9	01/10/2011	San Frediano	f	4.8	<1	F, L, K
113-10	01/10/2011	Coltano	m	8.1	>1	F, L, K
113-11	01/10/2011	Coltano	f	4.1	<1	F, L, K
113-12	01/10/2011	Coltano	m	7.2	>1	F, L, K
113-13	01/10/2011	Coltano	f	3.8	<1	F, L, K
113-14	01/10/2011	Coltano	m	7	>1	F, L, K
113-15	01/10/2011	Coltano	f	4.7	<1	F, L, K
113-17	01/10/2011	Coltano	f	5.1	>1	F, L, K
113-19	01/10/2011	Coltano	m	5.2	<1	F, L, K

**Tabella 2.7:** Volpi rosse testate in questo studio (m: maschio; f: femmina; F: feci; L: fegato; K: rene)

#### 2.4.2.7 Amplificazione e sequenziamento dei circovirus identificati

Gli estratti di DNA risultati positivi al saggio di SYBR Green Real-Time PCR sono stati sottoposti ad amplificazione mediante 2 diverse PCR convenzionali.

Una delle due PCR amplificava un tratto corrispondente alla quasi totalità del genoma del CanineCV (1931 su 2063 nt), con l'eccezione della regione altamente conservata compresa tra le estremità 3' dei due ORF principali, utilizzando i primer CanineCV-1020-1040-For e CanineCV-909-931-Rev. Le sequenze nucleotidiche di tali primer erano state ottenute mediante reverse-complement delle sequenze dei primer impiegati nel saggio di SYBR Green Real-Time PCR (qCanineCV-For e qCanineCV-Rev).

Per amplificare la regione compresa tra le estremità 3' dei due ORF principali è stata usata una PCR basata sui primer CanineCV-3'-3'-For e CanineCV-3'-3'-R, disegnati sulle sequenze di referenza depositate presso GenBank.

I cicli di amplificazione delle due PCR sono stati impostati sulla base delle temperature di melting delle 2 coppie di primer predette attraverso l'interfaccia web di Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e sulle istruzioni fornite dal produttore del kit di amplificazione utilizzato.

Le caratteristiche principali dei primer sono riportate nella **Tabella 2.8**.

Le reazioni sono state effettuate utilizzando il HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germania) ed il termociclatore SimpliAmp Thermal Cycler (Waltham, Massachusetts, Stati Uniti). Le mix di reazione ed i cicli di amplificazione sono riportati nelle **Tabelle 2.9 e 2.10**.

Per verificare la presenza dei frammenti delle dimensioni attese, i prodotti delle reazioni (5 µl ciascuno) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% addizionato con bromuro di etidio in buffer TAE standard e visualizzati mediante raggi UV.

I prodotti della seconda PCR sono stati successivamente purificati mediante il kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) secondo le istruzioni fornite dal produttore e sequenziati. Le sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR purificati sono state ottenute con tutti e 4 i primer utilizzati per l'amplificazione. Lo strumento ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer (Applied Biosystem, CA, USA) è stato utilizzato per il sequenziamento.

Primer	Sequenza primer 5'-3'	Posizione <sup>a</sup>	Amplicone
CanineCV-1020-1040-For	CGTTTACCTGTTACACCCCCT	1020-1040	1931
CanineCV-909-931-Rev	AGCGAGAGGCCTTTATCTTTCAG	909-931	
CanineCV-3'-3'-For	ATGGTGGGATGGCTACGATG	606-625	936
CanineCV-3'-3'-Rev	CAAGGAAGAGGGAATGCTACAAG	1519-1541	

**Tabella 2.8:** Primer impiegati in questo studio per le due PCR convenzionali utilizzate per amplificare il genoma del CanineCV.

Mix di reazione			
Reagente	C. iniziale	Volume	C. finale
Buffer	5X	10 µl	1X
Qsolution	5X	10 µl	1X
CanineCV-1020-1040-For	20 µM	2,5 µl	1 µM
CanineCV-909-931-Rev	20 µM	2,5 µl	1 µM
Enzima High-Fidelity	2,5 unità/µl	1 µl	2,5 unità/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	19 µl	-
DNA templatato	-	5 µl	-
Volume finale		50 µl	

Ciclo di reazione		
Fase del ciclo	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	95 °C	5 min
Denaturazione	94 °C	1 min
Annealing	60 °C	2 min
Estensione	72 °C	2,30 min
Estensione finale	72 °C	10 min

**Tabella 2.9:** Mix e ciclo di reazione riferiti alla PCR convenzionale basata sui primer CanineCV-1020-1040-For e CanineCV-909-931-Rev. (C.: concentrazione)

<b>Mix di reazione</b>			
<b>Reagente</b>	<b>C. iniziale</b>	<b>Volume</b>	<b>C. finale</b>
Buffer	5X	10 $\mu$ l	1X
Qsolution	5X	10 $\mu$ l	1X
CanineCV-3'-3'-For	20 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
CanineCV-3'-3'-Rev	20 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Enzima High-Fidelity	2,5 unità/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	2,5 unità/reazione
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	19 $\mu$ l	-
DNA templatato	-	5 $\mu$ l	-
Volume finale		50 $\mu$ l	

<b>Ciclo di reazione</b>		
<b>Fase del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Denaturazione iniziale	95 °C	5 min
Denaturazione	94 °C	30 sec
Annealing	56 °C	1 min
Estensione	72 °C	1 min
Estensione finale	72 °C	10 min

**Tabella 2.10:** Mix e ciclo di reazione riferiti alla PCR convenzionale basata sui primer CanineCV-3'-3'-For e CanineCV-3'-3'-Rev. (C.: concentrazione)

#### 2.4.2.8 Rolling Circle Amplification

Gli estratti risultati positivi al saggio di Real-Time PCR ma negativi alle PCR convenzionali sono stati sottoposti a rolling circle amplification (RCA) mediante il kit Illustra TempliPhi 100 Amplification (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Regno Unito) secondo le istruzioni fornite dal produttore. La RCA sfrutta una reazione enzimatica isotermica per amplificare molecole di DNA circolari ed in questo studio è stata utilizzata per aumentare la quantità di DNA di CanineCV presente negli estratti. I prodotti della reazione di RCA sono stati quindi amplificati mediante PCR convenzionali come riportato al paragrafo 2.4.2.7.

#### *2.4.2.9 Analisi bioinformatiche*

Le sequenze ottenute sono state assemblate mediante il software BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5. (Hall, 1999) e allineate con tutte le sequenze nucleotidiche di CanineCV complete dei due ORF principali depositate presso il database GenBank (Numeri di accesso delle sequenze utilizzate: MG737386; MG737385; MG737384; MG737383; MG737382; MG737381; MG737380; MG737379; MG737378; MF797786; MG266899; KF887949; JQ821392; NC\_020904; MF457592; KT734828; KT734827; KT734826.1; KT734825; KT734824; KT734823; KT734822; KT734821; KT734820; KT734819; KT734818; KT734817; KT734816; KT734815; KT734814; KT734813; KT734812; KT946839; KT283604; KJ530972; KC241984; KC241983; KC241982; KP260927; KP260926; KP260925; KP941114). L'allineamento è stato effettuato mediante l'algoritmo ClustalW implementato nel software BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5. Lo stesso software è stato utilizzato per il calcolo del grado di similarità nucleotidica tra le sequenze ottenute in questo studio e le sequenze di referenza. Il grado di similarità nucleotidica è stato inoltre calcolato per le sequenze ottenute in questo studio tra di loro.

L'analisi filogenetica è stata eseguita con il software MEGA versione 6.06 (Tamura et al., 2013) utilizzando il metodo di massima verosimiglianza (maximum likelihood, ML) Mediante l'apposita funzione implementata nel software MEGA i seguenti modelli di sostituzione nucleotidica sono risultati i più adeguati per il set di sequenze ottenute: General Time Reversible (Tavarè, 1986), TN93 (Tamura e Nei, 1993) e Tamura 3-parametri (Tamura, 1992). I valori di bootstrap, che permettono di valutare il livello di confidenza di ogni ramo dell'albero ottenuto, sono stati ottenuti ripetendo per 1.000 volte l'elaborazione dei dati.

### 2.4.3 Risultati

#### 2.4.3.1 Cani: popolazioni di studio e ricerca del DNA di CanineCV mediante SYBR Green Real-Time PCR

A causa del carattere retrospettivo dello studio, non tutti i dati erano disponibili per ogni cane, pertanto l'analisi statistica descrittiva della popolazione è stata effettuata su di un numero limitato di soggetti.

I 162 cani inclusi nello studio presentavano un'età mediana di 3 mesi (range 1 mese - 10 anni), 40 erano maschi (51%) e 38 femmine (49%). Il 67% (64/85) dei soggetti era di razza, mentre il 33% (21/85) erano meticci.

Sette dei 162 (4,3%) cani testati sono risultati positivi per CanineCV (**Tabella 2.11**), con quantità di DNA virale comprese tra le  $7 \times 10^0$  e le  $2 \times 10^5$  copie per microlitro di estratto. Tutti i sette cani risultati positivi provenivano dell'Emilia-Romagna e avevano un'età compresa tra i 2 e gli 11 mesi. Dal punto di vista temporale il campione positivo più vecchio risaliva al 2009.

CANE	DATA	PROVENIENZA	RAZZA	SESSO	ETÀ	COPIE DNA
800/09	23.07.09	Emilia-Romagna	J.R.T	f	11M	15
115/10	27.01.10	Emilia-Romagna	W.H.W.T	m	4M	$1,7 \times 10^5$
540/10	16.06.10	Emilia-Romagna	Maltese	f	2M	13
517/13	05.07.13	Emilia-Romagna	Chihuahua	m	2M	7
570/13	07.11.13	Emilia-Romagna	Shih-tzu	f	6M	$3,5 \times 10^3$
1203/16	17.02.16	Emilia-Romagna	Meticcio	m	6M	$3,7 \times 10^3$
1367/16	20.08.16	Emilia-Romagna	Bulldog	f	2M	$2 \times 10^5$

**Tabella 2.11:** Cani risultati positivi alla Real-Time PCR per CanineCV (m: maschi; f: femmine; M: mesi; J.R.T: Jack russel terrier; W.H.W.T: West Highland white terrier)

#### 2.4.3.2 Cani: analisi statistica delle variabili cliniche e clinico-patologiche

I dati delle variabili cliniche e clinico-patologiche non erano disponibili per tutti i cani inclusi nello studio e nessun dato era disponibile per i soggetti campionati prima del 2005, pertanto la numerosità campionaria variava a seconda della variabile considerata.

Il confronto tra i dati delle variabili clinico-patologiche e dei giorni di ricovero è riassunto nella **Tabella 2.12** e non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi.

Anche la mortalità non è risultata significativamente diversa tra i cani positivi per CPV-2 e quelli positivi per CPV-2 e CanineCV. Dei 59 cani positivi per CPV-2 ne sono morti 8, mentre dei 7 positivi per entrambi i virus 4 sono sopravvissuti, 2 deceduti e per uno non è stato possibile risalire alle informazioni riguardanti il decorso clinico.

Parametro	I.R.	CPV-2			CPV-2 + CanineCV			P
		N	Mediana	Range	N	Mediana	Range	
Ematocrito (%)	37-55	57	38,8	18 – 73,3	5	42,4	35,8 – 60	0,28
Emoglobina (%)	12-18	58	12,8	6,4 – 26,9	5	15,7	11,9 – 20,3	0,16
Eritrociti (/mm <sup>3</sup> )	5500000-8500000	58	5700000	157420 – 8650000	4	6350000	5400000 – 8980000	0,27
Piastrine (/mm <sup>3</sup> )	60000-500000	58	291000	1940 – 947000	5	297000	179000 – 400000	0,77
Leucociti (/mm <sup>3</sup> )	6000-17000	58	4360	133 – 40400	5	1600	360 – 10320	0,17
Linfociti (/mm <sup>3</sup> )	1000-4000	50	907	62 – 8250	5	976	220 – 2260	0,65
Neutrofili (/mm <sup>3</sup> )	3000-12000	50	5678	17 – 33128	5	224	100 – 7450	0,13
Eosinofili (/mm <sup>3</sup> )	0-750	40	65	10 – 635	4	65	10 – 128	0,55
Monociti (/mm <sup>3</sup> )	100-1400	48	290	10 – 6868	5	60	20 – 410	0,09
Basofili (/mm <sup>3</sup> )	0-180	37	20	0 – 320	3	40	40 – 100	0,16
Creatinina (mg/dl)	0,65-1,35	52	0,47	0,25 – 2,64	5	0,52	0,34 – 1,87	0,58
Urea (mg/dl)	18-55	52	25,2	11,23 – 132,3	5	30,9	21,66 – 111,1	0,20
ALT (U/L)	20-55	52	30	14 – 1610	5	32	17 – 10	0,93
AST (U/L)	20-42	52	52	14 – 298	5	46	9 – 68	0,34
Bilirubina (mg/dl)	0,07-0,34	47	0,14	0,05 – 1,45	2	0,175	0,12 – 0,23	0,93
Proteine Tot (g/dl)	5,60-7,90	52	5,155	3,52 – 8,03	5	4,94	3,99 – 7,58	0,74
Albumine (g/dl)	2,80-3,70	52	2,355	1,37 – 3,46	5	2,13	1,61 – 3,01	0,62
A/G	0,60-1,30	52	0,85	0,29 – 1,23	5	0,72	0,66 – 0,9	0,15
CRP (mg/dl)	0-0,5	23	7,3	1,54 – 31,84	3	9,13	8,94 – 11	0,06
Giorni di ricovero	/	51	6	2 – 33	5	7	5 – 14	0,37

**Tabella 2.12:** parametri clinico patologici e durata del ricovero nei due gruppi (CPV-2 e CPV-2+CanineCV) espressi come mediana e range; l'unità di misura di ciascuna variabile è indicata tra parentesi. Le differenze sono state considerate significative per valori di  $P \leq 0,05$ . (I.R.: intervallo di riferimento; N: numerosità campionaria; P: significatività statistica; ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi; A/G: rapporto albumina/gammaglobuline; CRP: proteina C-reattiva).

#### *2.4.3.3 Volpi: popolazione di studio*

Delle 32 volpi rosse incluse nello studio 13 (40,6%) erano maschi e 19 (59,4%) femmine, 17 (53%) avevano un'età superiore all'anno mentre le restanti 15 (47%) avevano un'età inferiore. Gli animali presentavano un peso mediano di 4,7 Kg, con un range compreso tra 3,5 ed 8,1 Kg.

#### *2.4.3.4 Volpi: ricerca del DNA di CanineCV mediante SYBR Green Real-Time PCR*

Il DNA del CanineCV è stato rilevato in una volpe rossa su 32 testate (3,2%). Il soggetto risultato positivo (volpe 09-10) era una femmina del peso di 5,3 Kg di età superiore ad un anno, per la quale gli approfondimenti anatomo-patologici condotti al momento del campionamento non avevano evidenziato alcun processo patologico in atto. La quantità di DNA rilevata nell'estratto ottenuto dal campione fecale (campioni di rene e milza non erano stati prelevati per questo soggetto) era di  $2 \times 10^2$  copie.

#### *2.4.3.5 Amplificazione e sequenziamento*

Per ottenere gli ampliconi da sequenziare, gli estratti di DNA dei 7 cani e della volpe risultati positivi al saggio di Real-Time PCR sono stati amplificati mediante le due PCR end-point precedentemente descritte. I campioni N° 115/10, 570/13, 1203/16 e 1367/16 sono risultati positivi ad entrambi i saggi di PCR, mentre i campioni N° 800/09, 540/10, 517/13 e 09-10 sono risultati negativi. Al fine di aumentare la quantità di DNA circolare, i campioni risultati negativi sono stati sottoposti a RCA e quindi nuovamente amplificati mediante le PCR end-point. Le PCR effettuate sui prodotti di RCA sono risultate positive per i campioni 800/09, 540/10 e 09-10, mentre il campione 517/13 si è confermato negativo.

I prodotti delle due PCR risultati positivi sono stati quindi purificati e sequenziati.

L'assemblaggio delle sequenze nucleotidiche dei due ampliconi prodotti con le PCR end-point ha permesso di ottenere le sequenze genomiche parziali dei circovirus rilevati nei campioni 800/09, 115/10, 540/10, 570/13, 1203/16, 1367/16 e 19-10. Il campione 517/13 è risultato sempre negativo alle PCR end-point e di conseguenza non è stato possibile sequenziarlo.

I risultati delle PCR end-point e le sequenze nucleotidiche ottenute sono riassunte nella

#### **Tabella 2.13**

Campione	Copie DNA	PCR end-point	RCA	PCR post-RCA	Sequenza nucleotidica
800/09	15	Negativo	Si	Positivo	1879 nt
115/10	1,7 x 10 <sup>5</sup>	Positivo	No	/	1989 nt
540/10	13	Negativo	Si	Positivo	1991 nt
517/13	7	Negativo	Si	Negativo	/
570/13	3,5 x 10 <sup>3</sup>	Positivo	No	/	1930 nt
1203/16	3,7 x 10 <sup>3</sup>	Positivo	No	/	1787 nt
1367/16	2 x 10 <sup>5</sup>	Positivo	No	/	1978 nt
09-10	2 x 10 <sup>2</sup>	Negativo	No	Positivo	2001 nt

**Tabella 2.13:** risultati delle PCR end-point sugli estratti tal quale (colonna PCR end-point) e sui prodotti della reazione di RCA (colonna PCR post-RCA). Sono inoltre indicate le copie di DNA di CanineCV quantificate mediante Real-Time PCR (Copie DNA), le sequenze nucleotidiche di CanineCV e le relative lunghezze espresse in nucleotidi (nt).

#### 2.4.3.6 Risultati analisi bioinformatiche

Le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio mostravano un'identità superiore all'80% con le sequenze di CanineCV depositate presso il database di GenBank (**Tabella 2.14**), confermando l'appartenenza di tutti i virus identificati alla specie CanineCV.

La sequenza nucleotidica 800/09 e 115/10 mostrava la massima similarità con sequenze di CanineCV ottenute in Italia da cani e lupi, mentre la 540/10 con una sequenza ottenuta da un cane in Germania. Le sequenze 570/13 e 1203/16 erano invece più simili a due CanineCV rilevati in altrettanti cani in Italia e negli Stati Uniti d'America. Il CanineCV 1367/16 aveva il massimo grado di similarità con uno ottenuto da un cane in Italia. La sequenza 09-10, l'unica ottenuta da una volpe rossa in questo studio, presentava il massimo grado di similarità con tre sequenze ottenute da cani in Thailandia. Tutti i CanineCV sequenziati nel presente studio mostravano il minimo grado di similarità con la sequenza nucleotidica di un CanineCV ottenuto da una volpe rossa nel Regno Unito.

Il grado di similarità nucleotidica delle sequenze di CanineCV ottenute in questo studio tra di loro è riportata nella **Tabella 2.15**.

Sequenza	Posizione <sup>a</sup>	Similarità max <sup>b</sup>	Similarità min <sup>b</sup>
800/09	1 – 1879 nt	98,8% (KT734827, KT734815)	83,1% (KP260925)
115/10	1 – 1989 nt	97,7% (KT734823, KT734826, KT734828, KT734812)	83,6% (KP260925)
540/10	1 – 1991 nt	98% (KF887949)	83,1% (KP260925)
570/13	1 – 1930 nt	93,4% (KJ530972, KC241984)	83,3% (KP260925)
1203/16	75 – 1861 nt	92,8% (KJ530972, KC241984)	82,9% (KP260925)
1367/16	1 – 1978 nt	96,2% (KJ530972)	83,3% (KP260925)
09-10	1 – 2001 nt	96% (MG737383, MG737382, MG737378)	84,8% (KP260925)

**Tabella 2:** Sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute in questo studio e confronto con le sequenze di referenza. <sup>a</sup>(Posizione nucleotidica della sequenza ottenuta rispetto alla sequenza di referenza JQ821392), <sup>b</sup>(percentuale di similarità nucleotidica massima con le sequenze di referenza depositate presso il database di GenBank, le sequenze di referenza che hanno generato il valore sono indicate tra parentesi) <sup>c</sup>(percentuale di similarità nucleotidica minima con le sequenze di referenza depositate presso il database di GenBank, le sequenze di referenza che hanno generato il valore sono indicate tra parentesi)

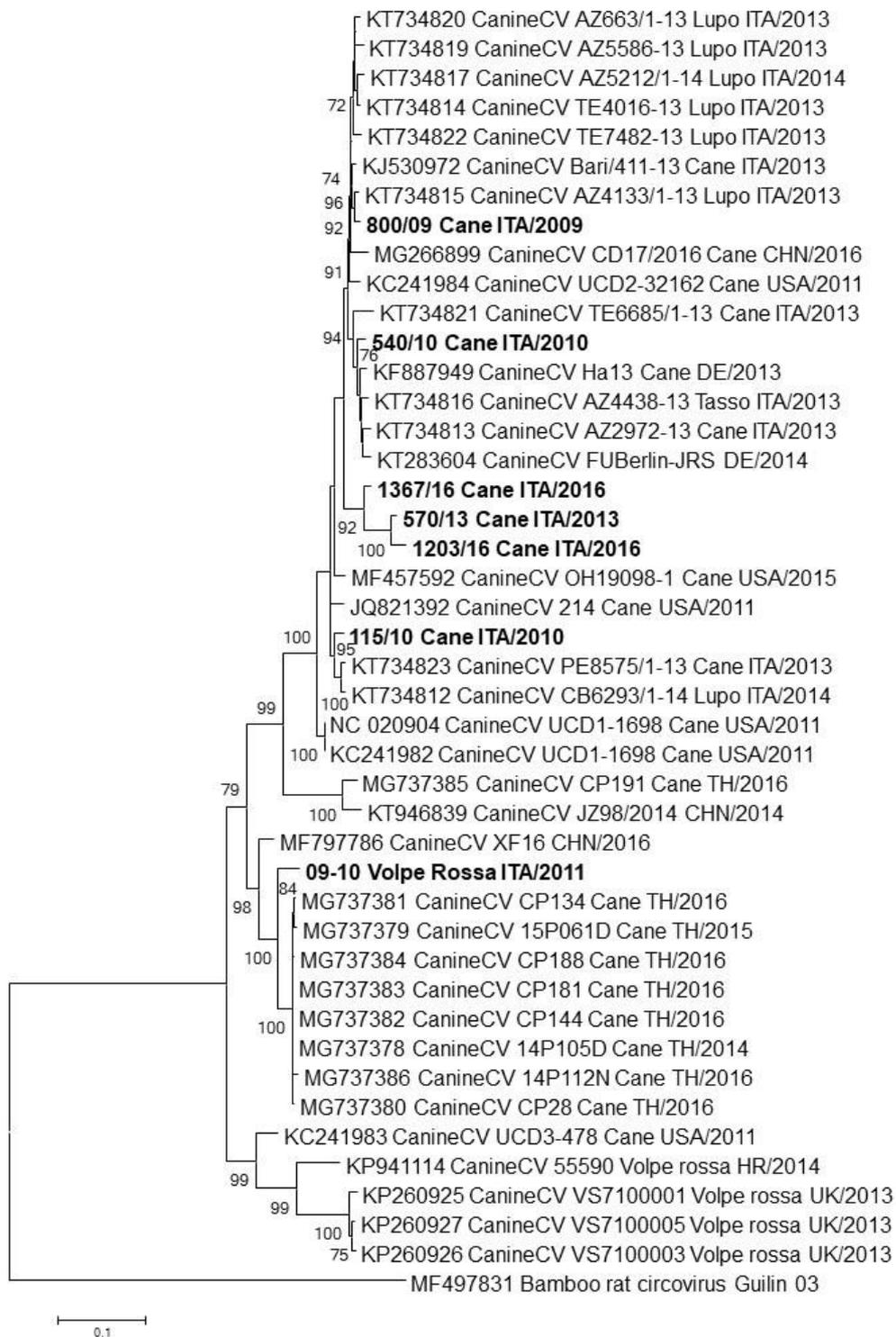
Sequenza	Similarità max <sup>b</sup>	Similarità min <sup>b</sup>
800/09	97% (540/10)	86,2% (09-10)
115/10	95,9% (540/10, 800/09)	86,9% (09-10)
540/10	97% (800/09)	86,2% (09-10)
570/13	97,8% (1203/16)	86,8% (09-10)
1203/16	97,8% (570/13)	86% (09-10)
1367/16	95,8% (800/09, 570/13)	86,3% (09-10)
09-10	86,9% (115/10)	86,2% (800/09, 540/10)

**Tabella 2.15:** tabella riassuntiva del grado di similarità nucleotidica tra le sequenze di CanineCV ottenute in questo studio. La similarità è riportata in percentuale rispetto alle sequenze poste tra parentesi. <sup>a</sup>(Valore di similarità massimo) <sup>b</sup>(Valore di similarità minimo).

Le relazioni filogenetiche dei CanineCV ottenuti in questo studio con quelli depositati presso il database di GenBank sono indicate nell'albero riportato nella **Figura 2.9**.

L'albero è stato ottenuto con il metodo della massima verosimiglianza (ML) ed usando il General Time Reversible come modello di sostituzione nucleotidica. La topologia dell'albero ottenuto è stata confermata anche con l'utilizzo dei modelli TN93 e Tamura 3-parametri.

L'analisi filogenetica ha evidenziato l'esistenza di due cluster principali, in uno si raggruppavano la maggior parte delle sequenze di CanineCV, mentre nell'altro le uniche 4 sequenze di CanineCV ricavate da volpi rosse ad oggi depositate presso il database di GenBank più la sequenza canina UCD3-478. Tutte le sequenze di CanineCV ottenute in questo studio appartenevano al primo cluster. La sequenza 09-10, originata da una volpe rossa, non clusterizzava con le altre sequenze ricavate dalla medesima specie, bensì formava un ramo monofiletico strettamente correlato a 8 sequenze nucleotidiche ricavate da cani in Thailandia.



**Figura 2.9:** Albero filogenetico costruito con le sequenze nucleotidiche ottenute in questo studio e sequenze di referenza dotate dei due ORF principali. Per ogni sequenza è indicato il numero di accesso GenBank, la specie ospite, il paese e l'anno in cui è stata ottenuta. Le sequenze generate in questo studio sono riportate in grassetto. La sequenza MF497831, appartenente ad un circovirus dei roditori è stata usata come outgroup. L'albero è stato costruito con il metodo della massima verosimiglianza ed usando il General Time Reversible come modello di sostituzione nucleotidica.

#### **2.4.4 Discussione**

Il CanineCV è stato descritto per la prima volta nel 2012 in cani la cui storia clinica era sconosciuta ed un anno più tardi è stato rilevato nel fegato di un cane con gastroenterite emorragica, vasculite e linfadenite granulomatosa (Kapoor et al., 2012; Li et al., 2013a). Da quella prima descrizione dell'associazione tra il CanineCV e lo sviluppo di processi patologici, numerosi studi hanno indagato il potenziale patogeno del virus nella specie canina, in particolare come possibile causa di sindromi gastroenteriche. Tali studi sono però giunti a conclusioni discordanti, senza rilevare univocamente un'associazione statisticamente significativa tra il virus e la presenza di sintomatologia gastroenterica (Li et al., 2013a; Hsu et al., 2016; Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017; Gentil et al., 2017). Due di questi studi hanno tuttavia rilevato una prevalenza più alta dell'infezione da CanineCV in soggetti infetti da CPV-2, suggerendo un possibile sinergismo tra i due virus (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017). E' stata inoltre rilevata una mortalità significativamente più alta nei soggetti positivi per CPV-2 e CanineCV rispetto a quelli positivi per il solo parvovirus (Anderson et al., 2017).

Nel presente studio, gli estratti di DNA di 162 cani risultati PCR positivi per CPV-2 sono stati testati mediante un saggio di Real-Time PCR in grado di rilevare il DNA del CanineCV ed i dati inerenti ad alcuni parametri clinico-patologici, ai giorni di ricovero ed alla percentuale di sopravvivenza sono stati confrontati tra i cani positivi solo per CPV-2 e quelli positivi per CPV-2 e CanineCV. Dei 162 cani testati, 7 sono risultati positivi per CanineCV, con una prevalenza del 4,3%. La quantità di DNA virale rilevata nei campioni variava da molto bassa (7 copie di DNA virale/ $\mu$ l), ad indicare una limitata replicazione virale nella mucosa intestinale oppure un passaggio nel lume intestinale senza replicazione attiva a quantità invece più alte (fino a  $2 \times 10^5$  copie di DNA virale/ $\mu$ l), suggestive di una intensa replicazione nella mucosa intestinale (Dowgier et al., 2017).

La percentuale di soggetti positivi per CanineCV riscontrata in questo studio è sensibilmente più bassa di quella rilevata in altri 2 studi analoghi, nei quali la percentuale dei cani contemporaneamente positivi per CPV-2 e CanineCV sfiorava il 13% (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017). Tale diversità potrebbe essere dovuta a differenze geografiche nella diffusione del CanineCV, in quanto la maggior parte dei soggetti testati nel presente lavoro provenivano dell'Emilia-Romagna, mentre gli altri due studi erano stati condotti uno in Germania (Anderson et al., 2017) e l'altro nell'Italia meridionale

(Dowgier et al., 2017). L'evenienza che il saggio molecolare impiegato nel presente studio fosse caratterizzato da sensibilità ed efficienza inferiori rispetto a quelli impiegati negli altri due studi appare invece remota, a causa delle ottime performance mostrate dalla metodica molecolare nella fase di messa a punto e riportate nel sotto-capitolo **2.3 Studio 1: messa a punto di un saggio di SYBR Green Real-Time PCR specifico per CanineCV**. Un'altra ipotesi è che la differenza di prevalenza riscontrata in questo studio rispetto ai due disponibili in letteratura possa essere riconducibile al periodo di campionamento. Nel presente studio, infatti, sono stati analizzati estratti di DNA ottenuti in un periodo di tempo molto vasto, compreso tra il 1994 ed il 2017, e nessuna positività antecedente all'anno 2009 è stata rilevata. Negli studi di Anderson e colleghi e di Dowgier e colleghi, invece, erano stati analizzati campioni più recenti, risalenti al massimo al 2006 (Anderson et al., 2017; Dowgier et al., 2017). E' quindi possibile che il CanineCV sia emerso nelle popolazioni canine solo in anni recenti, oppure che la sua circolazione sia aumentata nel corso degli ultimi 10 anni. Ulteriori studi condotti su vaste collezioni di campioni raccolti negli anni antecedenti al 2000 sarebbero necessari per verificare questa ipotesi.

L'analisi statistica non ha evidenziato nessuna differenza significativa tra i cani positivi per il solo CPV-2 rispetto a quelli positivi per CPV-2 e CanineCV in merito ai parametri clinico-patologici analizzati, alla durata del ricovero ed alla mortalità. Questi risultati non confermano l'ipotesi secondo la quale il CanineCV, attraverso un meccanismo di sinergismo con il CPV-2, aggraverebbe il decorso clinico della parvovirosi canina con conseguente aumento della mortalità (Anderson et al., 2017). Tuttavia, malgrado l'assenza di differenze statisticamente significative, i soggetti co-infetti presentavano una leucopenia più marcata rispetto a quelli positivi per il solo CPV-2, con valori mediani di leucociti totali, neutrofili e linfociti sensibilmente al di sotto dell'intervallo di riferimento, aspetto che potrebbe far pensare ad un maggiore consumo dei leucociti nei soggetti co-infetti, forse per un'aumentata probabilità di sviluppare infezioni batteriche secondarie (Schnelle e Barger, 2012). La limitata numerosità del gruppo dei soggetti positivi ad entrambi i virus potrebbe aver inficiato l'efficacia dell'analisi statistica e un'indagine su un numero più elevato di soggetti sarebbe necessaria per confermare o smentire definitivamente il ruolo del CanineCV come co-patogeno in corso di parvovirosi.

Pochi anni dopo la prima descrizione del CanineCV, il virus è stato rilevato anche nelle volpi rosse in UK e successivamente in Croazia (Bexton et al., 2015; Lojkic et al., 2016). In Italia la circolazione del CanineCV nelle volpi rosse non è stata confermata. Nell' unica indagine ad oggi disponibile in letteratura condotta in questa specie nel nostro paese, nessuna delle 24 volpi rosse testate per CanineCV mediante un saggio molecolare è risultata positiva (Zaccaria et al., 2016).

Nel presente studio, gli estratti di DNA ottenuti da feci e tessuti di 32 volpi rosse provenienti dalla Toscana in occasione di una precedente indagine (Balboni et al., 2013) sono stati testati mediante un saggio di SYBR Green Real-Time PCR avente come target una regione altamente conservata del genoma dei CanineCV. Delle 32 volpi rosse incluse in questa indagine una è risultata positiva per CanineCV, con una prevalenza del 3,2%. Del soggetto positivo era disponibile esclusivamente l'estratto di DNA ottenuto da un campione di feci e la quantità di virus rilevata era piuttosto bassa, corrispondente a  $2 \times 10^2$  copie per microlitro, di conseguenza non è stato possibile accertare se il virus avesse avuto una disseminazione sistemica né se stesse attivamente replicando nell'epitelio intestinale. Tuttavia, in base alla conoscenza dell'autore, il presente studio fornisce la prima evidenza della circolazione del CanineCV tra le volpi rosse presenti sul territorio italiano.

La prevalenza del 3,2% riscontrata nella presente indagine è sensibilmente più bassa di quella rilevata in uno studio condotto in UK sui sieri di 32 volpi rosse, in cui 20 animali risultarono positivi, con una prevalenza del 62,5% (Bexton et al., 2015). E' quindi possibile, anche alla luce dei risultati dello studio di Zaccaria e colleghi (2016), che la circolazione del CanineCV nelle volpi rosse sul territorio italiano sia più limitata rispetto ad altri paesi d'Europa.

L'analisi filogenetica condotta sulle sequenze nucleotidiche di CanineCV ottenute in questo studio unitamente a quelle depositate presso GenBank, ha confermato, con elevati valori di bootstrap, l'esistenza di due cluster principali, così come emerso da una precedente indagine condotta da Zaccaria e colleghi (2016). Il cluster più ampio era formato dalla maggior parte delle sequenze nucleotidiche ottenute da cani, mentre le sequenze ottenute da volpi rosse si disponevano in un cluster più piccolo assieme al CanineCV di origine canina UCD3-478. Il CanineCV ottenuto in questo studio dalla volpe rossa 09-10, mostrava valori di similarità nucleotidica più elevata con le sequenze

di origine canina, con le quali si disponeva nel primo cluster nell'albero filogenetico. Questo risultato suggerisce che i cani e le volpi condividano i medesimi circovirus, senza alcuna segregazione di specie ospite e che possano agire da fonte d'infezione l'uno per l'altro. Tuttavia, le informazioni in merito all'epidemiologia del CanineCV nelle volpi sono ancora carenti e ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio l'importanza dei contatti tra i canidi domestici e selvatici ai fini della trasmissione del virus.

## 2.5 Conclusioni

Il saggio SYBR Green Real-Time PCR messo a punto nello **Studio 1** potrebbe essere proficuamente utilizzato per scopi diagnostici e di sorveglianza epidemiologica, contribuendo a chiarire l'effettivo ruolo patogeno del virus nei canidi domestici e selvatici, nonché indagare il ruolo dei primi come fonte d'infezione nei confronti dei secondi, anche alla luce dell'evidenza che il CanineCV circoli anche tra le volpi rosse presenti sul territorio italiano (**Studio 2**).

## 2.6 Bibliografia

- Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft B., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Meehan B.M., Adair B.M., 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, 3-10.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine Circoviruses: A Review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- Anderson, A., Hartmann, K., Leutenegger, C.M., Proksch, A.L., Mueller, R.S., Unterer, S., 2017. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *Vet Rec* 180, 542-542.
- Balboni, A., Verin, R., Morandi, F., Poli, A., Prosperi, S., Battilani, M., 2013. Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Vet Microbiol* 162, 551-557.
- Bexton, S., Wiersma, L.C., Getu, S., van Run, P.R., Verjans, G.M.G.M., Schipper, D., Schapendonk, C.M.E., Bodewes, R., Oldroyd, L., Haagmans, B.L., Koopmans, M.M.P., Smits, S.L., 2015. Detection of Circovirus in Foxes with Meningoencephalitis, United Kingdom, 2009-2013. *Emerg Infect Dis* 21, 1205-1208.
- Biagini P., Bendinelli M., Hino P., Kakkola L., Mankertz A., Niel C., Okamoto H., Raidal, Teo C.G., Todd C. 2011. *Circoviridae* King A.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, Philadelphia, PA, 343-349.
- Cavallini, P., Santini, S., 1995. Age determination in the red fox in the Mediterranean habitat. *Z Saugetierkunde*. 60, 136-142.
- Cheung, A.K., 2012. Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. *Virus Res* 164, 46-53.
- Crowther, R.A., Berriman, J.A., Curran, W.L., Allan, G.M., Todd, D., 2003. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J Virol* 77, 13036-13041.
- Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Lanave, G., Circella, E., Cavalli, A., Elia, G., Camero, M., Buonavoglia, C., 2014. Genomic Characterization of a Circovirus Associated with Fatal Hemorrhagic Enteritis in Dog, Italy. *PLoS One* 9.

- Dowgier, G., Lorusso, E., Decaro, N., Desario, C., Mari, V., Lucente, M.S., Lanave, G., Buonavoglia, C., Elia, G., 2017. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Vet Microbiol* 204, 54–58.
- Duchatel, J.P., Todd, D., Curry, A., Smyth, J.A., Bustin, J.C., Vindevogel, H., 2005. New data on the transmission of pigeon circovirus. *Vet Rec* 157, 413–415.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 2013. *Fields Virology (Sixth Edition)*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2016. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci Rep* 6.
- Gentil, M., Gruber, A.D., Müller, E., 2017. Nachweishäufigkeit von Dog circovirus bei gesunden und an Durchfall erkrankten Hunden. *Tierarztl Prax Ausg K* 45, 89–94.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hsu, H.-S., Lin, T.-H., Wu, H.-Y., Lin, L.-S., Chung, C.-S., Chiou, M.-T., Lin, C.-N., 2016. High detection rate of dog circovirus in diarrheal dogs. *BMC Vet Res* 12.
- ICTV, 2018: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/circoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae). Ultimo accesso 30/10/2018
- Kapoor, A., Dubovi, E.J., Henriquez-Rivera, J.A., Lipkin, W.I., 2012. Complete genome sequence of the first canine circovirus. *J Virol* 86, 7018.
- Li, L., McGraw, S., Zhu, K., Leutenegger, C.M., Marks, S.L., Kubiski, S., Gaffney, P., Dela Cruz Jr, F.N., Wang, C., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2013a. Circovirus in Tissues of Dogs with Vasculitis and Hemorrhage. *Emerg Infect Dis* 19, 534–541.
- Li, L., Pesavento, P.A., Leutenegger, C.M., Estrada, M., Coffey, L.L., Naccache, S.N., Samayoa, E., Chiu, C., Qiu, J., Wang, C., Deng, X., Delwart, E., 2013b. A novel bocavirus in canine liver. *Virol J* 10, 54.
- Li, Z., Wang, X., Zhang, R., Chen, J., Xia, L., Lin, S., Xie, Z., Jiang, S., 2014. Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus. *Vet Microbiol* 174, 229–232.
- Lojkić, I., Bidin, M., Prpić, J., Šimić, I., Krešić, N., Bedeković, T., 2016. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 45, 10–15.
- Lőrincz M., Csagola, A., Farkas, S.L., Szekely, C., Tuboly, T., 2011. First detection and analysis of a fish circovirus. *J Gen Virol* 92, 1817–1821.

- MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J., 2017. *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Academic Press, Boston, Massachusetts.
- Piewbang, C., Jo, W.K., Puff, C., van der Vries, E., Kesdaangakonwut, S., Rungsipipat, A., Kruppa, J., Jung, K., Baumgärtner, W., Techangamsuwan, S., Ludlow, M., Osterhaus, A.D.M.E., 2018. Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic recombination. *Sci Rep* 8.
- Qurollo, B.A., Archer, N.R., Schreeg, M.E., Marr, H.S., Birkenheuer, A.J., Haney, K.N., Thomas, B.S., Breitschwerdt, E.B., 2017. Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasit Vectors* 10, 128.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, P.D., Steffens, W.L., Latimer, K.S., 1989. Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 171, 83–88.
- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A., 2017. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch Virol* 162, 1447–1463.
- Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 78–89.
- Schnelle, A.N., Barger, A.M., 2012. Neutropenia in Dogs and Cats: Causes and Consequences. *Vet Clin Small Anim* 42 (2012) 111–12242, 111–122.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164, 10–19.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* 9, 678–687.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10, 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729.
- Tavare, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Some mathematical questions in biology / DNA sequence analysis* edited by Robert M. Miura.
- Thaiwong, T., Wise, A.G., Maes, R.K., Mullaney, T., Kiupel, M., 2016. Canine Circovirus 1 (CaCV-1) and Canine Parvovirus 2 (CPV-2): Recurrent Dual Infections in a Papillon Breeding Colony. *Vet Pathol* 53, 1204–1209.

- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 226, 153–167.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64–66.
- Todd, D., 2000. Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review. *Avian Pathol* 29, 373–394.
- US Environmental Protection Agency, 2004. Quality assurance/quality control guidance for laboratories performing PCR analysis on environmental samples. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Yuasa, N., Taniguchi, T., Yoshida, I., 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis* 23, 366–385.
- Zaccaria, G., Malatesta, D., Scipioni, G., Di Felice, E., Campolo, M., Casaccia, C., Savini, G., Di Sabatino, D., Lorusso, A., 2016. Circovirus in domestic and wild carnivores: An important opportunistic agent? *Virology* 490, 69–74.

## Appendice

### *Pubblicazione allegata:*

Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., Battilani, M., 2018. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. BMC Vet Res. 14(1):41.



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats

Andrea Balboni<sup>1</sup>, Francesca Bassi<sup>1</sup>, Stefano De Arcangeli<sup>1</sup>, Rosanna Zobba<sup>2</sup>, Carla Dedola<sup>2</sup>, Alberto Alberti<sup>2</sup> and Mara Battilani<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Cats are susceptible to feline panleukopenia virus (FPV) and canine parvovirus (CPV) variants 2a, 2b and 2c. Detection of FPV and CPV variants in apparently healthy cats and their persistence in white blood cells (WBC) and other tissues when neutralising antibodies are simultaneously present, suggest that parvovirus may persist long-term in the tissues of cats post-infection without causing clinical signs. The aim of this study was to screen a population of 54 cats from Sardinia (Italy) for the presence of both FPV and CPV DNA within buffy coat samples using polymerase chain reaction (PCR). The DNA viral load, genetic diversity, phylogeny and antibody titres against parvoviruses were investigated in the positive cats.

**Results:** Carnivore protoparvovirus 1 DNA was detected in nine cats (16.7%). Viral DNA was reassembled to FPV in four cats and to CPV (CPV-2b and 2c) in four cats; one subject showed an unusually high genetic complexity with mixed infection involving FPV and CPV-2c. Antibodies against parvovirus were detected in all subjects which tested positive to DNA parvoviruses.

**Conclusions:** The identification of FPV and CPV DNA in the WBC of asymptomatic cats, despite the presence of specific antibodies against parvoviruses, and the high genetic heterogeneity detected in one sample, confirmed the relevant epidemiological role of cats in parvovirus infection.

**Keywords:** Canine parvovirus, Cat, Coinfection, Feline panleukopenia virus, White blood cells, PCR

## Background

Parvoviruses are non-enveloped single-stranded DNA viruses which infect a wide range of mammalian species, including several members of the order *Carnivora*. The Carnivore protoparvovirus 1, belonging to genus *Protoparvovirus*, family *Parvoviridae*, subfamily *Parvovirinae*, includes several closely related autonomous viruses causing a range of serious conditions, especially in young animals: feline panleukopenia virus (FPV, the prototype virus of the former carnivore parvovirus), canine parvovirus (CPV), mink enteritis virus (MEV), and raccoon parvovirus (RaPV) [1].

Feline panleukopenia virus has been known to be a cause of disease in cats since the beginning of the twentieth century, although there are other similar parvovirus species affecting cats, such as MEV and CPV. Natural infections in cats with CPV have been reported but FPV remains the most prevalent parvovirus causing disease in cats [2–4]. Since cats are susceptible to FPV and CPV 2a, 2b, 2c variants, superinfection and co-infection with multiple parvovirus strains associated with high viral genetic heterogeneity can occur with relatively high frequency in feline hosts [3, 5–7].

Parvoviruses commonly cause acute infection with high levels of viral shedding which generally ceases within 1–2 weeks post-infection, after the development of high titres of virus-neutralising antibody [8, 9]. Nevertheless, parvoviruses can be detected in faeces for up to 6 weeks after recovery, depending on the sensitivity of

\* Correspondence: [mara.battilani@unibo.it](mailto:mara.battilani@unibo.it)

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, BO, Italy

Full list of author information is available at the end of the article



the diagnostic method used [10]. Cats experimentally infected with FPV shed the virus in both urine and faeces up to day 41–42 post-infection with parvovirus persisting in the lungs and kidneys for more than 50 weeks in cats which have recovered [11]. The detection of FPV and CPV variants in apparently healthy cats suggests that parvovirus infection may be common in some populations of clinically normal cats, and that asymptomatic cats may be able to shed parvovirus for prolonged periods of time [12–14]. Furthermore, the ability of FPV and CPV to persist in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of cats irrespective of the presence of neutralising antibodies [13–17] and the presence of parvoviral DNA in the bone marrow of healthy cats [18], suggests that parvovirus may persist long term in the tissues of cats post-infection without causing clinical signs.

The aim of this study was to screen a population of 54 cats from Sardinia (Italy) for the presence of both FPV and CPV DNA within buffy coat samples. The DNA viral load, genetic diversity, phylogeny and antibody titres against parvoviruses were investigated in the cats testing positive to DNA parvoviruses.

## Methods

### Study design and sampling

This was a retrospective study, carried out on stored blood samples taken for routine diagnostic investigations undertaken at the Department of Veterinary Medicine, University of Sassari - UNISS (Sassari, NO Sardinia, Italy). Buffy coats from cats sampled between October 2011 and March 2012 were tested for the presence of feline and canine parvovirus DNA using real-time polymerase chain reaction (PCR). The partial VP2 gene of the viruses identified was sequenced and used for statistical analyses and phylogenetic comparisons. In addition, the sera of the cats which were positive to DNA parvoviruses were tested for the parvovirus antibody using the haemagglutination inhibition (HI) assay. Samples of owned or stray cats with different life-style conditions (indoor or outdoor, living alone or in community) were tested to evaluate different exposure to parvoviruses. Date of sampling, gender, age, breed, habitat and the clinical symptoms of the 54 cats sampled are reported in Table 1. According to these data, the animals were divided into two groups called A and B. The cats included in Groups A were predominantly healthy cats from four multi-cat households. The cats in Group B were sampled in the Emergency Room of the Veterinary Teaching Hospital of the Department of Veterinary Medicine (UNISS) and were predominantly stray cats showing different clinical signs (sick cats). Twenty-two of the 54 (40.7%) cats were clinically normal; 26/54 (48.1%) showed clinical signs attributable to various diseases; 3/54 (5.6%) showed gastrointestinal signs, such as vomiting and diarrhoea compatible with

parvovirus infection; clinical status was unavailable for 3/54 (5.6%) cats. The vaccination status of the cats included in the study was unknown, although it was hypothesised that the stray cats were unvaccinated.

Anti-coagulated peripheral blood samples in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and coagulated blood for serology were collected from each cat. The blood samples were stored at + 4 °C and sera at – 20 °C until use.

### DNA extraction

Buffy coat-containing mononuclear cells was isolated from 3 ml of EDTA anti-coagulated peripheral blood samples using Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA). The DNA was extracted using the DNeasy Blood and tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was eluted in 100 µl of ultrapure RNasi and DNasi free water, and was stored at – 20 °C after analysis.

### Detection of parvovirus infection using SYBR green real-time PCR

Parvovirus screening was carried out using real-time PCR using two conserved primers (A-for and B-rev, Table 2) targeting a 99 bp fragment of the VP2 gene. Quantitative PCR (qPCR) was carried out using SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio inc., Shiga, Japan) and the Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The fluorescence signal was acquired on the FAM channel (multi-channel machine, source, 470 nm; detector, 510 nm; gain set to 5) with a fluorescence reading taken at the end of each elongation step. Each run consisted of an initial incubation in order to activate the hot-start DNA polymerase at 95 °C for 30 s followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 20 s and polymerisation at 72 °C for 30 s. During the melt cycle, the temperature was increased by increments of 1 °C from 65 °C to 95 °C. A pCR 4 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing one copy of the VP2 target sequence was produced as the external standard for the construction of the assay standard curve for quantitative analysis. Duplicates of six 10-fold dilutions of the standard plasmid, duplicates of the buffy coat DNA extracts of the cats sampled and a no template control were simultaneously analysed. Specimens were considered positive if the fluorescence curve in the amplification plot showed an exponential increase, and if a specific melting peak was observed. Copies of viral DNA were expressed per microlitre of DNA extract.

### Molecular characterisation of viral sequences

#### Amplification and sequencing of the VP2 gene

In order to differentiate between FPV and CPV variants 2a, 2b and 2c, a fragment of the VP2 gene coding for critical amino acid residues 297, 300, 305, 323 and 426

**Table 1** Characteristics of the 54 cats sampled

Cat	Date of sampling	Group	Breed	Gender	Age	Clinical signs	Habitat
01	06/10/2011	B	Mixed	MaN	2Y	Lethargy, dyspnoea, weight loss	Outdoor
02	11/10/2011	B	Mixed	MaN	3Y	Icterus, weight loss, CRF	Indoor
03	13/10/2011	B	Mixed	Fe	6Y	None	Outdoor
04	12/10/2011	A	Siamese	Fe	10Y	None	Outdoor
05	12/10/2011	A	Siamese	Ma	4Y	None	Outdoor
06	13/10/2011	A	Mixed	Ma	ND	None	ND
07	13/10/2011	A	Mixed	ND	ND	None	ND
08	13/10/2011	A	Mixed	ND	ND	None	ND
09	20/10/2012	B	Mixed	Fe	8M	Limb fracture	Outdoor
10	25/10/2011	B	Mixed	FeS	15Y	Vomit	Indoor
11	27/10/2011	A	Mixed	FeS	10Y	None	Outdoor
12	27/10/2011	A	Mixed	MaN	4Y	None	Outdoor
13	03/11/2011	A	Mixed	Fe	7Y	None	Outdoor
14	08/11/2011	B	Mixed	Fe	3Y	Vomit, diarrhoea	Indoor
15	20/09/2011	A	Mixed	Fe		ND	Outdoor
16	10/11/2011	A	Mixed	Ma	6Y	Respiratory signs	Outdoor
17	10/11/2011	A	Mixed	Fe	6Y	Respiratory signs	Outdoor
18	10/11/2011	A	Mixed	Fe	5Y	None	Outdoor
19	17/11/2011	A	Mixed	Fe	5Y	None	Outdoor
20	12/10/2011	A	Mixed	Ma	2Y	Stunted growth, respiratory signs	Outdoor
21	11/10/2011	A	Mixed	Ma	3Y	None	Outdoor
22	22/11/2011	A	Mixed	Fe	6Y	None	Outdoor
23	13/12/2011	A	ND	ND	ND	ND	ND
24	11/10/2011	B	Mixed	Ma	2Y	Trauma	Indoor
25	12/01/2011	B	Mixed	Ma	3Y	Horners syndrome, intracranial mass	Outdoor
26	24/01/2012	B	Mixed	MaN	4Y	None	Indoor
27	30/01/2012	B	Persian	Fe	ND	Behavioural disorders, Inappetence	Indoor
28	30/01/2012	B	Mixed	MaN	6Y	Anorexia, weight loss, third eyelid ptosis	Outdoor
29	09/02/2012	B	Mixed	Ma	12Y	Vomit, diarrhoea	Indoor
30	13/02/2012	B	Mixed	Fe	7Y	Multiple fractures	Outdoor
31	17/02/2012	A	Mixed	Ma	ND	None	ND
32	21/02/2012	A	Mixed	FeS	5Y	Icterus	Outdoor
33	21/02/2012	A	Mixed	Ma	3Y	None	Outdoor
34	27/02/2012	B	Mixed	MaN	7Y	Skin lesions, anorexia, anaemia, weight loss	Indoor
35	28/02/2012	B	Mixed	FeS	2Y	EG	Indoor
36	07/03/2012	B	Mixed	FeS	2Y	Alopecia and crusts in the ears, nose and limbs.	Indoor
37	08/03/2012	B	Mixed	MaN	5Y	Gingival lesions, mucocutaneous MCT	Indoor
38	09/03/2012	B	Mixed	FeS	1Y	Itching without skin lesions.	Outdoor
39	09/03/2012	B	Mixed	FeS	13Y	Breast neoformations	Indoor
40	01/12/2011	B	Mixed	FeS	6Y	SCC in the ears, nose and eyes	Outdoor
41	29/11/2011	B	Mixed	MaN	15Y	CRF	Indoor
42	13/03/2012	A	Mixed	Fe	8Y	None	ND
43	12/03/2012	A	Mixed	Fe	10Y	Skin lesions	Outdoor
44	13/03/2012	A	Mixed	Ma	7Y	None	ND
45	12/03/2012	A	Mixed	Ma	7Y	None	ND
46	12/03/2012	A	Mixed	Fe	6Y	None	ND
47	14/03/2012	B	Mixed	Fe	7Y	Blindness	Outdoor
48	14/03/2012	B	Mixed	Fe	5Y	Dysuria, hematuria	Outdoor
49	15/03/2012	B	Mixed	MaN	ND	Strangury, dysuria	Indoor
50	21/03/2012	B	Mixed	MaN	9Y	EG, unilateral otitis	Indoor
52	26/03/2012	A	Mixed	Fe	2Y	Skin lesions	Outdoor
54	23/03/2012	B	Mixed	Ma	ND	ND	Indoor
55	27/03/2012	A	ND	Ma	ND	None	Outdoor
56	27/03/2012	B	ND	ND	ND	None	Indoor

Ma male, Fe female, MaN male neutered, FeS female spayed, Y Years, M months, CRF chronic renal failure, MCT mast cell tumors, SCC Squamous cell carcinoma, EG Eosinophilic granuloma, ND Not determined  
 In grey: cats which tested positive for FPV or CPV

**Table 2** Primers used

	Primer name	Primer sequence	Nucleotide position	Fragment amplified
Real Time-PCR	A-for	5'-AGCTACTATTATGAGACCAGCTGAG-3'	3767–3791	A-B: 99 bp
	B-rev	5'- CCTGCTGCAATAGGTGTTTTAA-3'	3844–3865	
Hemi-nested-PCR	C-for (P3 <sup>b</sup> )	5'-CCATTTCTAAATTCCTTG –3'	3651–3668	C-D: 881 bp
	D-rev (VPrev <sup>a</sup> )	5'-TTTCTAGGTGCTAGTTGAG –3'	4513–4531	
	E-rev (P4 <sup>b</sup> )	5'-AAGTCAGTATCAAATTCCT –3'	4201–4219	C-E: 569 bp

The primer positions refer to the nucleotide sequence of FPV reference strain CU-4 (GenBank accession number M38246). [41]<sup>a</sup>, [42]<sup>b</sup>

affecting the biological and antigenic proprieties was amplified and sequenced for each virus identified using real-time PCR. A hemi-nested PCR assay was developed by using three conserved primers (C-for, D-rev and E-rev, Table 2) for this purpose. Both PCR reactions were carried out using *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden, Germany) producing DNA fragments of 881 bp and 569 bp in length for the first and the second reaction, respectively. The temperature cycling protocol of the first amplification consisted of 94 °C for 5 min, 45 cycles with 1 cycle at 94 °C for 30 s, at 48 °C for 1 min, and at 72 °C for 1 min, followed by a final elongation at 72 °C for 10 min. In the second amplification, the PCR conditions were 94 °C for 5 min, 35 cycles with 1 cycle at 94 °C for 30 s, at 49 °C for 1 min, and at 72 °C for 45 s, followed by a final elongation at 72 °C for 10 min. In both PCR reactions, FPV 1033/09 [3] was used as a positive control while ultrapure water was used in each experiment to avoid false positive results. The nucleotide sequences were obtained using both forward and reverse primers.

Direct sequencing of the PCR products of one virus identified (number 41/2011) showed an unusually high number of ambiguities, suggesting a mixed viral population. Therefore, the amplification product was cloned into the pCR 4/TOPO vector using the TOPO cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and was transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -competent cells according to the manufacturer's protocol. Ten recombinant clones were sequenced using both forward and reverse primers.

#### Sequence data

The nucleotide sequences obtained were assembled and translated into amino acid sequences using BioEdit sequence alignment editor version 7.2.5 [19]. The VP2 assembled nucleotide sequences were aligned with reference sequences of feline and canine parvoviruses available in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), including the modified live FPV vaccine strains available, using the ClustalW method implemented with BioEdit software.

A variety of statistical analyses aiming to investigate nucleotide diversity, sequence variability and natural selection were carried out on the sequence data set using DnaSP package version 5.10.01 [20]. Statistical analysis

was carried out on the subpopulations, grouping the sequence data in the FPV, CPV and 41/2011 (all clones of sample 41/2011) clusters.

The following parameters were estimated for each cluster: total number of mutations ( $\eta$ ), nucleotide diversity ( $\pi$ ) and its standard error, total number of synonymous differences (SynDif), and total number of non-synonymous differences (NSynDif). Mutation frequency (total number of changes/total number of bases sequenced) and the percentage of mutated clones were used as indicators of genetic diversity of the viral population of virus 41/2011.

Phylogenetic relationships among the viruses detected and the parvovirus reference sequences were evaluated using MEGA version 7.0.20 [21]. The best-fit model of nucleotide substitution was determined using the Find Best DNA/Protein Model function implemented in MEGA, and the Tamura 3-parameter model was found to be optimal for all the sequence data (including reference strains). Phylogenetic trees were constructed using the Maximum Likelihood method, and bootstrap values were determined by 1000 replicates to assess the confidence level of each branch pattern.

#### Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences obtained in this study have been submitted to the GenBank under accession numbers KT151621 to KT151638.

#### Assessment of antibody titre by haemagglutination inhibition test

The parvovirus antibody titre was investigated using the haemagglutination inhibition (HI) test in the sera of the cats which tested positive to parvovirus DNA by direct molecular diagnosis. A CPV-2b isolate (number 115/2010), recovered from the faeces of a dog with non-fatal enteritis, and isolated by the authors on the Crandell Rees feline-kidney (CRFK, cell line was obtained from the Biobanking of Veterinary Resources of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna IZSLER "Bruno Ubertini" <http://www.ibv-r.org/Services/CellCultures.aspx>) cell line, was used as the viral antigen. This strain was used in HI experiments because there are no significant differences in serum titres inhibiting the haemagglutination reaction

when cats are infected by FPV or CPV, if CPV is used as an antigen [22]. To calculate 8 haemagglutinating units (HAU) of the viral antigen, a haemagglutination (HA) assay was carried out on the CPV-2b isolate following procedures described previously by Carmichael et al. [22]. Porcine erythrocytes were washed three times in Bis-Tris Buffered Saline (BTBS, pH 6.2 at 4 °C) and suspended into 0.5% (v/v) BTBS containing 1% bovine serum albumin. To reveal the haemagglutination of both viruses, the test was conducted at a pH of 6–6.8 and was incubated at 4 °C [23, 24].

The HI tests were carried out as previously reported by Senda et al. [25]. All sera were tested in duplicate on two different plates; two-fold dilutions of a commercial canine hyperimmune serum raised against canine distemper, canine hepatitis and canine parvovirus (Stagloban, ATI, Ozzano Emilia, BO, Italy), was used as positive controls.

For all sera, the mean value of the results from the duplicate HI tests was calculated. If the mean value of the result from one sera was included between two successive dilutions, the lower titre was reported. Cats with an HI titre  $\geq 1:8$  were considered positive and cats with an HI titre  $\geq 1:80$  were considered to be protected from infection.

## Results

### Detection of parvovirus in buffy-coat samples

The buffy coat DNA extracts of 54 cats were tested in duplicate for the presence of parvovirus using a SYBR Green real-time PCR assay which showed a limit of detection of 1 copy of the VP2 target DNA per microlitre of extract. Nine (16.7%) of the cats sampled tested positive: 18/2011, 21/2011, 22/2011, 38/2012, 41/2011, 46/2012, 52/2012, 55/2012 and 56/2012. Positive cats were detected in both groups A and B. Six positive cats were clinically normal (6 out of 22 clinically normal cats, 27.3%) and three showed clinical signs of various diseases (3 out of 26 cats with clinical signs of various diseases, 11.5%) (Table 1); no cat with gastrointestinal signs tested positive for parvovirus DNA. In the positive samples, the amount of viral DNA ranged from orders of magnitude  $10^0$  to  $10^2$  copies of DNA/ $\mu$ l of extract.

A melting curve analysis showed a solitary peak between 81.8° and 82 °C for standard plasmid dilutions and between 81° and 82 °C for each positive cat sample.

### Molecular characterisation of viral sequences

The nucleotide sequences of the partial VP2 gene obtained from positive samples were 532 bp in length (177 amino acid codons), and corresponded to residue 295–471 of the FPV reference strain CU-4 (GenBank accession number M38246). Nucleotide sequences of the VP2 partial gene were also obtained for ten recombinant clones of sample 41/2011, numbered from C01 to C10, respectively.

Analysis of the deduced amino acid residues at critical positions allowed the identification of the following carnivore protoparvoviruses: FPV (viruses 21/2011, 22/2011, 38/2012, 52/2012 and clones C01, C02, C03, C05, C06, C07, C08 and C10); CPV-2b (viruses 18/2011, 55/2012 and 56/2012) and CPV-2c (virus 46/2012 and clones C04 and C09). Six main viral populations were detected in cat 41/2011: clones C02, C05, C06, C07 and C10 resembled the predominant FPV circulating in the sampling area; clone C01 was an FPV which showed a change located in residue 312 (Lys  $\rightarrow$  Arg); clone C03 was an FPV which displayed two coding changes in Thr391-to-Ala and Pro461-to-Ser; C04 was a CPV-2c with an amino acid change located at position 437 (Gly  $\rightarrow$  Arg); C09 was a typical CPV-2c and clone 41/2011-C08 displayed amino acids identical to FPV in residues 297, 300, 305 and 323 while it showed glutamic acid typical of CPV-2c in position 426. The predicted amino acid sequence changes are summarised in Table 3.

Several synonymous and non-synonymous substitutions were detected by comparing the sequences as reported in Table 4. Feline panleukopenia viruses showed a total number of mutations slightly higher than CPV viruses, although synonymous changes predominated in the FPV sequences while non-synonymous changes were prevalent in the CPV viruses. Sample 41/2011 showed high genetic complexity generated within the host, and its sequence variability was higher than the variability of the other sequence data analysed as was seen by the values of parameter  $\pi$ . The non-synonymous fraction was greater for sample 41/2011, indicating clear prevalence of the number of non-synonymous mutations in the sample: 10 non-synonymous mutations out of a total of 15 mutations. The proportion of mutated viral clones was 60% for sample 41/2011 and the mutation frequency was on the order of  $2.8 \times 10^{-3}$  (Table 4).

Unrooted phylogenetic trees constructed from alignments of the nucleotide sequences obtained in this study with additional reference sequences showed two main clusters referable to FPV and CPV. The sequence of clone 41/2011-C08 formed a monophyletic branch inside the FPV clade (Fig. 1). Nucleotide sequences of the modified live FPV vaccine strains available from GenBank were distinguishable from all the FPV and CPV sequences obtained in this study, and direct relationships between them were not evident from the phylogenetic tree.

### Haemagglutination inhibition test

The HI titres obtained are reported in Table 5. All the cats which tested positive for parvovirus DNA were also positive for antibodies against parvoviruses; cats 22/2011 and 55/2012 showed a titre higher than 1:80.

**Table 3** Change of amino acids to VP2 partial protein

SAMPLES	GROUP	297	300	305	312	323	359	371	375	391	418	426	437	461	TYPE
FPV <sup>a</sup>		Ser	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Ala	Asp	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	
CPV-2 <sup>b</sup>		-	-	-	-	Asn	-	-	Asn	-	-	-	-	-	
CPV-2a <sup>c</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPV-2b <sup>d</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Asp	-	-	
CPV-2a <sup>e</sup>		Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPV-2b <sup>f</sup>		-	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Asp	-	-	
CPV-2c <sup>g</sup>		Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	
18/2011	A	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
21/2011	A	-	-	-	-	-	Gly	-	-	-	-	-	-	-	FPV
22/2011	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
38/2012	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
46/2012	A	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	CPV-2c
52/2012	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
55/2012	A	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
56/2012	B	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	Gly	-	-	Thr	Asp	-	-	CPV-2b
41/2011-C01	B	-	-	-	Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C02	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C03	B	-	-	-	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	Ser	FPV
41/2011-C04	B	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	Arg	-	CPV-2c
41/2011-C05	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C06	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C07	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV
41/2011-C08	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Glu	-	-	FPV
41/2011-C09	B	Ala	Gly	Tyr	-	Asn	-	-	-	-	-	Glu	-	-	CPV-2c
41/2011-C10	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FPV

The host-specific amino acids which differentiate FPV and CPV are represented by grey dashes

Deduced amino acid sequences of the VP2 gene were obtained from GenBank

<sup>a</sup>Prototype FPV: strain FPV-b (M38246)

<sup>b</sup>Prototype CPV type 2: strain CPV-b (M38245)

<sup>c</sup>Prototype CPV type 2a: strain CPV-15 (M24003)

<sup>d</sup>Prototype CPV type 2b: strain CPV-39 (M74849)

<sup>e</sup>Reference strain CPV type 2a: CPV-677 (AF306445)

<sup>f</sup>Reference strain CPV type 2b: CPV-637 (AF306450)

<sup>g</sup>Reference strain CPV type 2c: CPV-695 (AF01519)

## Discussion

The present study screened the occurrence of parvovirus DNA and the feline host-immune status in a cat population. Asymptomatic and symptomatic cats sampled in Sardinia (Italy) during 2011–2012 were tested for the presence of both FPV and CPV DNA in WBC using qPCR, and the partial VP2 gene of the viruses identified was characterised. Parvoviruses have commonly been titrated in the faeces of infected animals, insofar as the viruses shed in faeces reflect virus replication; the Authors chose to analyse the WBC for the presence of viral DNA as, in addition to the intestinal crypt cells, bone marrow

and other lymphoid tissues are also a major target for parvoviruses in both dogs and cats [9]. Furthermore, since parvovirus can frequently be isolated in infected cats, even in the presence of high virus-neutralising antibodies [15, 17], antibody titres against parvovirus were established in the sera of positive cats using an HI assay.

Nine (16.7%) out of a total of 54 cats tested positive for parvovirus DNA with viral DNA quantities ranging from  $10^0$  to  $10^2$  copies/ $\mu$ l of extract, demonstrating that the viral genome was detectable, although at low levels, in the WBC of a relatively large number of cats. All the cats which tested positive for parvovirus DNA had

**Table 4** Statistical analysis of the sequence data set

Sample	$\eta^b$	$\pi^c$	<i>SynDif</i> <sup>d</sup>	<i>NSynDif</i> <sup>e</sup>	% Mutated clones	Total mutations/bases sequenced	Mutation frequency
FPV ( $n^a = 4$ )	6	0.00627 (SE 0.00149)	5	1	-	-	-
CPV ( $n = 4$ )	4	0.00376 (SE 0.00199)	1	3	-	-	-
41/2011 ( $n = 10$ )	15	0.01032 (SE 0.00281)	5	10	60 (6/10)	15/5320	$2.8 \times 10^{-3}$

Summaries of sample sequence variability and quasispecies variation in the viral populations detected within cat 41/2011

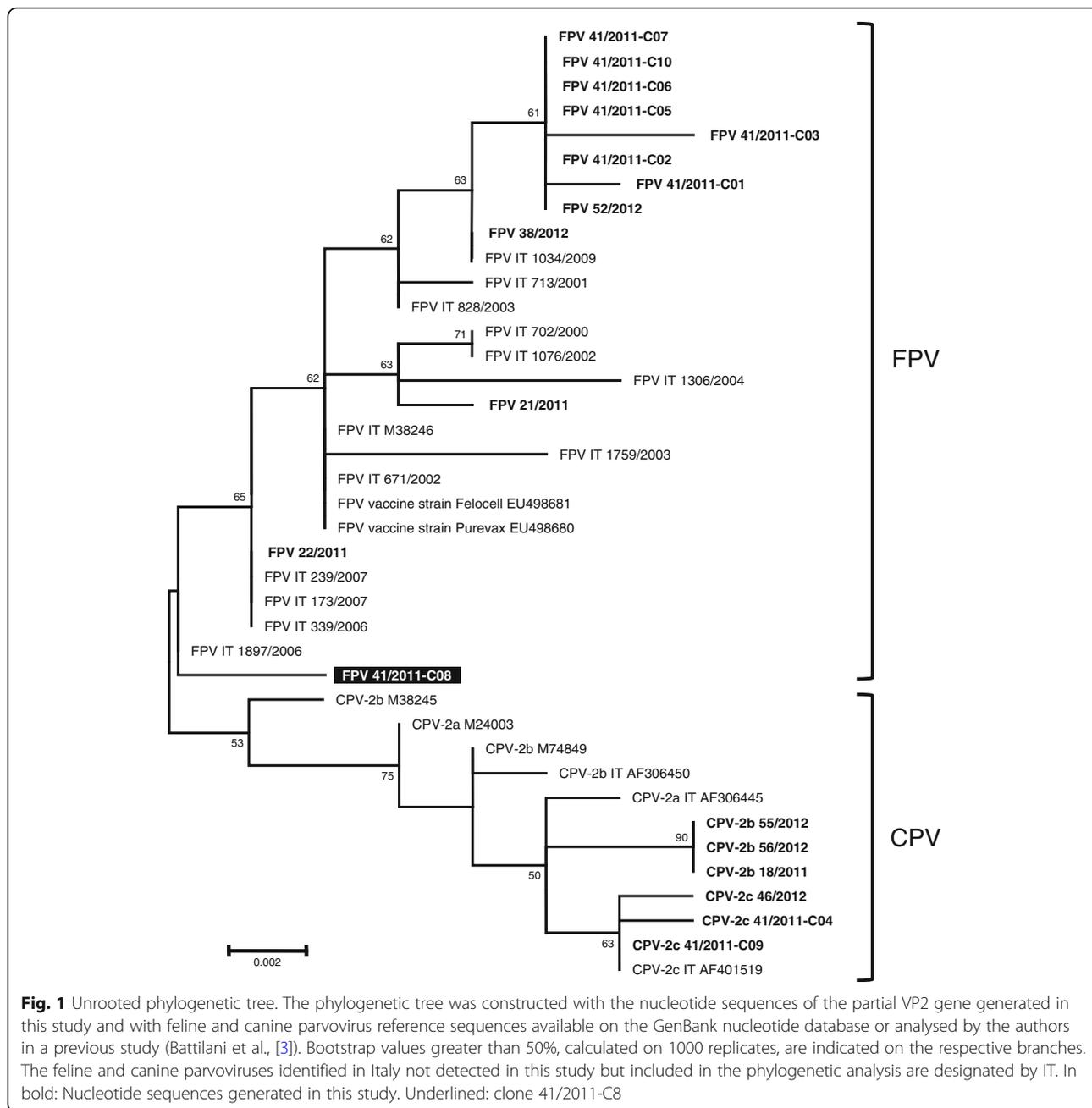
<sup>a</sup> $n$ : sample size

<sup>b</sup> $\eta$ : total number of mutations

<sup>c</sup> $\pi$ : nucleotide diversity

<sup>d</sup>*SynDif*: total number of synonymous differences

<sup>e</sup>*NSynDif*: total number of non-synonymous differences



antibodies against parvoviruses. Positive cats included healthy and diseased cats. Although sick cats had a potentially greater probability of being persistently infected, none of the samples from cats showing signs of gastroenteritis tested positive.

The presence of FPV and CPV DNA in the faecal and peripheral blood samples of healthy cats has previously been reported [3, 12, 15–17], raising important questions regarding the role of cats in the epidemiology of parvoviruses. In our study, the absence of clinical signs consistent with parvovirus in the cats which tested positive, together with the low amount of viral DNA

detected, suggested that the infection was asymptomatic or that residual viral DNA remains in the organism after recovery from acute infection. Furthermore, the detection of parvoviral DNA in WBC reveals the presence of the virus in the bone marrow or in other lymphoid tissues which might reflect chronic or latent infection. The detection of CPV DNA in apparently healthy domestic cats confirmed a previous survey in which a high prevalence (37%) of CPV in apparently healthy domestic cats living in rescue shelters was identified [14]. Canine parvovirus-like DNA was also detected in the tissues of wildlife carnivores which had no

**Table 5** The HI titre of cats which were positive in Real-time PCR

Sample	HI titre
18/2011	1:32
21/2011	1:32
22/2011	1:256
38/2012	1:16
41/2011	1:64
46/2012	1:32
52/2012	1:32
55/2012	1:256
56/2012	1:16
Stagloban	1:256

clinical signs of active infection and, therefore, it was likely that this virus caused latent or persistent infection not only in domestic cats [26]. Animal parvoviruses, such as Rodent protoparvovirus and Aleutian mink disease parvovirus, have been shown to persist in their host [27, 28]. Persistence is a common feature also for human parvovirus B19 (B19V) infection [29]: B19V parvoviral DNA has been documented in a wide range of tissues and the bone marrow of asymptomatic adults, although the majority of people harbour parvoviral DNA in a form which does not actively replicate [30, 31].

Of the nine cats testing positive for parvovirus DNA, four showed FPV DNA, four CPV DNA (three CPV-2b and one CPV-2c), and cat 41/2011 showed unusually high genetic diversity and evidenced DNA belonging to two species of parvovirus in the same patient.

The pathogenicity of CPV variants for cats is not fully understood. Some studies have suggested that CPV had the same pathogenic potential as FPV in cats [3, 32–35]; in other studies, clinical signs were not observed in infected animals, with the exception of transient leukopenia [36, 37]. These results led to the speculation that CPV, compared to FPV, can most frequently cause asymptomatic and persistent infection in cats, even if additional studies are clearly needed to fully understand the potential of cats as CPV carriers. In our study, an equivalent prevalence of FPV and CPV was found in the samples examined; this result might be related to the type of cat population sampled, which consisted mainly of healthy cats and cats showing clinical signs not related to parvovirus. Alternatively, it could be due to the biological matrix analysed since parvoviruses have commonly been investigated in the faeces of infected animals; instead, in our survey the WBC were analysed.

The rates of variation of the FPV and CPV nucleotide sequences analysed in this study were similar, although

genetic diversity in the FPV sequences was generated primarily by synonymous mutations which did not result in amino acid substitutions. This result was congruent with the evolutive behaviour of FPV which, since its emergence in 1920, has not undergone significant changes in antigenic and biological properties. Feline panleukopenia virus varied at a slow rate by random genetic drift and it maintained host-specificity [38]. Instead, in the CPV sequence data set, non-synonymous mutations were predominant. This finding is compatible with the pattern of evolution observed for CPV. Since its emergence in the late 1970s, CPV evolution has been driven by strong positive selection, giving rise to new antigenic variants which have replaced the original type [38].

An unusual genetic complexity was reported for sample 41/2011, with six different viral DNAs ascribable to two distinct species of parvovirus, FPV and CPV type 2c. Although co-infection by more than one parvovirus species is a rare event, it has already been described in a cat simultaneously infected by FPV and CPV-2a [7].

Carnivore protoparvoviruses show an estimated annual substitution rate on the order of  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  whereas the mutation frequency detected in sample 41/2011 was on the order of  $2.8 \times 10^{-3}$ , a value which determines the quasispecies distribution in RNA virus populations. Carnivore parvoviruses are very prone to genetic evolution, showing substitution rates similar to those of RNA viruses, with values of approximately  $10^{-4}$  substitutions per site per year. This result, together with the detection of CPV-2c, which has already been reported in multiple infections of high genetic complexity [3, 5, 39], confirmed that co-infection with different species of parvovirus in feline hosts led to a high genetic variability and to the potential emergence of new viruses [3].

The presence of distinctive mutations between the FPV DNA sequences detected and the sequences of modified live FPV vaccine strains available, together with the lack of information regarding the vaccination history of the cats sampled, allowed the Authors to exclude the possibility that DNA from vaccine strains was detected and did not allow speculation regarding the persistence of modified live vaccine strains in the cats sampled. However, viraemia persisting up to 24 days post vaccination has been reported in dogs vaccinated with modified live canine parvovirus [40].

## Conclusions

Additional studies are required to investigate the nature and clinical significance of the presence of parvovirus DNA in the WBC of healthy cats and the potential of cats as parvovirus carriers. Ideally, faeces for the examination of shedding should also be included in the sampling; viral isolation could be useful for testing viral vitality, and reverse transcription-PCR assay targeting

## viral mRNA could be carried out to determine if there is active replication.

### Abbreviations

BTBS: Bis-Tris Buffered Saline; CPV: Canine parvovirus; CRFK: Crandell feline kidney; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FPV: Feline panleukopenia virus; HA: Haemagglutination assay; HAU: Haemagglutinating units; HI: Haemagglutination inhibition; MEV: Mink enteritis virus; PCR: Polymerase chain reaction; qPCR: Quantitative PCR; RaPV: Raccoon parvovirus; TAE: Tris-acetate-EDTA; VP2: Viral protein 2; WBC: Whole blood cells

### Acknowledgements

None.

### Funding

This research received no grant from any funding agency in the public or commercial sectors.

### Availability of data and materials

The nucleotide sequences obtained in this study are available at GenBank (no. KT151621 - KT151638). Sequence alignment are available from the corresponding author (Prof. Mara Battilani) upon request. Alignment and phylogeny data were linked to the Dryad repository via TreeBASE search ID: <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S22165>.

### Authors' contributions

MB and AA designed the study. RZ and CD collected the blood samples and the background information on the samples. Preparation of buffy coat and DNA extraction was performed by AA. The PCR and VP sequencing was carried out by AA, FB and SDA under the supervision of MB. AB analysed the sequence data and drafted the manuscript. MB critically revised the manuscript for important intellectual content. All the authors read the manuscript and approved the final version.

### Ethics approval

The study was carried out using stored blood samples which had been collected for clinical and laboratory purposes independent of the study with the agreement of the cat owners who presented their cats to the Veterinary Teaching Hospital (University of Sassari). As stored blood samples were used, no separate ethical approval was required for the study. All efforts were made to minimise the discomfort of the animals during sampling.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, BO, Italy. <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Via Vienna, 2, Sassari 07100, Italy.

Received: 23 March 2017 Accepted: 17 January 2018

Published online: 05 February 2018

### References

- International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Accessed 23 Mar 2017.
- Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza A, Buonavoglia C. Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J Gen Virol*. 2008;89:2290–8.
- Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. Genetic complexity and multiple infections with more parvovirus species in naturally infected cats. *Vet Res*. 2011;42:43.
- Miranda C, Vieira MJ, Silva E, Carvalheira J, Parrish CR, Thompson G. Genetic analysis of feline Panleukopenia virus full-length VP2 gene in domestic cats between 2006–2008 and 2012–2014, Portugal. *Transbound Emerg Dis*. 2016. <https://doi.org/10.1111/tbed.12483>.
- Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology*. 2006;352:22–6.
- Hoelzer K, Shackleton LA, Holmes EC, Parrish CR. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. *J Virol*. 2008;82:11096–105.
- Battilani M, Balboni A, Giunti M, Prosperi S. Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat. *Vet Ital*. 2013;49:127–9.
- Greene CE. Canine parvovirus enteritis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and the cat*. 4th ed. USA: Elsevier; 2012. p. 67–75.
- Greene CE. Feline parvovirus infection. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and the cat*. 4th ed. USA: Elsevier; 2012. p. 80–8.
- Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus post-vaccination shedding: interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. *Vet J*. 2017;221:23–4.
- Csiza CK, Scott FW, de Lahunta A, Gillespie JH. Immune carrier state of feline panleukopenia virus-infected cats. *Am J Vet Res*. 1971;32:419–26.
- Mochizuki M, Harasawa R, Nakatani H. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet Microbiol*. 1993a;38:1–10.
- Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Takahashi E, Mochizuki M. Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:341–6.
- Clegg SR, Coyne KP, Dawson S, Spibey N, Gaskell RM, Radford AD. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Vet Microbiol*. 2012;157:78–85.
- Miyazawa T, Ikeda Y, Nakamura K, Naito R, Mochizuki M, Tohya Y, Vu D, Mikami T, Takahashi E. Isolation of feline parvovirus from peripheral blood mononuclear cells of cats in northern Vietnam. *Microbiol Immunol*. 1999;43:609–12.
- Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology*. 2000;278:13–9.
- Nakamura K, Ikeda Y, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mochizuki M. Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses. *Res Vet Sci*. 2001a;71:219–22.
- Haynes SM, Holloway SA. Identification of parvovirus in the bone marrow of eight cats. *Aust Vet J*. 2012;90:136–9.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl acids Symp Ser*. 1999;41:95–8.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–2.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870–4.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res*. 1980;41:784–91.
- Senda M, Hirayama N, Ito O, Yamamoto H. Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J Gen Virol*. 1988;69:349–54.
- Garcia Rde C, de Castro TX, de Miranda SC, Lopes G Jr, de Lima M, Labarthe NV, Leite JP. Characterization of parvoviruses from domestic cats in Brazil. *J Vet Diagn Investig*. 2011;23:951–5.
- Senda M, Hirayama N, Yamamoto H, Kurata K. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Vet Microbiol*. 1986;12:1–6.
- Allison AB, Kohler DJ, Ortega A, Hoover EA, Grove DM, Holmes EC, Parrish CR. Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. *PLoS Pathog*. 2014; 10:e1004475.
- Best SM, Bloom ME. Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus and similarities to B19 infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005;52:331–4.
- Janus LM, Mähler M, Köhl W, Smoczek A, Hedrich HJ, Bleich A. Minute Virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice. *Comp Med*. 2008;58:360–8.
- Soderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol Biol*. 2002;50:307–16.

30. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegel G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol.* 1997;53:229–32.
31. Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, De Giorgi V, Di Lollo S, Azzi A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol.* 2008;80:2005–11.
32. Mochizuki M, Horiuchi M, Hiragi H, San Gabriel MC, Yasuda N, Uno T. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2101–5.
33. Truyen U, Platzer G, Parrish CR. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec.* 1996;138:365–6.
34. Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, Terio V, Elia G, Lucente MS, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci.* 2010;89:275–8.
35. Decaro N, Desario C, Billi M, Mari V, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet J.* 2011;187:195–9.
36. Chalmers WS, Truyen U, Greenwood NM, Baxendale W. Efficacy of feline panleucopenia vaccine to prevent infection with an isolate of CPV2b obtained from a cat. *Vet Microbiol.* 1999;69:41–5.
37. Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, Sato E, Kawakami K, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T, Mochizuki M. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001b;8(3):663–8.
38. Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:379–84.
39. Battilani M, Gallina L, Vaccari F, Morganti L. Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Vet Res Commun.* 2007;31(Suppl 1):209–12.
40. Decaro N, Crescenzo G, Desario C, Cavalli A, Losurdo M, Colaianni ML, Ventrella G, Rizzi S, Aulicino S, Lucente MS, Buonavoglia C. Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine.* 2014;32:3850–3.
41. Mochizuki M, San Gabriel MC, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci.* 1993b;55:60–3.
42. Battilani M, Scagliarini A, Tisato E, Turilli C, Jacoboni I, Casadio R, Prosperi S. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82:1555–60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

