

LA VARIANTE GLU-426 DEL PARVOVIRUS DEL CANE TIPO 2 (CPV-2) È DIFFUSA IN ITALIA

ALESSANDRA CAVALLI¹, VITO MARTELLA¹, NICOLA DECARO¹, GABRIELLA ELIA¹,
COSTANTINA DESARIO¹, DONATO NARCISI¹, MARCO CAMPOLO¹, CANIO BUONAVOGLIA¹

¹Dipartimento di Salute e Benessere Animale, Università di Bari

Riassunto

Nel 2000 in Puglia è stata identificata una nuova variante del parvovirus del cane (CPV-2) che differisce dal tipo antigenico 2b di CPV per una singola mutazione in un importante aminoacido, Asp-426 → Glu. Per questa ragione la variante è stata etichettata Glu-426. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la diffusione della variante Glu-426 di CPV-2 in diverse parti di Italia. Sono stati esaminati i virus isolati nel periodo 2001-2002 nonché virus isolati prima del 2000. L'analisi retrospettiva degli stipiti raccolti prima del 2000 ha messo in evidenza che la variante Glu-426 non era presente in Italia prima della sua iniziale identificazione. L'analisi degli stipiti isolati nel 2001-2002 ha evidenziato che CPV-2a è la variante antigenica più diffusa in Italia. Tre stipiti Glu-426 sono stati identificati nel 2001 e 9 nel 2002, mentre sono stati identificati 3 stipiti CPV-2b nel 2001 e 3 nel 2002. Questi risultati indicano che la mutazione nel residuo 426, in un epitopo immunodominante di CPV, ha fornito al virus mutante un sostanziale vantaggio evolutivo, rendendolo capace di sfuggire con efficacia alla pressione immunitaria esistente nella popolazione canina e favorendone la rapida diffusione.

Summary

A CPV-2 mutant was identified in 2000 in Apulia, Italy, differing from type 2b CPV in an important amino acid change, Asp-426 to Glu. To distinguish from the other CPV-2 strains, the mutant was named after this mutation as Glu-426 CPV-2. The aim of this work was to evaluate the diffusion of such CPV-2 variant in several areas of Italy. CPV-2 strains identified in 2001-2002 ad before 2000 as well, were analysed. Retrospective analysis on viruses collected before 2000 showed that the 426-Glu variant was not present in Italy before its first identification. Analysis of the strains isolated in 2001-2002 revealed that CPV-2a is currently the prevalent antigenic variant in Italy. Three Glu-426 strains were identified in 2001 and 9 in 2002, while a total of 3 type-2b CPVs were identified in 2001 and 3 in 2002. This suggests that the mutation at residue 426, in a immunodominant epitope of CPV, has provided the mutant with a certain evolutionary advantage, such as the capacity to escape efficiently the acquired immune pressure existing in the canine population, that allowed for the quick spread of the new strains.

INTRODUZIONE

Agli inizi degli anni '70 si iniziò ad osservare in tutto il mondo una nuova patologia infettiva dei cuccioli, caratterizzata da gastroenterite e miocardite. Mediante osservazioni al microscopio elettronico, nelle feci dei cuccioli colpiti si ritrovarono particelle virali riconducibili morfologicamente ad un parvovirus che, successivamente, fu isolato in vitro sia su cellule di cane che di gatto^{2, 7, 14, 15}. Il virus fu definito parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2) per

distinguerlo dal parvovirus del cane tipo 1 (CPV-1 o minute virus of canine, MVC)^{8, 9}.

CPV-2 possiede un DNA monocatenario di polarità negativa lungo circa 5200 basi. Il capsido di CPV-2 è un icosaedro di 26 nm di diametro costituito essenzialmente da una combinazione di due proteine, VP1 e VP2, prodotte mediante *splicing* alternato a partire dallo stesso RNA²⁵. Mediante analisi di sequenza, CPV-2 è risultato essere strettamente correlato al virus della panleucopenia del gatto (FPLV), da cui è probabilmente derivato, e anche al parvovirus del procione, del visone e della volpe artica, che sono tutti inclusi nel sottogruppo del parvovirus felino^{33, 20}. Pochi anni dopo la sua prima identificazione, due nuovi tipi antigenici di CPV-2, designati tipo 2a e tipo 2b, e distinguibili mediante anticorpi monoclonali

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 29/6/2004 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 1/12/2004”.

Tabella 1
Sostituzioni aminoacidiche nella proteina capsidica VP2 degli stipti parvovirus di referenza appartenenti al sottogruppo felino.
Le varianti parvovirus di recente identificazione sono anche riportate

| | | | Residuo | 87 | 101 | 265 | 297 | 300 | 305 | 426 | 555 |
|---------------|------------------------------|------------------------|----------------------|------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
| Tipo virale | Origine, anno | Strain | Animale | | | | | | | | |
| FPV | USA, 1967 | FPV-b | Gatto | Met | Ile | Thr | Ser | Ala | Asp | Asn | Val |
| MEV | USA, 1975 | MEV-b | Visone | Met | Ile | Thr | Ser | Val | Asp | Asn | Val |
| CPV-2 | USA, 1978 USA, 1978 | CPV-b CPV-Norden | Cane Cane | Met Met | Ile Ile | Thr Thr | Ser Ser | Ala Ala | Asp Asp | Asn Asn | Val Val |
| CPV-2a | USA, 1984 USA, 1983 | CPV-15 CPV-31 | Cane Cane | Leu Leu | Thr Thr | Thr Thr | Ser Ser | Gly Gly | Tyr Tyr | Asn Asn | Ile Ile |
| CPV-2b | USA, 1984 USA, 1990 | CPV-39 CPV-133 | Cane Cane | Leu Leu | Thr Thr | Thr Thr | Ser Ser | Gly Gly | Tyr Tyr | Asp Asp | Val Val |
| Asp-300 CPV-2 | Viet, 2000 Viet, 2000 | LCPV-V203 LCPV-V140 | Leopardo Leopardo | Leu Leu | Thr Thr | Thr Thr | Ala Ala | Asp Asp | Tyr Tyr | Asp Asn | Val Val |
| Pro-265 CPV-2 | Italia, 2000 Italia, 2000 | CPV-616 W42 | Cane Lupo | Leu Leu | Thr Thr | Pro Pro | Ser Ser | Gly Gly | Tyr Tyr | Asp Asp | Val Val |
| Glu-426 CPV-2 | Italia, 2000 Italia, 2000 | 136/00 56/00 | Cane Cane | Leu Leu | Thr Thr | Thr Thr | Ala Ala | Gly Gly | Tyr Tyr | Glu Glu | Val Val |

(MoAb), comparvero in rapida successione^{21, 23}. Attualmente, le varianti antigeniche del parvovirus del cane hanno completamente sostituito il tipo originario e sono variamente distribuite nella popolazione canina di tutto il mondo^{2, 4, 11, 12, 15, 24, 26, 28, 29, 32, 34}.

Mentre le varianti antigeniche differiscono dal tipo originario in 5 o 6 aminoacidi, la variante 2b differisce dalla variante 2a solo in due residui, Asn-426 → Asp e Ile-555 → Val²¹. In prossimità del punto di unione dei tre assi che delimitano ciascuna faccia del capsido si trova il residuo 426, che fa parte di un importante sito antigenico (regione A). La mutazione Asn-426 → Asp differenzia CPV-2b non solo da CPV tipo-2 e dal tipo-2a, ma anche da FPV e MEV. All'opposto, il residuo 555 si trova in un sito antigenico minore e la mutazione Ile-555 → Val rappresenta una retro-mutazione verso la sequenza del tipo originario 2 (Tab. 1)^{1, 21, 30}. Dopo la comparsa e la rapida diffusione delle varianti antigeniche 2a e 2b, ci sono stati pochi indizi di un'ulteriore significativa evoluzione antigenica di CPV e, con poche eccezioni^{13, 29, 32, 3}, durante gli ultimi 15 anni i tipi CPV-2a e -2b hanno conservato la configurazione antigenica originariamente definita da Parrish *et al.*^{21, 23}.

Recentemente, due ceppi, 56/00 e 136/00, sono stati isolati in Italia e, sebbene caratterizzati antigenicamente come CPV-2b, sono risultati diversi dagli stipti 2b di referenza per la sostituzione del residuo Asp-426 con Glu⁵. La distinzione antigenica tra CPV tipo-2a e tipo-2b si basa sulla diversa reattività nei confronti del MoAb B4A2. Un epitopo specifico di CPV-2a è riconosciuto dal MoAb B4A2 (reazione positiva) ma viene abolito dalla sostituzione di Asn-426 con Asp²¹ nei virus tipo-2b (reazione negativa). L'ulteriore mutazione nel residuo 426, quale Asp-426 con Glu negli stipti 56/00 e 136/00, non può essere riconosciuta e quindi nuove varianti vengono erroneamente considerate come 2b. Tuttavia, poiché la mutazione nucleotidica in po-

sizione 4064 responsabile della sostituzione di Asp-426 con Glu determina la comparsa di un nuovo sito di restrizione *MboII* (GAAGA) aggiuntivo, è possibile distinguere i virus mutanti 426-Glu dagli altri tipi antigenici mediante analisi con gli enzimi di restrizione del DNA⁵.

L'uso combinato di metodiche genetiche/antigeniche è quindi consigliabile per identificare velocemente queste nuove varianti di CPV. Seguendo questo approccio, gli stipti CPV caratterizzati dalla mutazione Glu-426 sono stati cercati in diverse parti di Italia. Nella presente nota si riportano i risultati della ricerca svolta durante il 2001-2002.

METODI

Isolamento del virus

Sono stati raccolti campioni fecali da cuccioli con gastroenterite in diverse regioni del Sud Italia (Puglia, Sicilia, Campania). I campioni sono stati sottoposti ad uno screening iniziale con un test di emoagglutinazione (EA). Omogenati al 10% (w/v) dei campioni di feci positivi per CPV in EA sono stati inoculati su cellule di carcinoma di cane A-72, coltivate in Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-MEM) con siero fetale bovino 10%. La crescita virale sulle cellule inoculate è stata monitorata mediante immunofluorescenza indiretta (IF) e mediante EA sul criolisato cellulare.

Caratterizzazione antigenica

La caratterizzazione antigenica è stata eseguita con il test di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) utilizzando un panel di 4 MoAbs (A4E3, B4A2, C1D1 e B4E1), gentilmente fornito dal Prof. C.R. Parrish (Cornell University,

Tabella 2
Reattività dei MoAb verso CPV-2, CPV-2a CPV-2b e verso la variante Glu-426 di CPV-2 valutata mediante inibizione dell'emoagglutinazione.
I valori indicano il reciproco della più alta diluizione di MoAb ancora in grado di inibire 8 HA del virus

| Anticorpi MoAb | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|-----------------|------------------|-------|-----------------|
| Isolati | A4E3 | B4A2 | C1D1 | B4E1 | Tipo antigenico |
| DP/83 | 160 | 160 | 0 | 1280 | CPV-2, Asn-426 |
| 188-01 (B) | 640 | 80-160 | 1280 | 40 | CPV-2a, Asn-426 |
| 108-02 (44) | 640 | 80-160 | 2560 | 20-40 | CPV-2a, Asn-426 |
| 119-02 (A) | 640 | 80 | 1280 | 20-40 | CPV-2a, Asn-426 |
| 42-01 | 2560 | 0 | 2560 | 20-40 | CPV-2b, Asp-426 |
| 198-02 (A) | 640 | 0 | 1280 | 0 | CPV-2b, Asp-426 |
| 205-02 | 1280 | 20 ^a | 1280 | 10 | CPV-2b, Asp-426 |
| 56-00 | 320 | 0 | 1280 | 20 | CPV-2?, Glu-426 |
| 136-00 | 1280-2560 | 5-10 | 2560 | 20 | CPV-2?, Glu-426 |
| 157-02 (5) | 320 | 0 | 640-1280 | 20-40 | CPV-2?, Glu-426 |
| 202-02 (1) | 160 | 0 | 640 | 20 | CPV-2?, Glu-426 |
| 202-02 (1) | 160 | 0 | 640 | 20 | CPV-2?, Glu-426 |
| Specificità MoAb | CPV-2 CPV-2a CPV-2b | CPV-2 CPV-2a | CPV-2a CPV-2b | CPV-2 | |

^a In taluni casi si può avere una reattività minima del monoclonale B4A2 verso stipiti 2b. Analogamente, il monoclonale B4E1, specifico per il tipo 2, può avere una reattività minima per i virus 2a e 2b.

Ithaca, NY). La reattività differenziale dei MoAbs permette la caratterizzazione degli stipiti CPV come CPV tipo-2, tipo-2a o tipo-2b ed è riassunta nella tabella 2. L'analisi con i MoAbs è stata effettuata sia sugli omogenati di feci che sugli stipiti isolati su cellule.

Analisi di restrizione

Tutti i ceppi caratterizzati come tipo 2b mediante caratterizzazione con i MoAbs sono stati sottoposti a screening genetico usando gli enzimi di restrizione come in precedenza descritto⁵. È stata usata una coppia di primer, *555for-555rev*, in grado di amplificare un frammento di 583 bp, all'estremità 3' terminale della ORF2 virale. Il frammento amplificato comprende i residui 426 e 555 che sono informativi per la specificità antigenica di CPV2^{10, 18, 21}. Brevemente, la reazione è stata effettuata in una mix di 100 µl contenente MgCl₂ 2 mM, 50 pM di ciascun primer, 1x PCR buffer II e 2.5 U di DNA-polymerase AmplyTaq Gold (*Applera Italia, Monza*), mediante 35 cicli a 94°C per 30 sec, 50°C per 1 min e 72°C per 1 min. Per tagliare l'amplificato è stato usato l'enzima di restrizione *MboII*, capace di riconoscere selettivamente la sequenza GAA-GA in posizione 4062-4066 (nt), ed in grado di distinguere gli stipiti CPV-2 56/00- e 136/00-simili dagli stipiti CPV-2 tipo-2, tipo-2a e tipo-2b. Circa 1 µg di DNA (da 1 a 5 µl) del prodotto PCR ottenuto coi primer *555for-555rev* è stato digerito in un volume totale di 20 µl, usando 5 U di enzima. Il DNA è stato quindi visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio 2.5%.

Per verificare l'accuratezza dell'analisi di restrizione è stata effettuata l'analisi di sequenza parziale degli amplificati *555for-555rev*. Gli amplificati ottenuti sono stati purificati su colonnine DA (*Amicon, Millipore, Bedford, U.S.*) e la sequenza è stata determinata usando un apparecchio ABI 377 (*Applera Italia, Monza*).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati sono riassunti nella tabella 3. Nel 2001 e 2002, il tipo-2a è risultato la variante antigenica più comune. Tre stipiti CPV-2b sono stati identificati nel 2001 e 3 nel 2002. Mentre nel 2000 sono stati identificati solo 2 stipiti mutanti Glu-426, nel 2001 ne sono stati identificati 3 e nel 2002 9. Bisogna sottolineare che gli stipiti mutanti Glu-426 sono stati identificati in differenti aree del Sud Italia (Puglia, Sicilia e Campania). L'analisi di sequenza di tali stipiti, identificati mediante analisi di restrizione, ha confermato la presenza della mutazione T→A in posizione 4064 (nt). L'analisi retrospettiva degli stipiti caratterizzati come CPV-2b ha rivelato che nessuna mutante Glu-426 era presente tra i ceppi isolati prima del 2000.

I risultati del presente studio confermano l'efficacia di una semplice analisi di restrizione per identificare la variante Glu-426. Come riportato in tabella 1, non c'è alcuna differenza di reattività ai MoAbs tra gli stipiti CPV-2b (Asp-426) e la variante Glu-426. Poiché l'analisi con i MoAbs o la genotipizzazione PCR da sole non sono in grado di riconoscere questa nuova mutante⁵, si suggerisce l'uso combinato della caratterizzazione antigenica con i MoAbs e dell'analisi di restrizione del DNA per identificare con successo la presenza della variante Glu-426.

Nel 2000, allorché furono identificati per la prima volta due stipiti Glu-426 (56/00 e 136/00), non era facile stabilire se essi rappresentassero una nuova variante emergente di CPV o, più meramente, dei virus mutanti di occasionale identificazione. Entro pochi anni dalla loro iniziale identificazione, le varianti antigeniche 2a e 2b hanno completamente sostituito il tipo originale 2 di CPV. Entrambe le varianti ora coesistono, anche se con una differente distribuzione nei diversi Paesi. In Italia, il più diffuso è il tipo antigenico CPV- 2a, mentre il tipo 2b viene identificato poco frequentemente^{4, 6, 26}. I risultati del presente studio dimostrano che parvovirus Glu-426, simili ai

Tabella 3
Caratterizzazione antigenica e genetica di stipiti CPV-2 in Italia. La variante Glu-426 di CPV-2 è evidenziata in grassetto

| Tipo antigenico CPV-2a | Origine stipiti | Anno di isolamento | Tipo antigenico CPV-2b | Sito Mboll nt 4062-6 | Origine stipiti | Anno di isolamento |
|------------------------|-----------------|--------------------|------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| 4-01 | Abruzzo | 2001 | 42-01 | No | Puglia | 2001 |
| 41-01 | Puglia | 2001 | 281-01 (A) | No | Puglia | 2001 |
| 52-01 | Puglia | 2001 | 281-01 (B) | No | Puglia | 2001 |
| 57-01 | Puglia | 2001 | 61/02 | No | Puglia | 2001 |
| 62-01 | Puglia | 2001 | 198-02 (A) | No | Puglia | 2002 |
| 70-01 (A) | Puglia | 2001 | 205-02 | No | Puglia | 2002 |
| 77-01 | Puglia | 2001 | 56-00 | Si | Puglia | 2000 |
| 85-01 | Puglia | 2001 | 136-00 | Si | Puglia | 2000 |
| 89-01 (B) | Puglia | 2001 | 161-01 | Si | Puglia | 2001 |
| 91-01 (D) | Puglia | 2001 | 189-01 (3) | Si | Sicilia | 2001 |
| 93-01 (A) | Puglia | 2001 | 189-01 (5) | Si | Sicilia | 2001 |
| 93-01 (B) | Puglia | 2001 | 125-02 (debbi) | Si | Campania | 2002 |
| 96-01 | Puglia | 2001 | 125-02 (Ieti) | Si | Campania | 2002 |
| 97-01 (B) | Puglia | 2001 | 157-02 (2) | Si | Puglia | 2002 |
| 98-01 (A) | Puglia | 2001 | 157-02 (5) | Si | Puglia | 2002 |
| 99-01 | Puglia | 2001 | 157-02 (5- bis) | Si | Puglia | 2002 |
| 102-01 (C) | Puglia | 2001 | 202-02 (1) | Si | Puglia | 2002 |
| 102-01 (A) | Puglia | 2001 | 202-02 (2) | Si | Puglia | 2002 |
| 104-01 (A) | Puglia | 2001 | 231-02 (1) | Si | Sicilia | 2002 |
| 106-01 | Puglia | 2001 | 231-02 (2) | Si | Sicilia | 2002 |
| 111-01 (B) | Puglia | 2001 | | | | |
| 113-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 120-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 122-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 146-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 169-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 184-01 (A) | Puglia | 2001 | | | | |
| 188-01 (B) | Puglia | 2001 | | | | |
| 228-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 233-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 239-01 (A) | Puglia | 2001 | | | | |
| 255-01 (A) | Puglia | 2001 | | | | |
| 273-01 (1) | Puglia | 2001 | | | | |
| 273-01 (2) | Puglia | 2001 | | | | |
| 288-01 | Puglia | 2001 | | | | |
| 297-01 (A) | Puglia | 2001 | | | | |
| 307-01 (A) | Puglia | 2001 | | | | |
| 307-01 (B) | Puglia | 2001 | | | | |
| 2-02 | Puglia | 2002 | | | | |
| 63-02 | Puglia | 2002 | | | | |
| 69-02 | Puglia | 2002 | | | | |
| 95-02 (A) | Puglia | 2002 | | | | |
| 108-02 (8) | Abruzzo | 2002 | | | | |
| 108-02 (32) | Abruzzo | 2002 | | | | |
| 108-02 (44) | Abruzzo | 2002 | | | | |
| 119-02 (A) | Puglia | 2002 | | | | |
| 133-02 | Puglia | 2002 | | | | |
| 146-02 | Puglia | 2002 | | | | |
| 202-02 (3) | Puglia | 2002 | | | | |

virus 56/00 e 136/00, stanno attualmente co-circolando in Italia assieme agli altri tipi antigenici di CPV.

Una peculiarità dei parvovirus del sottogruppo felino, in cui sia FPLV che CPV-2 sono inclusi, è che singole sostituzioni nucleotidiche possono determinare drastici cambiamenti fenotipici a carico di antigenicità, spettro di ospite in vivo ed in vitro, ed emoagglutinazione^{10, 13, 16, 17, 19, 21, 22, 27, 31, 33}. In questa prospettiva, la comparsa di nuove varianti di CPV-2 rappresenta un costante pericolo per i cani domestici. Di recente, sono stati identificati alcuni stipiti CPV-2 con mutazioni naturali in grado di alterarne significativamente le caratteristiche antigeniche e/o strutturali, come Asp-300¹³ e Pro-265³. Recentemente, una variante analoga è stata identificata in Nord Italia⁴ ed esistono inoltre segnalazioni di uno stipite Glu-426 anche in Vietnam

(Yukinobu Tohya, Giappone, 2003. Comunicazione personale). È quindi possibile ipotizzare che la mutazione nel residuo 426, all'interno di un epitopo immunodominante di CPV^{10, 18, 21}, abbia fornito al virus mutante un sostanziale vantaggio evolutivo. I risultati del presente lavoro indicano che la variante Glu-426 di CPV-2 è ormai stabilmente presente in Sud Italia. In tal caso, il miglioramento del fitness virale potrebbe essere derivato da una variazione antigenica indotta dalla mutazione Glu-426, che presumibilmente consente al virus di evadere con maggiore efficienza l'immunità basale acquisita verso CPV-2 esistente nella popolazione canina.

La valutazione delle correlazioni antigeniche tra la variante Glu-426 ed i tipi antigenici -2a e -2b aiuterà a comprendere i meccanismi che hanno portato alla diffu-

sione della variante Glu-426. È tuttavia indispensabile intensificare la sorveglianza epidemiologica della distribuzione relativa delle varianti antigeniche di CPV per comprendere se la variante Glu-426 si sia stabilita in modo permanente nella popolazione canina e se essa stia circolando anche in altre parti del mondo, fornendo ulteriori informazioni sui meccanismi che guidano l'evoluzione di CPV-2. Si rende inoltre necessario valutare il significato immunologico di questa nuova variante in relazione ai vaccini attualmente in uso.

Parole chiave

Cane, parvovirus, varianti.

Key words

Dog, parvovirus, mutants.

Abbreviazioni

CPV-2: canine parvovirus type 2. CPV-1: canine parvovirus type 1. FPLV: feline panleukopenia virus. MoAb: monoclonal antibody. Asn: asparagina. Asp: acido aspartico. Glu: acido glutammico. Ile: isoleucina. Val: valina. Pro: prolina. FPV: feline parvovirus. MEV: mink enteritis virus. w/v: weight/volume. bp: base pairs. PCR: polymerase chain reaction. nt: nucleotide. T: timida. A: adenina. G: guanina.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato supportato da finanziamenti del MURST (progetto "Enteriti dei piccoli animali", Ministero dell'Università per la Ricerca Scientifica e Tecnologica).

Bibliografia

- Agbandje M., C.R. Parrish, M.G. Rossmann: The recognition of parvovirus capsids by antibodies. *Seminars in Virology* 6: 219-231, 1995.
- Appel M.J.G., Scott W.F., Carmichael L.E.: Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105: 156-159, 1979.
- 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.* 82: 1555-1560, 2001.
- Battilani M., Prosperi S.: Parvovirus del cane: studio molecolare di alcuni ceppi del tipo 2 (CPV-2). *Veterinaria* 16: 65-71, 2002.
- Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N., Carmichael L.E.: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82: 3021-3025, 2001.
- Buonavoglia D., Cavalli A., Pratelli A., Martella V., Greco G., Tempesta M., Buonavoglia C.: Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23: 93-96, 2000.
- Burtonboy G., Coignoul F., Pastoret P. P., Delferriere N.: Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol.* 61: 1-11, 1979.
- Carmichael L.E., Binn L.N.: New enteric diseases in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25: 1-37, 1981.
- Carmichael L.E., Schlafler D.H., Hashimoto A.: Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 165-174, 1994.
- Chang S.-F., Sgro J.-Y., Parrish C.R.: 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, 1992.
- De Ybanez R.R., Vela C., Cortes E., Simarro I., Casal J.I.: Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136: 174-175, 1995.
- Greenwood N.M., Chalmers W.S.K., Baxendale W., Thompson H.: Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme-analysis. *Vet. Rec.* 138: 495-496, 1996.
- 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* 278: 13-19, 2000.
- Johnson R.H., Spradbrow P.B.: Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopenia virus. *Austral. Vet. J.* 55: 151, 1979.
- Kelly W.R.: An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia virus. *Austral. Vet. J.* 54: 593, 1978.
- Llamas-Sainz A., Agbadje-McKenna M., Parker J.S.L., Wahid A.T.M., Parrish C.R., Rossmann M.G.: Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which control antigenicity and host range. *Virology*, 225: 65-71, 1996.
- Mochizuki M., Harasawa R., Nakatani H.: Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Veterinary Microbiology* 38: 1-10, 1993.
- Parker J.S.L., Parrish C.R.: Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J. Virol.* 71: 9214-9222, 1997.
- Parrish C.R.: Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183: 195-205, 1991.
- Parrish C.R.: Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69: 29-40, 1999.
- Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M.L., Evermann J.F., Sgro J.-Y., Mohammed H.O.: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65: 6544-6552, 1991.
- Parrish C.R., Burtonboy G., Carmichael L.E.: Characterisation of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology*, 163: 230-232, 1988.
- Parrish C.R., O'Connell P.H., Evermann J.F., Carmichael L.E.: Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230: 1046-1048, 1985.
- Pereira C.A., Monezi T.A., Mehnert D.U., D'Angelo M., Durigon E.L.: Molecular characterisation of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75: 127-133, 2000.
- Reed A.P., Jones E.V., Miller T.J.: Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62: 266-276, 1988.
- Sagazio P., Tempesta M., Buonavoglia D., Cirone F., Buonavoglia C.: Antigenic characterisation of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Meth.* 73: 197-200, 1998.
- Simpson A.A., Chandrasekar V., Hebert B., Sullivan G.M., Rossmann M.G., Parrish C.R.: Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsid of canine and feline parvoviruses. *J. Mol. Biol.*, 300: 597-610, 2000.
- Steinel A., Venter E.H., Van Vuuren M., Parrish C.R., Truyen U.: Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65: 239-242, 1998.
- Steinel A., Munson L., van Vuuren M., Truyen U.: Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J. Gen. Virol.* 81: 345-350, 2000.
- Strassheim M.L., Gruenberg A., Veijalainen P., Sgro J.-Y., Parrish C.R.: Two dominant neutralizing antigen determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184, 1994.
- Tresnan D.B., Southard L., Weichert W., Sgro J.-Y., Parrish C.R.: Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology* 211: 123-132, 1995.
- Truyen U., Steinel A., Bruckner L., Lutz H., Mostl K.: Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany. *Schweiz Arch Tierheilkd* 142: 115-119, 2000.
- Truyen U., Grunenberg A., Chang S.F., Obermaier B., Veijalainen P., Parrish C.R.: Evolution of the feline-subgroup of parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol* 69: 4702-4710, 1995.
- Truyen U., Platzler G., Parrish C.R.: Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec* 138: 365-366, 1996.