

RISULTATI DI UN TEST RFLP SU CEPPI VACCINALI DI CANINE DISTEMPER VIRUS IN ITALIA

Mira F., Purpari G., Gucciardi F., Di Bella S., Guercio A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Via G. Marinuzzi, 3 – 90129 Palermo

Key words: Canine Distemper Virus, PCR-RFLP, sequence analysis

SUMMARY

Canine Distemper (CD) is a highly contagious and multisystemic viral disease of domestic and wild carnivores. A published Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) test, based on the presence of a PstI cleavage site on hemagglutinin (H) gene, allows a rapid differentiation of all currently used vaccine strains by virulent field strains. The present study describes the results of this test carried out on different CD vaccines available in Italy in 2010. RFLP has also revealed that the CD strain present in the Vanguard (Pfizer Animal Health) vaccine reacts as a wild-type strain. Moreover, genetic analysis of H gene sequence has showed that Vanguard vaccine strain does not cluster in the group of vaccine strains (America-1), as expected based on the product description provided by the manufacturer, but it is more closely related to wild-type strains of the America-2 group. However, this protocol shows significant advantages to identify CD wild-type strains.

INTRODUZIONE

Il Cimurro è una malattia infettiva contagiosa che colpisce carnivori domestici e selvatici. Questa malattia è causata dal *Canine Distemper Virus* (CDV), un virus appartenente al genere *Morbillivirus*, della famiglia *Paramyxoviridae*. Da molti anni vengono impiegati vaccini vivi attenuati per il controllo della malattia, allestiti con i ceppi Onderstepoort, Snyder-Hill, Rockborn, Lederle e Convac. Studi filogenetici effettuati su questi ceppi vaccinali hanno messo in evidenza la loro appartenenza al lineage America-1 ed il raggruppamento di questi in un cluster distinto rispetto ai ceppi wild-type isolati appartenenti allo stesso lineage (2, 4). Nel corso di accertamenti di laboratorio eseguiti su animali recentemente vaccinati, il ceppo virale presente nel vaccino potrebbe interferire con la RT-PCR, portando a risultati diagnostici controversi. Analisi molecolari effettuate su casi clinici di cani recentemente vaccinati non hanno messo in relazione l'agente causale con alcuno dei ceppi vaccinali di uso corrente (4, 5), tuttavia casi di animali vaccinati in cui era possibile evidenziare il ceppo vaccinale per un breve periodo di tempo sono stati descritti (3). Al fine di escludere tali dati fuorvianti vari Autori hanno ritenuto opportuno valutare la possibilità di realizzare dei saggi biomolecolari in grado di discriminare i ceppi vaccinali da quelli di campo. Un test di RT-PCR associato ad una RFLP è stato messo a punto per la differenziazione tra virus wild-type e ceppi vaccinali (1). Il test è stato sviluppato sull'evidenza nucleotidica della presenza di un sito di clivaggio per l'enzima PstI nel gene dell'emoagglutinina (H) caratteristico dei ceppi vaccinali di CDV e quindi in grado di differenziare questi dai ceppi di campo. Gli Autori del presente lavoro, durante l'esame di vaccini vivi attenuati per il CDV disponibili in commercio sul territorio nazionale, hanno messo in evidenza che il ceppo vaccinale presente nel vaccino Vanguard (Pfizer Animal Health, USA), con questo protocollo diagnostico, mostrava un profilo di restrizione uguale ai ceppi wild-type, contrariamente a quanto atteso per il ceppo vaccinale dichiarato. Questo studio riporta, quindi, l'esito dell'indagine effettuata su vaccini vivi attenuati verso il Cimurro commercializzati in Italia ed il risultato controverso mostrato dal ceppo vaccinale presente in uno di questi prodotti.

MATERIALI E METODI

Per il presente studio è stata testata una dose di cinque differenti vaccini per CDV in commercio in Italia nel 2010 (Tabella 1). I vaccini sono stati conservati alla temperatura raccomandata e sono stati ricostituiti secondo le indicazioni del produttore. L'RNA virale è stato estratto utilizzando il kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) ed è stato conservato alla temperatura di -80°C. Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo CDV Bussell di riferimento, clone del ceppo vaccinale Onderstepoort adattato alla crescita nella linea cellulare VERO Orwel (African green monkey kidney). Sono state quindi ottimizzate una RT-PCR One Step (QIAGEN, OneStep RT-PCR Kit) ed una PCR-RFLP utilizzando l'enzima PstI, secondo il protocollo suggerito da Demeter Z. et al. (1). I prodotti di amplificazione ottenuti dai ceppi vaccinali attraverso uno specifico set di primers (1), sono stati purificati utilizzando il kit illustra™ GFX PCR DNA, Gel Band Purification (GE Healthcare) e sono stati sottoposti a sequenziamento dalla ditta BMR Genomics, Padova. Le sequenze nucleotidiche del gene dell'emoagglutinina (H) ottenute sono state allineate con quelle di altri ceppi CDV disponibili in GenBank.

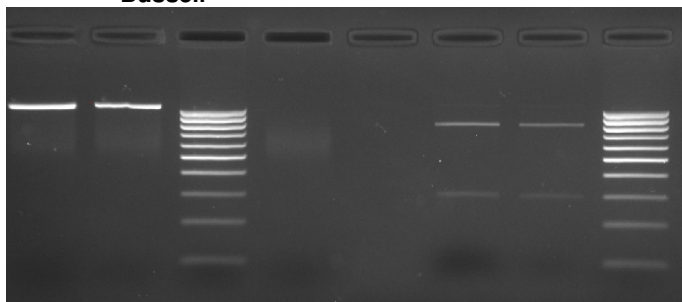
Tabella 1 – Vaccini oggetto di studio

Vaccino	Ceppo Vaccinale	Lotto
Canigen Ceppi+L (Virbac Srl)	Non dichiarato	2SB9
Duramune® Puppy DP+C (Fort Dodge)	Ondestepoort	370AY9001
Eurican Tetra (Merial Tetra Spa)	Non dichiarato	L361281
Nobivac Ceppi (Intervet Italia Srl)	Ondestepoort	A227B01
Vanguard 7 (Pfizer Animal Health)	Snyder-Hill	L94377

RISULTATI

L'RT-PCR One Step ha mostrato per tutti i campioni in esame il prodotto di amplificazione di 1110 bp atteso. L'RFLP ha evidenziato un prodotto di digestione costituito da due differenti bande di 816 bp e di 294 bp per il controllo positivo e per tutti i ceppi vaccinali, eccetto che per il vaccino Vanguard 7, che è rimasto non digerito (1110 bp) (Figura 1). Questo risultato è determinato dalla mancanza nella sequenza nucleotidica del gene H del ceppo vaccinale del Vanguard 7 del sito di clivaggio per l'enzima PstI. L'analisi delle sequenze nucleotidiche ha inoltre mostrato che il ceppo vaccinale Vanguard 7 ha un maggiore correlazione con i ceppi wild-type del gruppo America-2, rispetto al ceppo Snyder Hill dichiarato dal produttore o agli altri ceppi vaccinali oggetto di studio. Tutti gli altri ceppi vaccinali risultano correlati al gruppo America-1.

Figura 1 – RFLP del vaccino Vanguard 7 e del Ceppo CDV Bussell



CONCLUSIONI

Nel presente studio è stato applicato un metodo di PCR-RFLP in grado di differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi wild-type di cui si conosce la sequenza. Il metodo applicato ai ceppi vaccinali in commercio in Italia ha mostrato come il ceppo di CDV presente nel vaccino Vanguard produce un profilo di restrizione equiparabile ad un ceppo wild-type. Questo risultato era già stato segnalato in lotti differenti dello stesso vaccino distribuito in Ungheria (2). L'analisi di sequenza del gene H evidenzia come questo ceppo vaccinale sia maggiormente correlato a ceppi wild-type rispetto al ceppo dichiarato Snyder Hill o agli altri ceppi vaccinali in commercio, appartenenti al lineage America-1. Tale osservazione è stata riportata anche da altri gruppi di ricerca (2, 5, 6). Il presente lavoro è la prima segnalazione in Italia della presenza nel vaccino Vanguard in commercio in Italia di un ceppo differente da quello dichiarato e conferma la maggiore correlazione di questo ceppo vaccinale al gruppo America-2, come già evidenziato in Nord America ed in Ungheria. Pertanto, in caso di animali vaccinati con questo vaccino, non è possibile discriminare mediante tale protocollo di RT-PCR e RFLP la presenza di genoma virale appartenente al ceppo wild-type da quello di origine vaccinale. Per ovviare a questo limite è possibile ricorrere al sequenziamento degli amplificati ottenuti e alla loro comparazione con sequenze note di CDV disponibili in GenBank, considerato che anche le sequenze del ceppo utilizzato nel vaccino Vanguard sono depositate, con i seguenti numeri di accesso: EF095750 (H gene), EU072198 (F gene), EU072199 (M gene), EU072200 (N gene) e EU072201 (P gene). Risulta inoltre utile, ai fini diagnostici, conoscere la storia vaccinale del soggetto al momento dell'esecuzione dei tests di biologia molecolare. Sebbene la tecnica RFLP proposta da Demeter et al. (1), presenti dei limiti, la stessa mostra significativi vantaggi rispetto ad altri metodi diagnostici e risulta utile quale prova di screening per evidenziare ed identificare i ceppi wild-type di CDV circolati nel territorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Demeter Z., Lakatos B., Palade E.A., Kozma T., Forga'ch P., Rusva M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122: 258–269.
2. Demeter Z., Palade E.A., Hornyák A., Rusvai M. (2010). Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet Microbiol.* 142(3-4) :420-6.
3. Greene C.E., Appel M.J. (2006). Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders-Elsevier, pp.25–41.
4. Martella V., Elia G., Lucente M.S., Decaro N., Lorusso E., Ba'nyai K., Blixenkron-Møller M., Lan N.T., Yamaguchi R., Cirone F., Carmichael L.E., Buonavoglia C. (2007). Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet. Microbiol.* 122: 32–42.
5. Pardo D.R., Johnson G.C., Kleiboeker S.B. (2005). Phylogenetic Characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5009–5017.
6. Radtanakattikanon A., Keawcharoen J., Charoenvisal N.T., Poovorawan Y., Prompetchara E., Yamaguchi R., Techangamsuwan S. (2013). Genotypic lineages and restriction fragment length polymorphism of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol.* 166(1-2): 76-83.