

Patogeneza i diagnostyka parwowirozy psów oraz genotypowanie CPV-2

Marek Kowalczyk¹, Katarzyna Skrzypek², Andrzej Jakubczak¹

z Instytutu Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki¹ oraz Sekcji Biotechnologii Zwierząt Studenckiego Koła Biotechnologów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie²

Przestawiciele rodziny Canidae byli jednymi z pierwszych zwierząt udomowionych przez człowieka. Intensywna i długotrwała praca hodowlana doprowadziła do powstania wielu ras i odmian barwnych tych zwierząt o różnym przeznaczeniu użytkowym. Istotnym zagrożeniem dla dobrostanu zwierząt są choroby zakaźne, w przypadku psów jedną z najczęściej występujących chorób jest parwowiroza wywoływana przez wirusa CPV-2 (canine parvovirus type 2).

Patogen zakaża psy niezależnie od wieku i rasy. Ostry przebieg, wysoka śmiertelność wśród szceniąt poniżej 6. miesiąca życia oraz nieswoiste objawy sprawiają, że parwowiroza jest uznawana za jedną z najgroźniejszych chorób dotyczących psy. Choroba jest wywoływana przez bezotczkowego wirusa ssDNA. Mimo powszechnej profilaktyki opartej na szczepieniach patogen wciąż stanowi istotne i powszechne zagrożenie.

Patogeneza

Pierwsze zakażenie parwowirusem psim zostało zano-towane w latach 70. ubiegłego wieku w Stanach Zjed-noczonych. Do Polski CPV-2 trafił w 1979 r., pierwot-nie diagnozowano go w województwach zachodnich, a 2. lata później zakażenia były notowane na terenie całego kraju (1).

Do infekcji dochodzi poprzez kontakt z odchodami zakażonych zwierząt, które zawierają aktywne wiriony. Parwovirus wykorzystuje receptor transferyny typu 1, aby dostać się do komórki gospodarza (2). Po pierwotnym kontakcie z czynnikiem etiologicznym dochodzi do jego replikacji w gardle i miejscowej tkance limfoidalnej. W kolejnych dniach pojawia się wiremia i transport wirionów do komórek docelowych, którymi w przypadku CPV-2 mogą być komórki nabłonkowe krypt jelita cienkiego, jak też szpik kostny czy komórki mięśnia sercowego (3). Wysoka śmiertelność wśród szczeniąt, przekraczająca 90%, wynika z powinowactwa wirusa do szybko dzielących się komórek mięśnia sercowego, w rezultacie czego rozwija się zapalenie. Postać ser-cowa choroby jest coraz mniej powszechna w związku z intensywną immunoprofilaktyką, jak i obecnością przeciwciał matczynych w organizmie szczeniąt.

Obraz kliniczny u osobników dorosłych jest efektem zajęcia przez patogen komórek nabłonka krypt jelit. Wirus, kolonizując kosmki jelitowe, prowadzi do ich zapadania się, zmniejszenia zdolności chłonnych i rozwoju krwotocznego zapalenia jelit. Objawy postaci jelitowej choroby są nieswoiste, w początkowych eta-pach pojawia się osowienie, utrata apetytu, a nastę-pnie, w skutek stanu zapalnego błony śluzowej jelita, wymioty, wzrastająca gorączka oraz wodnista biegunka, czasem z domieszką krwi (4). Zmianie ulegają także parametry morfologiczne i biochemiczne krwi, u za-kazanych osobników może wystąpić leukopenia, jako efekt zajęcia przez CPV-2 komórek szpiku kostnego. Wymioty i biegunka prowadzą do zaburzenia gospo-darki elektrolitowej i równowagi kwasowo-zasadowej. Wraz z postępem choroby dochodzi do odwodnienia, utraty elektrolitów oraz hipoglikemii, które w połącze-niu z wtórnymi zakażeniami i szokiem hipowolemicz-nym często prowadzą do zejścia śmiertelnego (1, 5).

Wirus jest siany zarówno przez osobniki zakażone, jak i bezobjawowych nosicieli wraz ze śliną, kałem czy wymiocinami. Największe znaczenie dla rozprzestrze-niania się CPV-2 ma droga pozioma, jednak możliwe są także zakażenia pionowe, ponieważ wirus posiada zdolność do pokonania bariery łożyskowej (1). Parwowirusy wykazują wysoką trwałość w środowisku zewnętrznym dzięki znacznej tolerancji na zmiany temperatury i pH (5), wirus zdeponowany w środowisku w trakcie okresu jesiennego i zimowego zachowuje zdolność do zakażania gospodarza przez kilka miesięcy (1, 6), w ten sposób aktywne wiriony mogą wywoływać zakażenia u zwie-rząt wprowadzanych do zanieczyszczonego otoczenia.

Charakterystyka molekularna CPV-2

Materiał genetyczny CPV-2 stanowi jednoniciowy DNA (ssDNA) o długości 5,3 kb. Dwie otwarte ramki od-czytu umożliwiają translację fragmentów kodujących

Pathogenesis and diagnostics of canine parvovirus and genotyping of CPV-2

Kowalczyk M.¹, Skrzypek K.², Jakubczak A.¹, Institute of Biological Basis of Animal Production, Faculty of Biology, Animal Sciences and Bioeconomy¹, Student Circle of Biotechnologists², University of Life Sciences in Lublin

This article aims at the presentation of some important aspects concerning canine parvovirus. Canine parvovirus is a highly contagious viral disease that causes high mortality among puppies. Infection with CPV-2 leads to development of intestinal form and hemorrhagic enteritis with vomiting, bloody diarrhea, weight loss and emaciation. The causative agent is a non-enveloped ssDNA virus belonging to *Parvoviridae* family. Virus has strong tropism to actively dividing host cells. CPV-2 has a very high rate of mutation, what has resulted in emergence of three antigenic variants which soon replaced primary strain. Rapid evolution of CPV-2 has stimulated searching for new diagnostic methods and the updating information about molecular diversity of this virus, what may be helpful in designing of efficacious immunoprophylaxis. The aim of this paper was to describe current procedures in diagnostics and genotyping of CPV-2.

Keywords: canine parvovirus, CPV-2, genotyping.

dwa białka niestrukturalne (NS1, NS2) oraz dwa białka strukturalne (VP1 i VP2), w trakcie cyklu rozwojowego wirusa w efekcie trawienia przez proteazy gospodarza białka VP2 powstaje także białko VP3 (7). W ciągu 3 dekad powstały 3 główne warianty wirusa: CPV-2a, CPC-2b i CPV-2c (5). Wirus parwowirusy psów wywo-dzi się prawdopodobnie od wirusa panleukopenii ko-tów, który pierwotnie zakażał dzikich przedstawicie-li rodziny Felidae. Podobieństwo genetyczne między FPV (feline panleukemia virus) a CPV-2 wynosi ponad 99%, wirus w wyniku zmian w sekwencji aminokwas-owej mógł zaadaptować się do nowego gospodarza i dać początek nowej linii patogenu (8). Wysokie tempo ewolucji wirusa przekłada się w dużej mierze na jego patogenność i zdolność kolonizacji nowych nisz eko-logicznych. Jeden z wariantów CPV-2 był wykrywa-ny w odchodach szopów, co potwierdza, że mogą one być alternatywnym gospodarzem. Wirus zakażający szopy był prawdopodobnie stadium pośrednim mię-dzy pierwotnym szczepem CPV-2 a nowo powstałym wariantem 2a (2).

Dowodem na wysoką adaptatywność patogenu jest fakt, że już pod koniec lat 80. macierzysty wariant CPV-2 został całkowicie wyparty przez nowo powstałe warianty CPV-2a i CPV-2b (5), które różniły się między sobą pojedynczą zmianą aminokwasową w sekwencji białka VP2. Na początku XXI w. we Włoszech potwier-dzono występowanie kolejnego wariantu, który nazwa-no CPV-2c (9), różnił się od dotychczasowego szcze-pu 2b pojedynczą zmianą aminokwasową w głównym regionie epitopowym. Znaczna zmienność i powsta-wanie nowych typów antygenowych wirusa są zwią-zane z wysokim tempem mutacji, podobnym do tego występującego u wirusów RNA (10).

Powstawanie nowych typów antygenowych i za-stępowanie wariantu pierwotnego jest efektem wzro-stu dopasowania wirusa do populacji gospodarza. Badania wskazują, że substytucja prowadząca do za-stąpienia kwasu asparaginowego przez glutaminę

w 426 pozycji aminokwasowej może zwiększać zdolność wirusa do wiązania się z receptorem transferyny (11). Różnicujący aminokwas zajmuje szczególnie miejsce w konformacji białka VP2, ponieważ wchodzi w skład głównego regionu antygenowego, nazywanego też epitopem A (12). Za lepszymi zdolnościami adaptacyjnymi CPV-2a, 2b i 2c przemawia fakt, że nowe warianty mają szersze spektrum zakaźne. Klasyczny CPV-2 replikował się wyłącznie w komórkach psów, podczas gdy CPV-2a i 2b mają zdolność do replikacji w komórkach kotów domowych czy szopów (*Procyon lotor*; 2).

Polimorfizmy w regionach antygenowych, mogą ułatwiać unikanie mechanizmów odpornościowych gospodarza oraz przeciwciał skierowanych przeciw innemu typowi antygenowemu. Wysoka zmienność wirusa utrudnia nie tylko działania profilaktyczne, ale także diagnostykę. Testy serologiczne oparte na reakcji antygen–przeciwciała wykazują wysoką specyficzną wobec konkretnego epitopu, polimorfizmy w białku VP2 odpowiadającym za właściwości antygenowe mogą być przyczyną wyników fałszywie ujemnych badań diagnostycznych. Również testy molekularne oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych są w dużej mierze zależne od znajomości epidemiologii molekularnej. Najpowszechniejszą molekularną techniką jest metoda PCR, w przypadku której krótkie fragmenty oligonukleotydowe hybrydują do komplementarnej sekwencji w genomie wirusa. Zmiany w sekwencji wiązania startera również mogą być przyczyną wyników fałszywie ujemnych.

Coraz większego znaczenia nabierają analizy prowadzące do ustalenia epidemiologii molekularnej CPV-2 na danym obszarze (9, 13). Informacje o wariantach genetycznych patogenu pozwalają nie tylko na wnioskowanie o kierunku jego ewolucji, ale także odgrywają istotną rolę w immunoprofilaktyce, doborze odpowiednich antygenów szczepionkowych, jak i aktualizacji testów diagnostycznych.

Diagnostyka CPV-2

Metodami bezpośrednimi detekcji parwowirusów są mikroskopia elektronowa oraz izolacja patogenu na liniach komórkowych i obserwacja efektu cytopatycznego (4). Ze względu na stosunkowo niską czułość diagnostyki opartej na mikroskopii elektronowej i długi czas oczekiwania na wyniki z hodowli komórkowych wprowadzone zostały alternatywne metody diagnostyki.

Do detekcji wirusa używa się m.in. technik serologicznych, opartych na specyficjnej reakcji między antygenem a przeciwciałem. Wzrost miana przeciwciał występuje po około 3–5 dniach od zakażenia i jest wykrywany przy pomocy takich metod jak test ELISA (14) czy test hemaglutynacji (15).

Powszechnie stosowaną metodą w diagnostyce parwowirusy jest odczyn hemaglutynacji oraz test zahamowania hemaglutynacji, wykorzystujące zdolność CPV-2 do aglutynacji erytrocytów. Materiałem badanym w przypadku testu inhibicyjnego jest surowica nanoszona na mikropłytkę, następnie do dołka dodaje się antygen CPV-2 oraz zawiesinę erytrocytów,

zwykle świń. W przypadku braku obecności przeciwciał przeciw CPV-2 w surowicy, antygen wirusowy powoduje aglutynację erytrocytów. Pojawienie się przeciwciał w badanej surowicy prowadzi do kompleksowania antygeny, zahamowania aglutynacji i osadzania się erytrocytów na dnie dołka (16). Test pozwala na określenie miana przeciwciał, ponadto jest stosunkowo tani i szybki, jednak jego wadą jest dość niska czułość oraz subiektywna ocena wizualna wyniku, zwłaszcza w przypadku niskiego miana wirusa, co w efekcie może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych (17).

Alternatywą są inne testy serologiczne polegające między innymi na detekcji antygeny wirusowego poprzez reakcję ze związanymi na nośniku przeciwciałami. Szybką metodą diagnostyczną opartą na specyficjnej zdolności przeciwciał do selektywnego wiązania z konkretnym antygenem są testy immunochromatograficzne (immunoaffinity chromatography – IAC). Oparte na metodzie IAC komercyjne testy paskowe pozwalają na jakościową ocenę obecności antygeny CPV-2 w kale psów. W metodzie tej specyficjne przeciwciała unieruchamiane są na nośniku stałym, na który następnie nanoszona jest badana próbka zawierająca antygeny wypłukane z kału i zawieszona w buforze (18). Obecność wirusa w próbce obserwuje się jako reakcję barwną. Mimo szybkości i łatwości wykonania testy immunochromatograficzne wykazują często niewystarczającą czułość i specyficjność, ponadto nie pozwalają na rozróżnienie, czy wykrywane przeciwciała są efektem zakażenia czy też stymulacji układu odpornościowego po szczepieniu (19). Niska swoistość jest spowodowana faktem, że wykorzystane w danym teście przeciwciała są specyficjne wobec konkretnego epitopu, wystąpienie różnic we fragmencie epitopowym, jak i potencjalne reakcje krzyżowe mogą skutkować wynikiem fałszywie ujemnym. Zafałszowanie wyniku badania może być też spowodowane obecnością przeciwciał kompleksujących antygen, przez co nie wiąże się on z przeciwciałami występującymi w zestawie diagnostycznym.

Inną techniką opartą na reakcji antygen–przeciwciała jest test ELISA (20). Opiera się ona na reakcji, w której przeciwciała umieszczone na nośniku łączą się w sposób wysoce specyficjny z antygenem występującym w próbce, wynik uwidacznia się poprzez reakcję barwną dzięki zastosowaniu odpowiedniego enzymu (4). Wadą metody jest fakt, że testy serologiczne w przypadku chorób wirusowych mogą wykazywać zbyt niską czułość i specyficjność, przez co diagnoza nie zawsze jest prawidłowa (21, 22).

Alternatywą dla technik serologicznych są metody molekularne oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych. Wiodącą techniką molekularną wykorzystywaną w diagnostyce chorób zakaźnych jest metoda łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (polymerase chain reaction) oraz jej modyfikacje, takie jak real-time PCR (23), multiplex PCR (24) czy nested PCR (25). Łańcuchowa reakcja polimerazy polega na cyklicznym powielaniu docelowej sekwencji flankowanej przez krótkie fragmenty oligonukleotydowe – startery, przez enzym – polimerazę. Produkty PCR wizualizuje się poprzez rozdział w żelu agarozowym, obecność jasnego prążka

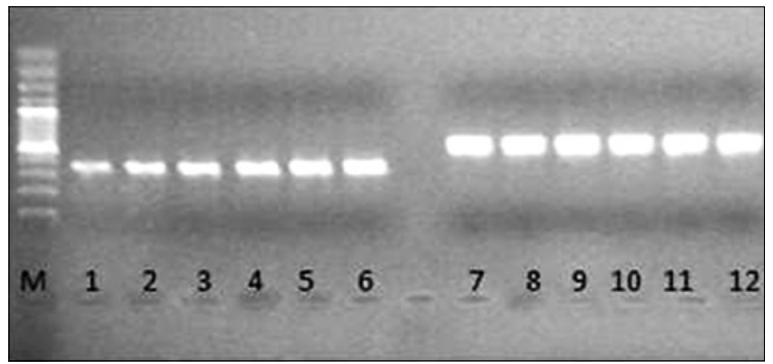
oznacza wynik pozytywny (ryc. 1). Do zalet techniki należy wysoka czułość i specyficzność, a także możliwość wykrywania materiału genetycznego patogenu na wczesnych etapach zakażenia.

Diagnostyka molekularna – mimo że wciąż nie jest powszechnie używana do wykrywania wirusa CPV-2, głównie ze względu na konieczność posiadania specjalistycznych urządzeń, takich jak termocyklery – zyskuje jednak coraz większe grono zwolenników, czego efektem jest powstawanie zestawów diagnostycznych i spadek cen badań bazujących na technikach molekularnych. W przypadku diagnostyki techniką PCR niezbędne są dodatkowe etapy obejmujące izolację DNA i weryfikację wyniku poprzez rozdział elektroforetyczny. PCR, jak każda technika diagnostyczna, jest podatna na wyniki fałszywie ujemne (mutacja w miejscu wiązania startera, obecność inhibitorów polimerazy), jak i dodatnie (niespecyficzna hybrydyzacja starterów), ponadto wysoka czułość wymusza ścisłe przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (stosowanie na każdym etapie kontroli dodatnich i ujemnych) w celu uniknięcia zafałszowań wyników będących rezultatem kontaminacji pomiędzy badanymi próbkami.

Wyższą czułość i specyficzność detekcji można osiągnąć dzięki modyfikacjom metody PCR, takim jak real-time PCR (qPCR – quantitative PCR) (26) czy nested PCR (27). Nested PCR jest modyfikacją klasycznego PCR odznaczającą się wyższą zarówno specyficznością, jak i czułością analizy (25). Składa się z dwóch oddzielnych PCR i wymaga dwóch par starterów. W pierwszej reakcji przy udziale jednej pary starterów amplifikowany jest dłuższy fragment DNA. Produkt pierwszej reakcji jest matrycą w reakcji następnej, w której druga para starterów przyłącza się w jego obrębie, pozwalając na amplifikację krótszego fragmentu, dając produkt bardziej specyficzny.

Metodą jakościowo-ilościową pozwalającą uzyskać informacje o ilości kopii materiału genetycznego wirusa jest PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR lub qPCR – quantitative PCR). Pozwala ona na monitorowanie przyrostu amplifikowanego fragmentu w trakcie analizy na podstawie pomiaru emitowanej fluorescencji. Dzięki zastosowaniu barwnika lub wyznakowanych sond możliwa jest obserwacja fluorescencji, która jest proporcjonalna do ilości DNA w badanej próbce (6). Do zalet qPCR należy wysoka czułość, wysoka powtarzalność oraz pominięcie etapu weryfikacji wyników amplifikacji poprzez rozdział w żelu.

Specyfika qPCR pozwala także na jednoczesne genotypowanie wirusa poprzez zastosowanie odpowiednio zaprojektowanych sond (23), czy też podejścia multiplex wykorzystującego kilka par starterów jednocześnie (28). Wysoka czułość metody real-time pozwala na detekcję wirusa nie tylko w standardowych próbkach kału, ale też w próbkach środowiskowych (29). Wdrożenie metod takich jak qPCR wydaje się trudne ze względu na stosunkowo wysoką cenę, konieczność posiadania termocyklerów pozwalających na analizę reakcji w czasie rzeczywistym, czy też posiadanie specjalistycznej wiedzy niezbędnej do zaprojektowania, przeprowadzenia i analizy wyników reakcji, niemniej jednak coraz większa liczba lecznic weterynaryjnych wykorzystuje w praktyce diagnostycznej metodę qPCR.



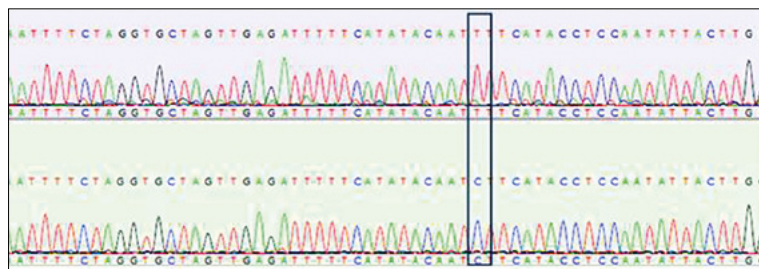
Ryc. 1. Optymalizacja reakcji PCR amplifikującej fragmenty białka VP2, M – marker wielkości 100 bp, studzienki 1-6 starter VPa – amplifikujący fragment sekwencji kodującej białko VP2 – długość – 1150 bp, studzienki 7-12 starter VPb – amplifikujący fragment sekwencji kodującej białko VP2 – długość 980 bp (badania własne)

Metody genotypowania CPV-2

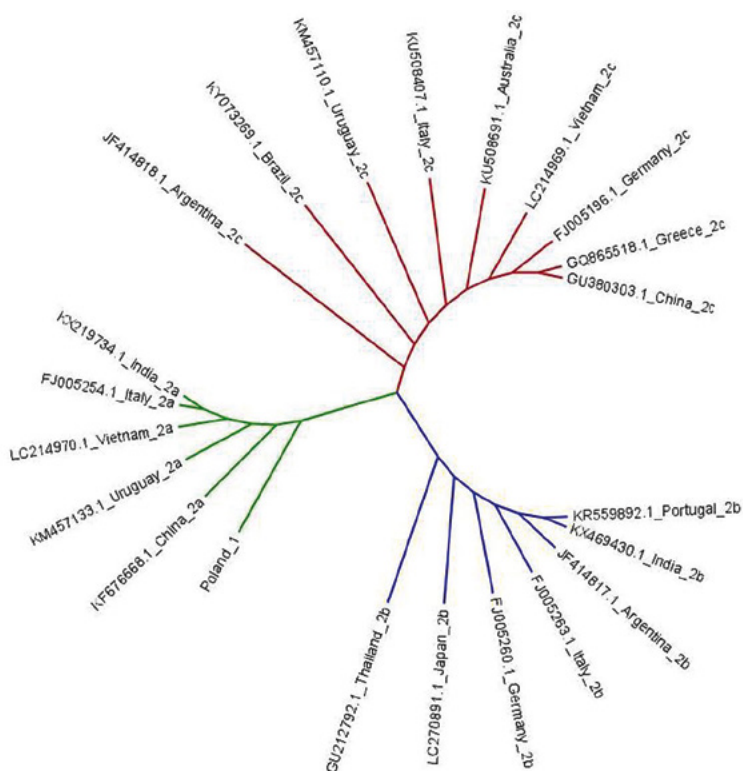
Standardowa diagnostyka parwowirusy jest coraz powszechniej uzupełniana badaniami pozwalającymi na określenie epidemiologii molekularnej patogenu na danym obszarze, co pozwala na dobór optymalnych antygenów szczepionkowych i analizę krążenia czynnika etiologicznego między populacjami. Metody pozwalające na określenie wariantów CPV-2 w dużej mierze bazują na technikach molekularnych. PCR może być zarówno metodą typu end-point, jak też etapem wstępnym dla innych technik, które pozwalają na dalszą charakterystykę wirusa. Techniki biologii molekularnej, takie jak sekwencjonowanie połączone z analizą bioinformatyczną, umożliwiają molekularną charakterystykę patogenu i przypisanie go do konkretnego szczepu lub grupy filogenetycznej.

Jedną z metod genotypowania jest oparta na enzymach restrykcyjnych technika RFLP (restriction fragment length polymorphism), pozwalająca na rozróżnienie dzikich szczepów wirusa krążących w populacji od szczepów użytych w szczepionkach. W ten sposób możliwa jest skuteczna diagnostyka i różnicowanie wariantów patogenu, na krótko po szczepieniu, bez ryzyka powstania wyników fałszywie dodatnich, które mogłyby pojawić się zarówno w przypadku technik serologicznych, jak i metody PCR. Technika RFLP opiera się na analizie różnic wynikających z pojawienia się lub utraty miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Badaną próbkę poddaje się badaniu PCR z odpowiednio dobranymi starterami w celu powielenia pożądanego fragmentu DNA, następnie zamplifikowany fragment jest poddawany trawieniu enzymami restrykcyjnymi, które tną dwuniciową cząsteczkę DNA w miejscach występowania charakterystycznej dla danego enzymu sekwencji palindromowej. Ilość miejsc restrykcyjnych oraz ich rozkład determinują ilość i długość powstałych po trawieniu fragmentów, po rozdzieleniu na żelu otrzymuje się więc charakterystyczny dla danego wariantu wirusa układ prążków.

Parwowirusy wykazują wysokie tempo mutacji, przez co polimorfizm RFLP oraz genotypowanie metodą qPCR nie zawsze są w pełni wystarczające do molekularnej charakterystyki patogenu. Poznanie sekwencji kodującej polimorficzny fragment genomu pozwala na przeprowadzenie dodatkowych analiz



Ryc. 2. Wyniki sekwencjonowania fragmentu białka VP2 wirusa CV-2 ze wskazaniem polimorficznego nukleotydu. Substytucja cytozyny na tyminę w sekwencji kodującej białko VP2 wirusa CPV-2 (badania własne)



Ryc. 3. Analiza filogenetyczna wariantów z bionformatycznych baz danych i izolatu otrzymanego w trakcie badań, kolor zielony – CPV-2a (w tej grupie zawarty został polski izolat CPV-2), niebieski – CPV-2b, czerwony CPV-2c (badania własne)

bioinformatycznych, ocenę stopnia polimorfizmu badanej puli patogenów i przypisanie ich do konkretnego typu antygenowego. Najpowszechniej stosowaną metodą sekwencjonowania jest metoda Sangera, która była wykorzystana podczas projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu. Technika pozwala na poznanie sekwencji relatywnie krótkich amplikonów w pojedynczej reakcji, co jednak nie jest ograniczeniem w przypadku genotypowania CPV-2, gdzie do określenia genotypu wystarcza fragment sekwencji białka VP2 (ryc. 2). Uzupełnieniem badań laboratoryjnych opartych na sekwencjonowaniu jest analiza bioinformatyczna, pozwalająca na ocenę stopnia konserwatywności sekwencji, wskazanie docelowych fragmentów do projektowania starterów, czy też określenie zmienności patogenu i jego relacji filogenetycznych z wariantami zdeponowanymi w bazach danych.

Ewolucja parwowirusów wiąże się z powstawaniem nowych wariantów antygenowych, które różnią

się odpowiedzią na powstałe po szczepieniu przeciwciała. Część badaczy wskazuje na obniżoną skuteczność szczepionek opartych na antygenie pochodzącym od wyjściowego szczepu CPV-2 w stosunku do nowo powstałego wariantu CPV-2c (30, 31). Stąd określenie wariantu patogenu dominującego w danym regionie może być pomocne przy wyborze i opracowaniu optymalnego antygeny szczepionkowego (32, 33). Monitorowanie ewolucji patogenu jest istotne także z perspektywy diagnostyki, wysoka zmienność w sekwencji nukleotydowej może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych, będących rezultatem zbyt niskiej specyficzności metody wymusza to ciągłą aktualizację zestawów wykorzystywanych w diagnostyce molekularnej CPV-2 (34).

Poznanie sekwencji nukleotydowej genów wirusa umożliwia badanie relacji filogenetycznych pomiędzy uzyskiwanymi wariantami. Do analiz filogenetycznych najczęściej wykorzystuje się sekwencje nukleotydową kodującą gen białka VP2, które odgrywa istotną rolę w patogenezie, ponadto polimorfizmy w nim występujące są podstawą do dzielenia patogenu na typy antygenowe (ryc. 3; 35, 36).

W ocenie epidemiologii molekularnej parwowirusy przydatne mogą być także metody oparte na wysokoprzepustowych technikach NGS (next generation sequencing) – sekwencjonowanie nowej generacji, pozwalające na analizy całych genomów. Istnieje wiele platform opartych na NGS, takich jak m.in. Solid czy Illumina. Analizy mogą być także ukierunkowane na badanie transkryptomu, co umożliwia wykrycie replikujących cząsteczek wirusa i ten sposób potwierdzenie aktywnego zakażenia, a nie samej obecności materiału genetycznego CPV-2 (37). Mimo ogromnej ilości danych generowanych przez techniki NGS praktyczne zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji jest ograniczone z uwagi na wysoki koszt analizy oraz skomplikowane metody analizy wyników.

Podsumowanie

Pomimo szczepień ochronnych parwowirusa pozostaje groźną chorobą zakaźną psów. Dotychczas najważniejszą rolę w badaniu i rozpoznawaniu parwowirusy odgrywały metody serologiczne opierające się na reakcji immunologicznej pomiędzy antygenem a przeciwciałem. Ze względu na wysokie tempo ewolucji wirusa tradycyjne techniki laboratoryjne często okazują się niewystarczające. Techniki biologii molekularnej znacznie poszerzają możliwości klasycznej diagnostyki. Metoda PCR pozwala na wcześniejsze wykrycie patogenu, co umożliwia szybsze podjęcie terapii, zwiększa szanse na przeżycie zakażonych zwierząt oraz ogranicza rozprzestrzenianie się wirusa.

Metody molekularne mogą uzupełniać rutynowo stosowane techniki diagnostyczne, zwłaszcza w przypadku prób dających niejednoznaczne i wątpliwe wyniki. W połączeniu z sekwencjonowaniem i analizą bioinformatyczną możliwe jest genotypowanie poszczególnych izolatów, śledzenie ewolucji wirusa oraz sporządzenie molekularnej charakterystyki patogenu występującego na określonym obszarze. Diagnostyka molekularna sprzężona z genotypowaniem może być

użyteczna zarówno z perspektywy badań podstawowych, jak i mieć aspekt aplikacyjny dla właścicieli i hodowców psów, którzy mogą przeciwdziałać rozprzestrzenianiu się zakażenia w hodowli poprzez szybsze i precyzyjniejsze wykrycie patogenu, ograniczyć straty powstałe w wyniku zakażenia, czy też określić skuteczność szczepienia. Wreszcie poznanie struktury genetycznej wirusa może być użyteczne dla diagnostów, w oparciu o uzyskane dane możliwe jest aktualizowanie stosowanych testów diagnostycznych.

Piśmiennictwo

- Gliński Z., Kostro K.: *Choroby zakaźne psów i kotów – odporność, patologia, terapia*. Warszawa 2005, Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne.
- Allison A.B., Harbison C.E., Pagan I., Stucker K.M., Kaelber J.T., Brown J.D., Ruder M.G., Keel M.K., Dubovi E.J., Holmes E.C., Parrish R.: Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. *J. Virol.* 2012, **86**(2), 865–872.
- Parrish C.R.: Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin. Haematol.* 1995, **8**, 57–71.
- Nandi S., Kumar M.: Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian J. Virol.* 2010, **21**, 31–44.
- Decaro N., Buonavoglia C.: Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 2012, **155**, 1–12.
- Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Campolo M., Di Trani L., Tarsitano E., Tempesta M., Buonavoglia C.: A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 2005, **105**, 19–28.
- Xu J., Guo H.C., Wei Y.Q., Shu L., Wang J., Li J.S., Cao S.Z., Sun S.Q.: Phylogenetic analysis of canine parvovirus isolates from sichuan and gansu provinces of China in 2011. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015, **62**, 91–95.
- Truyen U.: Evolution of canine parvovirus – A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 2006, **117**, 9–13.
- Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N., Carmichael L.: Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 2001, **82**, 3021–3025.
- Shackleton L.A., Parrish C.R., Truyen U., Holmes E.C.: High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, **102**, 379–384.
- 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.: Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, **13**, 1222–1224.
- Perez R., Bianchi P., Calleros L., Francia L., Hernandez M., Maya L., Panzera Y., Sosa K., Zoller S.: Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 2012, **155**, 214–219.
- Duque-García Y., Echeverri-Zuluaga M., Trejos-Suarez J., Ruiz-Saenz J.: Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrhetic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Vet. Microbiol.* 2017, **201**, 56–61.
- Proksch A.L., Unterer S., Speck S., Truyen U., Hartmann K.: Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *Vet. J.* 2015, **204**, 304–308.
- Kumar P., Garg S.K., Bandyopadhyay S.K., Singh R., Shrivastava S.: Haemagglutinating activity of canine parvovirus. *Indian J. Anim. Sci.* 2003, **73**, 123–125.
- Yan D., Byun J.-W., Song J.-Y., Yoon S.-S., Lee K.-W., Oh Y.-I.: Serological survey for canine parvovirus type 2a (CPV-2a) in the stray dogs in South Korea. *J. Bacteriol. Virol.* 2010, **40**, 77–81.
- Desario C., Decaro N., Campolo M., Cavalli A., Cirone F., Elia G., Martella V., Lorusso E., Camero M., Buonavoglia C.: Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods.* 2005, **126**, 179–189.
- Oh J.S., Ha G.W., Cho Y.S., Mm M.J., An D.J., Hwang K.K., Lim Y.K., Park B.K., Kang B.K., Song D.S.: One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006, **13**, 520–524.
- Ye S., Lambert S.B., Grimwood K., Roczo-Farkas S., Nimmo G.R., Sloots T.P., Kirkwood C.D., Whiley D.M.: Comparison of test specificities of commercial antigen-based assays and in-house pcr methods for detection of rotavirus in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2015, **53**, 295–297.
- Kumar M., Nandi S., Chidri S.: Development of a polyclonal antibody-based AC-ELISA and its comparison with PCR for diagnosis of canine parvovirus infection. *Virol. Sin.* 2010, **25**, 352–360.
- Rovida F., Campanini G., Sarasini A., Adzasehoun K.M.G., Piralla A., Baldanti F.: Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, **75**, 110–111.
- Ye S., Lambert S.B., Grimwood K., Roczo-Farkas S., Nimmo G.R., Sloots T.P., Kirkwood C.D., Whiley D.M.: Comparison of test specificities of commercial antigen-based assays and in-house PCR methods for detection of rotavirus in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2015, **53**, 295–297.
- Decaro N., Elia G., Desario C., Roperto S., Martella V., Campolo M., Lorusso A., Cavalli A., Buonavoglia C.: A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods.* 2006, **136**, 65–70.
- Eibach D., Krumkamp R., Hahn A., Sarpong N., Adu-Sarkodie Y., Leva A., Kasmaier J., Panning M., May J., Tannich E.: Application of a multiplex PCR assay for the detection of gastrointestinal pathogens in a rural African setting. *BMC Infect. Dis.* 2016, **16**. doi: 10.1186/s12879-016-1481-7.
- Kumar M., Chidri S., Nandi S.: A sensitive method to detect canine parvoviral DNA in faecal samples by nested polymerase chain reaction. *Indian J. Biotechnol.* 2011, **10**, 183–187.
- Mech L.D., AlMBERG E.S., Smith D., Goyal S., Singer R.S.: Use of real-time PCR to detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves. *J. Wildl. Dis.* 2012, **48**, 473–476.
- Mizak B., Rzezutka A.: Application of nested PCR for the detection of canine parvovirus in faeces. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 1999, **43**, 19–24.
- Kaur G., Chandra M., Dwivedi P.N., Narang D.: Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types. *J. Virol. Methods.* 2016, **233**, 1–5.
- Prieto A., Manuel Diaz-Cao J., Fernandez-Antonio R., Panadero R., Diaz P., Lopez C., Morrondo P., Diez-Banos P., Fernandez G.: Application of real-time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. *Vet. Microbiol.* 2014, **173**, 355–359.
- Decaro N., Desario C., Elia G., Martella V., Mari V., Lavazza A., Nandi M., Buonavoglia C.: Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 2008, **31**, 125–130.
- Wang J.K., Lin P., Zhao H., Cheng Y.N., Jiang Z., Zhu H.W., Wu H., Cheng S.P.: Continuing evolution of canine parvovirus in China: Isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP2 protein. *Infect. Genet. Evol.* 2016, **38**, 73–78.
- Zhao Y.B., Lin Y., Zeng X.J., Lu C.P., Hou J.F.: Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. *Virol. J.* 2013, **10**.
- Nandi S., Anbazhagan R., Kumar M.: Molecular characterisation and nucleotide sequence analysis of canine parvovirus strains in vaccines in India. *Vet. Ital.* 2010, **46**, 69–81.
- Kapil S., Cooper E., Lamm C., Murray B., Rezabek G., Johnston L., Campbell G., Johnson B.: Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 4044–4047.
- Raj J.M., Mukhopadhyay H.K., Thanissar J., Antony P.X., Pillai R.M.: Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* 2010, **10**, 1237–1241.
- Majer-Dziedzic B., Jakubczak A., Zietek J.: Phylogenetic analysis of canine parvovirus CPV-2 strains and its variants isolated in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2011, **14**, 379–384.
- Parker J., Murphy M., Hueffer K., Chen J.: Investigation of a canine parvovirus outbreak using next generation sequencing. *Sci. Rep.* 2017, **7**. doi: 10.1038/s41598-017-10254-9.

Mgr inż. Marek Kowalczyk, e-mail: markowx@wp.pl