

Badania serologiczne i molekularne psów uodpornionych przeciw parwowirozie

ANDRZEJ SALWA, ANTONI KOPCZEWSKI, KRYSZYNA WOLAŃCZYK-RUTKOWIAK

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

Salwa A., Kopczeński A., Wolańczyk-Rutkowiak K.

Serologic and molecular examination of dogs vaccinated against parvovirus

Summary

The aim of the study was to conduct serological examinations for the presence of humoral antibodies against CPV-2, using an ELISA test. Moreover, amplification and restriction analysis (PCR-RFLP) of the fragment at 1278 bp (VP-2 gene) strains of CPV-2 biological materials of dogs with diarrhea were performed. The studies were carried out on 377 urban dogs aged from 3 months – 17 years. All animals were vaccinated with commercially available live or inactivated vaccines against canine parvovirus at 8, 12, 16 weeks of age. Most of the dogs were revaccinated yearly. Serological examinations determined that most of the dogs had antibodies against CPV-2 (98%) at 2-3-years-of-age. The least seropositive dogs were below 5 months (89%) and above 10 years (85%). The highest mean titer CPV-2 virus antibody were found between 0.5 – 1 year. 95% animals with diarrhea were positive for canine parvovirus by use of PCR. Moreover, the RFLP analysis of the VP-2 gene sequence enabled the distinction of 3 restriction patterns of CPV-2 circulating in the dog population.

The study indicates the vaccination of dogs provides effective protection against canine parvovirus infection. The occasional occurrence of CPV-2 in puppies and young dogs can indicate the presence of virulent strains of CPV-2 in the dog population.

Keywords: dogs, CPV-2, serology, PCR-RFLP

Parwowiroza psów jest ostrą zakaźną chorobą, przebiegającą wśród objawów biegunki i wymiotów wywołanych różnymi stanami zapalenia błony śluzowej jelit. U szceniąt zakażenie może przebiegać pod postacią *myocarditis acuta* (15, 18, 26). Choroba wywołana jest przez parwowirus psi typu 2 (Canine parvovirus – 2, CPV-2), zaliczany do rodziny *Parvoviridae*, w obrębie której znajduje się m.in. wirus panleukopenii kotów (FPV), wirus zapalenia jelit nerek (MEV), wirus choroby aleuckiej nerek oraz parwowirus szopów (ADV) (15, 26). Wirus ten posiada dwa biotypy antygenowe, określane jako CPV-2a i CPV-2b, wśród których znajduje się wiele wariantów. W otocze glikoproteinowej parwowirusa umiejscowione są dwa białka strukturalne VP-1 i VP-2 determinujące powstawanie odporności swoistej (20). Zakażenie CPV-2 najczęściej przenosi się drogą pokarmową przez kał lub karmę zanieczyszczoną kałem od chorych zwierząt. Na zakażenie wrażliwe są psy w każdym wieku, ale choroba najczęściej występuje u szceniąt i młodych psów do 3. miesiąca życia (3, 4, 8, 10, 18).

Aktualna sytuacja epidemiologiczna w Polsce wskazuje na rozprzestrzenienie się CPV-2 w populacji psów. W związku z tym stosowana jest immunoprofilaktyka

swoista za pomocą żywych atenuowanych lub inaktywowanych szczepionek przeciwko parwowirozie (4, 9, 12, 14).

Na podstawie licznych obserwacji klinicznych i badań laboratoryjnych można stwierdzić, że pomimo prowadzonych masowych szczepień, pojawiają się zachorowania i padnięcia młodych psów z powodu tej choroby (2, 3, 11, 19, 23). Odpowiedź immunologiczna po zaszczepieniu szceniąt jest procesem złożonym i zależy m.in. stanu zdrowia zwierzęcia oraz rodzaju zastosowanej szczepionki. Równocześnie należy mieć na uwadze nierzadko występujące pierwotne lub nabyte niedobory immunologiczne psów (11, 24). Istotnym elementem w niepowodzeniach szczepień są także występujące różnice antygenowe między szczepami CPV-2 użytymi do produkcji szczepionek a szczepami terenowymi wirusa krążącymi w środowisku zakażonych zwierząt (1, 5, 7, 12).

Celem badań było określenie częstotliwości występowania przeciwciał CPV-2 oraz prześledzenie dynamiki odporności humoralnej u psów z terenu Trójmiasta. Ponadto dokonano analizy zmienności regionu genu VP-2 u szczepów CPV-2 występujących w materiale biologicznym pochodzącym od chorych psów.

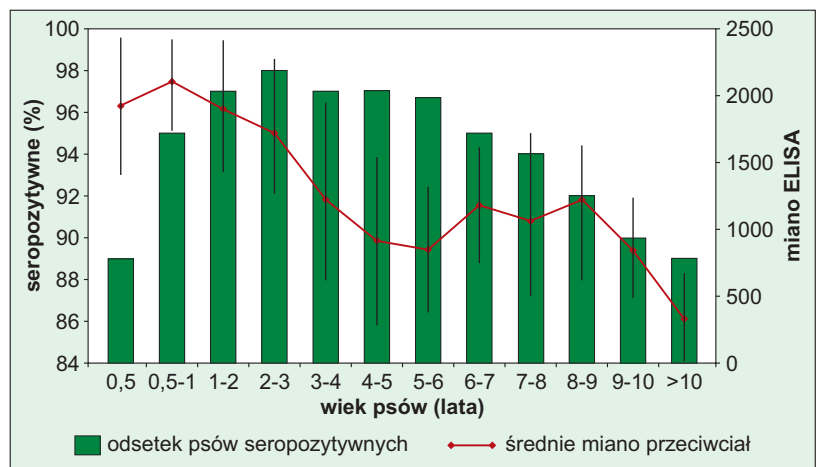
Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 2002-2005 u psów różnych ras w wieku od 3 miesięcy do 17 lat, pochodzących z terenu aglomeracji Trójmiasta. Wszystkie te zwierzęta były najczęściej uodporniane trzykrotnie w 8., 12., 16. tygodniu życia różnymi zagranicznymi lub krajowymi mono- lub poliwalentnymi szczepionkami żywymi lub inaktywowanymi przeciwko parwowirusowi w ramach profilaktyki swoistej schorzeń wirusowych, bakteryjnych układu oddechowego i przewodu pokarmowego psów (Vanguard, Nobivac, Duramune, Canivac). Większość szczepionych psów dorosłych była doszczepiana corocznie przez kilka lat. Materiał do badań stanowiło 377 próbek surowicy krwi oraz 74 próbki kału lub wymazów z odbytu, pochodzące od psów, u których wystąpiła biegunka wskazująca na parwowirusę.

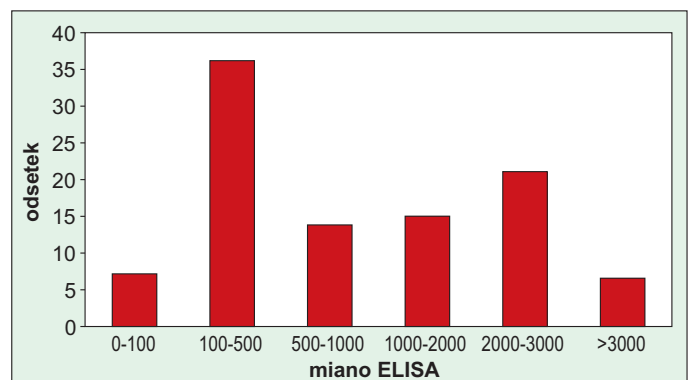
Badania serologiczne psów wykonywano na obecność przeciwciał swoistych dla wirusa CPV-2 testem ELISA Ab (firmy Ingenasa). Na podstawie uzyskanych wartości ekstynkcji (OD) badanej próbki obliczano miano przeciwciał w surowicy. Zgodnie z zaleceniami producenta testu, wynik uznawano za dodatni, jeżeli miano przeciwciał badanej próbki było wyższe od wartości progowej 100. Izolację wirusowego DNA do reakcji PCR z badanych próbek kału lub wymazów wykonywano przy zastosowaniu minikolumn, zgodnie z instrukcją producenta (firma A&A Biotechnology, Gdańsk). Amplifikację wybranego fragmentu genu VP-2 CPV-2, przeprowadzano z wykorzystaniem dwóch starterów komplementarnych do 5' i 3' genu VP-2 o następujących sekwencjach: P1 -5'CTACTCAGCCACCAACTAAAG 3' i P2 -5' ATTTTCTAGGTGTAGTTGAGA 3' (firma Genomed Biotechnologies, USA) (7). Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze (firmy Perkin-Elmer 2400) w objętości 20 µl. Przed amplifikacją optymalizowano warunki wykonania reakcji PCR pod kątem doboru właściwej temperatury przyłączania starterów. Profil temperaturowo-czasowy reakcji: – wstępna denaturacja (94°C/2 min.), po czym 30 cykli obejmujących: – denaturację (93°C/1 min.), – przyłączanie starterów (58°C/1 min.), – wydłużanie (72°C/2 min.), – końcowe wydłużanie (72°C/10 min.). Produkty reakcji PCR wykrywano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Jako wzorca masy molekularnej DNA używano MI (puC19/MSpl) (firmy DNA Gdańsk). Kontrolę stanowiło DNA izolowane ze szczepu standardowego CPV-2, otrzymanego z Zakładu Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Następnie po wyizolowaniu produktów PCR z żelu agarozowego trawiono je dwoma endonukleazami restrykcyjnymi: Alu I i Rsa I. Produkty reakcji trawienia wraz z 0,25% roztworem błękitu bromofenolowego наносzono na 12% żel akrylamidowy i prowadzono elektroforezę przez 4 godz. w buforze TAE o pH 8,1. Wielkość uzyskanych fragmentów DNA porównywano do wzorca masy molekularnej. Po elektroforezie zarówno żel agarozowy, jak i poliakrylamidowy fotografowano w świetle lampy UV transiluminatora (firma Fotodyne).

Wyniki i omówienie

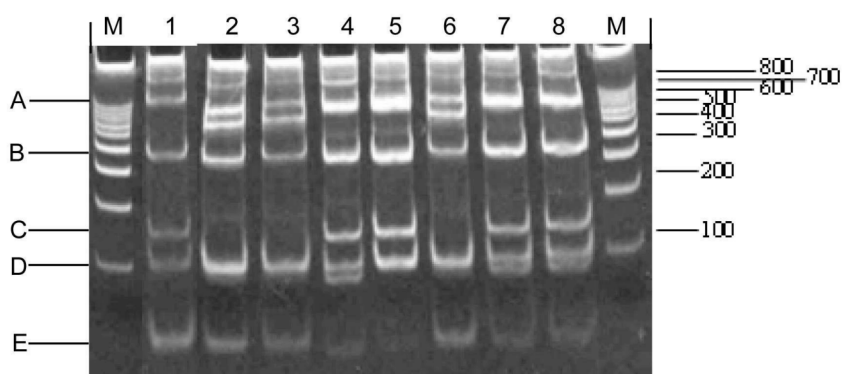
Wyniki badań przedstawiono na ryc. 1-4. Badanie w kierunku obecności przeciwciał swoistych dla CPV-2 w surowicy krwi psów wykazało ich zróżnicowany poziom pod względem ilościowym (ryc. 1). Najwięcej zwierząt posiadających przeciwciała w surowicy było w wieku 2-3 lat (98%). Ten wysoki odsetek uodpornionych zwierząt utrzymywał się u osobników wieku 5-6 lat, a następnie ulegał stopniowemu obniżeniu. Najmniej seropozytywnych zwierząt stwierdzono w wieku do 5. miesiąca życia (89%) oraz 10 lat i starszych (85%). Najwyższe średnie miano przeciwciał (2736) zanotowano u psów w wieku od 6 miesięcy do 1 roku, najniższe zaś w wieku 10 lat i wyższym (331). Średnie miano przeciwciał u młodych psów stopniowo obniżało się i ponownie wzrastało w wieku 8-9 lat. Analiza wartości miana przeciwciał wykazała, że najczęściej psów posiadało miano w zakresie od 100 do 500 (36,1%) oraz od 2000 do 3000 (21,4%) (ryc. 2). Stwierdzono 7,1% zwierząt z mianem poniżej wartości 100, uznanej za wynik ujemny. Przedstawione wyniki badań stanowiły potwierdzenie spostrzeżeń Böhma i wsp. (2), którzy badali odporność humoralną dla CPV-2 u psów w Anglii. Średni odsetek zwierząt z przeciwciałami w surowicy krwi wynosił 95,0%. Autorzy ci najwyższe miano serologiczne obserwowali



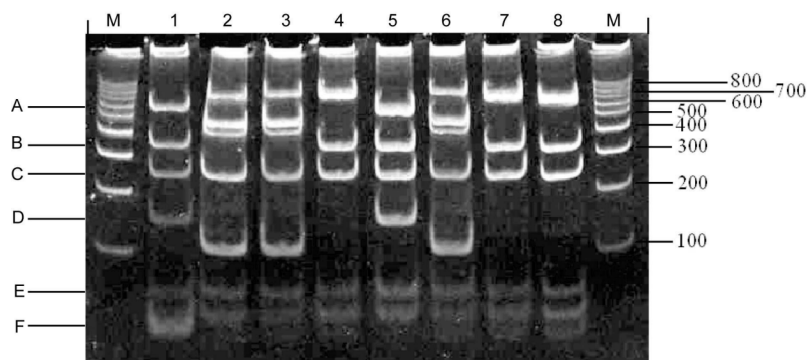
Ryc. 1. Częstotliwość występowania przeciwciał dla CPV-2 w surowicy psów



Ryc. 2. Odsetek psów posiadający w surowicy krwi określone wartości przeciwciał dla CPV-2



Ryc. 3. Wzory restrykcyjne produktu PCR fragmentu genu VP-2 CPV-2 po trawieniu enzymem restrykcyjnym Rsa I. Ścieżki przedstawiają: M – wzorzec molekularny, 1 – DNA szczepu wzorcowego CPV-2, 2-8 – DNA wirusowe izolowane od chorych psów. Z prawej strony zdjęcia przedstawiono wielkości wzorca DNA, z lewej – oznaczenia fragmentów trawionego produktu PCR



Ryc. 4. Wzory restrykcyjne produktu PCR fragmentu genu VP-2 CPV-2 po trawieniu enzymem restrykcyjnym Alu I. Ścieżki przedstawiają: M – wzorzec molekularny, 1 – DNA szczepu wzorcowego CPV-2, 2-8 – DNA wirusowe izolowane od chorych psów. Z prawej strony zdjęcia przedstawiono wielkości wzorca DNA, z lewej – oznaczenia fragmentów trawionego produktu PCR

u psów w wieku 5-6 lat. Z kolei Olson i wsp. (16) wykazały, że w populacji szczepionych psów w Szwecji tylko 86,7% zwierząt posiadało odporność humoralną.

Jak wiadomo, zasadniczą rolę w kształtowaniu się odporności przeciwko CPV-2 odgrywa rodzaj i sposób podania szczepionki. Według Truyna (26), obecnie stosowane monowalentne szczepionki, uzyskane drogą inżynierii genetycznej, pozwalają na uzyskanie trwałej wieloletniej odporności. Przy stosowaniu szczepionek u młodych psów należy mieć na uwadze występowanie przeciwciał pochodzenia matczynego, które mogą hamować wytworzenie się prawidłowej odporności przeciwwirusowej (17). Zdaniem niektórych autorów, kontrowersyjna jest potrzeba rewakcji u psów dorosłych, ponieważ po jednokrotnym uodpornieniu monowalentną atenuowaną szczepionką, odpowiedź humoralna i komórkowa utrzymuje się przez całe życie (3, 24). Poza tym przy wielokrotnym stosowaniu żywych szczepionek należy się liczyć z wystąpieniem odczynu anafilaktycznego oraz anemii hemolitycznej (nadwrażliwość typu I i II) (14, 18, 25).

Wyniki badań nad nosówką i parwowirusą u rewakcyonowanych psów, jakie uzyskał McCaw i wsp. (12) wskazują, że celowe jest coroczne doszczepianie psów. Większość producentów szczepionek w swoich programach szczepień uznaje uodparnianie każdego roku za konieczne.

Duże znaczenie przy ocenie dynamiki kształtowania się odporności u psów, ma stymulacja układu immunologicznego występującymi w środowisku zwierząt szczepami dzikimi CPV-2 (3, 18). Stwierdzenie w badaniach własnych znamiennego obniżenia średniej wartości mian przeciwciał u psów dopiero w wieku 9 i więcej lat, przy rzadko obserwowanych klinicznych przypadkach parwowirusy może wskazywać na wystarczające zabezpieczenie psów przed zachorowaniami.

Badania molekularne przy użyciu techniki PCR wykazały u 9,5% psów z objawami biegunki obecność wirusowego DNA CPV-2. Dodatkowo wyniki PCR uzyskano od psów w wieku od 6 miesięcy do 2. roku życia. Produkty amplifikacji DNA szczepu wzorcowego CPV-2 oraz badanych próbek były identyczne i miały wielkości 1278 pz. Po trawieniu uzyskanych produktów amplifikacji enzymem restrykcyjnym RsaI uzyskano 6 fragmentów DNA. Analiza porównawcza szczepu wzorcowego i badanych próbek DNA wykazała 4 odmienne wzory restrykcyjne (ryc. 3 i 4). Stwierdzono, że wzór restrykcyjny szczepu wzorcowego CPV-2 nieznacznie różnił się od wzoru próbki nr 5.

Różnica ta dotyczyła przesunięcia się fragmentu F. Z kolei próbki DNA nr 2, 3 i 6 od chorych psów były podobne i charakteryzowały się występowaniem dodatkowego fragmentu B₁ o wielkości około 300 pz. Natomiast wzory restrykcyjne DNA próbek 4, 7 i 8 różniły się od pozostałych próbek brakiem fragmentu D. Uzyskane wyniki analizy restrykcyjnej pozwalają sądzić, że amplifikowane szczepy należą do różnych biotypów antygenowych parwowirusa (19). Analogiczne wyniki uzyskano przy trawieniu restryktazą Alu I. Cięcie tym enzymem produktu PCR dało 5 fragmentów o łącznej wielkości około 1270 pz. Wzór szczepu wzorcowego różnił się od wzorów restrykcyjnych pozostałych 6 próbek. Ustalono, że próbki 2, 3 i 6 miały identyczny profil ułożenia fragmentów DNA i różniły się od pozostałych próbek występowaniem fragmentu B₁ oraz brakiem fragmentu C. Natomiast analiza DNA próbek 4, 7 i 8 wykazała pojawienie się dodatkowego fragmentu D₁.

Przedstawione dane są zbieżne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów (5, 7, 13, 19, 21). Zwraca się w nich uwagę m.in. na dużą zmienność genoty-

pową i fenotypową CPV-2 oraz na fakt, że wystąpienie klinicznej postaci choroby może mieć ścisły związek z określonym biotypem antygenowym wirusa. Carmichel (3) stwierdził, że np. pojawiające się „nowe” szczepy wirusa wywołują objawy chorobowe o przebiegu nadostym, zwykle kończące się zejściem śmiertelnym. Badania Greenwooda i wsp. (5) nad izolatami terenowymi CPV-2 wykazały, że mimo występowania trzech wariantów wirusa, stosowane szczepionki skutecznie chroniły przed zachorowaniami. Na podobieństwo między szczepami izolowanymi od psów i wilków na terenie Włoch zwraca uwagę Battiliani i wsp. (1), którzy wykazali, że zwierzęta dzikie mogą być rezerwuarem tego wirusa. Z kolei w Polsce Rypuła i wsp. (21), stosując metodę sekwencjonowania kwasów nukleinowych, stwierdzili, że homologia pomiędzy nukleotydami konserwatywnego regionu genów VP1 i VP2 szczepów CPV-2 izolowanych z terenu Wrocławia wynosiła 88%. Duże znaczenie w rozprzestrzenianiu CPV-2 odgrywa aktualna sytuacja epidemiologiczna w danym środowisku. Praktycznie do zakażenia najczęściej dochodzi w hodowlach psów przy równoczesnym nieprzestrzeganiu podstawowych zasad sanitarno-higienicznych (6, 8, 11, 12). Rozprzestrzenianiu zakażeń CPV-1 sprzyja także zakup i transport zwierząt o nieznanym statusie immunologicznym.

Reasumując należy stwierdzić, że stosowane szczepienia psów przeciwko parwowirowi stwarzają szansę skutecznego zabezpieczenia przed zachorowaniami. Sporadyczne przypadki parwowirowy u szceniąt i młodych psów mogą być związane z brakiem odporności na zakażenie dzikimi szczepami CPV-2 występującymi w środowisku zwierząt.

Pismienictwo

- Battiliani M., Ciulli S., Tisato E., Prosperi S.: Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. *Virus Res.* 2002, 26, 149-157.
- Böhm M., Thompson H., Weir A., Hasted A. M., Maxwell N. S., Herrtage M. E.: Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *Vet. Rec.* 2004, 154, 457-463.
- Carmichel L. E.: Canine viral vaccines at a turning point – a personal perspective. *Adv. Vet. Med.* 1999, 41, 289-307.
- Górski J., Górski Cz., Arciuch B., Arciuch H.: Etiologia i rozpoznawanie parwowirusowej choroby psów. *Medycyna Wet.* 1983, 39, 710-714.
- Greenwood N. M., Chalmers W. S. K., Baxendale W., Thomson H.: Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains. *Vet. Rec.* 1995, 136, 63-67.
- Hepper P. G.: Prevalence of disease in dogs purchased from an animal rescue shelter. *Vet. Rec.* 1999, 144, 35-38.
- Hirasawa T., Yono K., Mikazuki K.: Differentiation of wild and vaccine type canine parvoviruses by PCR and restriction enzyme analysis. *J. Vet. Med. B* 1995, 42, 601-610.
- Hulas C.: Próby izolacji i identyfikacji czynnika wywołującego enzoootyczne występujące zachorowania psów obejmujące zaburzenia przewodów pokarmowych. Praca dokt. SGGW, Warszawa 1985.
- Hulas C., Anusz K., Leśniewski S. F., Dobrzyński A.: Szybka diagnostyka zakażeń wirusem CPV-2 u psów. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 175-179.
- Kopczewski A.: Immunoprofilaktyka chorób zakaźnych psów i kotów oraz zwierząt futerkowych. *Lek w Polsce* 1995, 1, 17-28.
- Lund E. M., Armstrong P. J., Kirk C. A., Kolar L. M., Klausner J. S.: Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J. Am. Vet. Assoc.* 1999, 214, 1336-1341.
- McCaw D. L., Thompson M., Tate D., Bonderer A., Chen Y. J.: Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 213, 72-75.
- Mizak B., Plucienniczak A.: Antigenic typing Polish isolates of canine parvovirus. *Bull. vet. Inst. Puławy* 1995, 39, 71-76.
- Mizak B., Rzeżutka A.: Application of nested PCR for the detection of canine parvovirus in faces. *Bull. vet. Inst. Puławy* 1999, 43, 19-24.
- Mouzin D. E., Lorenzen M. J., Haworth J. D., King V. L.: Duration of serologic response to five viral antigens in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, 224, 55-60.
- Murphy F. A., Gibbs E. P. J., Horzinek M. C., Studdert M. J.: *Veterinary Virology*. Academic Press, New York 1999, s. 343-356.
- Olson P., Hedhammar A., Klingeborn B.: Canine parvovirus infection, canine distemper and infectious canine hepatitis: inclination to vaccinate and antibody response in the Swedish dog population. *Acta Vet. Scand.* 1996, 37, 433-443.
- Pollock R. V. H., Carmichael L. E.: Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer decline and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982, 180, 37-39.
- Pollock R. V. H., Coyone M. J.: Canine parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1993, 23, 555-569.
- Pratelli A., Cavalli A., Martella V., Tempesta M., Decaro N., Carmichel L. E.: Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV-2 or CPV-2b modified live virus vaccine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8, 612-615.
- Rhode S. L.: Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J. Virol.* 1985, 54, 630-633.
- Rypuła K., Chmielewski R., Śmiełowska-Łoś E., Klimentowski S.: Phylogenetic similarity of the canine parvovirus wild-type isolates on the basis of VP1/VP2 gene fragment sequence analysis. *J. Vet. Med. B* 2002, B, 49, 142-145.
- Smith C. A.: Current concepts: Are we vaccinating too much? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995, 207, 421-425.
- Smith J. R., Johnson R. H.: Observations on the use of an inactivated canine parvovirus vaccine. *Vet. Rec.* 1986, 118, 385-387.
- Toman M., Svoboda M., Rybníček J., Krejci J., Svobodova V.: Secondary immunodeficiency in dogs with enteric, dermatologic, infectious or parasitic diseases. *Zentbl. Vetmed. B* 1998, 45, 321-334.
- Trutwein G., Hewicker-Trautwein M.: Immuno pathogenesis of virus diseases of cats and dogs. *Tierärztl. Prax.* 1994, 22, 63-72.
- Tryen U.: Canine parvovirus. [w:] Carmichael L.: *Recent Advances in Canine Infectious Canine Parvovirus Diseases*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, s. 247-257.

Adres autora: doc. dr hab. Andrzej Salwa, ul. Chałubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk; e-mail: a.salwa@gdansk.wiw.gov.pl