

Canine minute virus associato a mortalità neonatale nel cane

RIASSUNTO

Nella presente nota è riportato un episodio di mortalità neonatale sostenuta da *Canine minute virus* (CnMV) in un allevamento di Jack Russel terrier in Puglia. L'esame necroscopico di tre soggetti ha evidenziato gravi lesioni a carico di polmoni e intestino e in questi organi, mediante PCR, è stato identificato uno stipite CnMV. Gli esami sierologici e molecolari hanno, altresì, permesso di evidenziare la circolazione del virus anche in altre cucciolate del medesimo allevamento. Il sequenziamento e l'analisi filogenetica del gene codificante per la proteina capsidica VP2 dello stipite identificato hanno evidenziato una stretta correlazione con uno stipite CnMV recentemente isolato in Giappone.

INTRODUZIONE

Canine minute virus (CnMV), anche noto come *minute virus of canines* (MVC) o parvovirus del cane tipo 1 (CPV-1), fu isolato nel 1967 dalle feci di cani asintomatici¹. In base alle caratteristiche genetiche e antigeniche², CnMV è chiaramente distinto dal parvovirus del cane tipo 2 (CPV-2), agente della gastroenterite emorragica canina³. Attualmente, CPV-2 è classificato nel genere *Parvovirus* della famiglia *Parvoviridae*, mentre CnMV è incluso, insieme al parvovirus bovino e ad alcuni parvovirus umani, nel genere *Bocavirus*⁴. Analogamente ai parvovirus di altre specie animali, CnMV può causare un'infezione transplacentare con conseguenti fenomeni di riassorbimento embrionale, morte degli embrioni o dei feti, infezione inapparente, mortalità neonatale^{5,6}. La diversa evoluzione dell'infezione dipende dallo stadio della gestazione al momento dell'infezione⁷. L'infezione contratta nella prima metà della gestazione causa, generalmente, riassorbimento dei feti, mentre l'infezione contratta nella seconda metà determina la nascita di cuccioli morti o disvitali⁸. L'infezione contratta in prossimità del parto decorre in forma asintomatica con la nascita di cuccioli sani e sieropositivi^{5,9}. Recentemente l'infezione da CnMV è stata associata a casi di malattia neurologica in cani di varia età¹⁰ e ad un caso di grave gastroenterite in un cane anziano¹¹.

Focolai di infezione da CnMV, associati a mortalità neonatale, sono stati riscontrati solo sporadicamente e gli ultimi casi risalgono agli anni '90^{12,8,13,14}. L'infezione nei cuccioli di età inferiore a 4 settimane di vita esita nella morte dell'animale preceduta da sintomi piuttosto vaghi; solo talvolta è possibile evidenziare depressione, anoressia, miocardite acuta, difficoltà respiratorie ed enterite⁷.

È stato ipotizzato che l'immunosoppressione indotta da CnMV, caratterizzata da una significativa riduzione dell'attività fagocitaria dei monociti, giocherebbe un ruolo importante nella patogenesi di questa malattia, configurandosi come un fattore predisponente lo sviluppo di infezioni secondarie¹⁵.

In questa nota si riportano i rilievi clinici, patologici e virologici di un caso di mortalità neonatale da CnMV osservato in un allevamento della Puglia.

MATERIALI E METODI

Caso clinico e raccolta dei campioni

A luglio 2011, una cagna di tre anni, razza Jack Russell, di un allevamento della Puglia ha partorito sei cuccioli, tre femmine (F1, F2 ed F3) e tre maschi (M1, M2 ed M3, quest'ultimo nato morto). I cuccioli M2, F3 ed

**Francesca Amorisco¹, Nicola Decaro¹,
Diana Lenoci², Costantina Desario¹,
Angela Lovero¹, Maria Loredana Colaianne¹,
Michele Losurdo^{1,3}, Antonella Aiello⁴,
Vito Martella¹, Canio Buonavoglia¹**

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootechnia,
Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, Valenzano (BA)

² Veterinario libero professionista, Bari

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia
e Basilicata, Foggia

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno,
Sezione di Vibo Valentia - Mileto

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 20/03/2012 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 30/05/2012”.

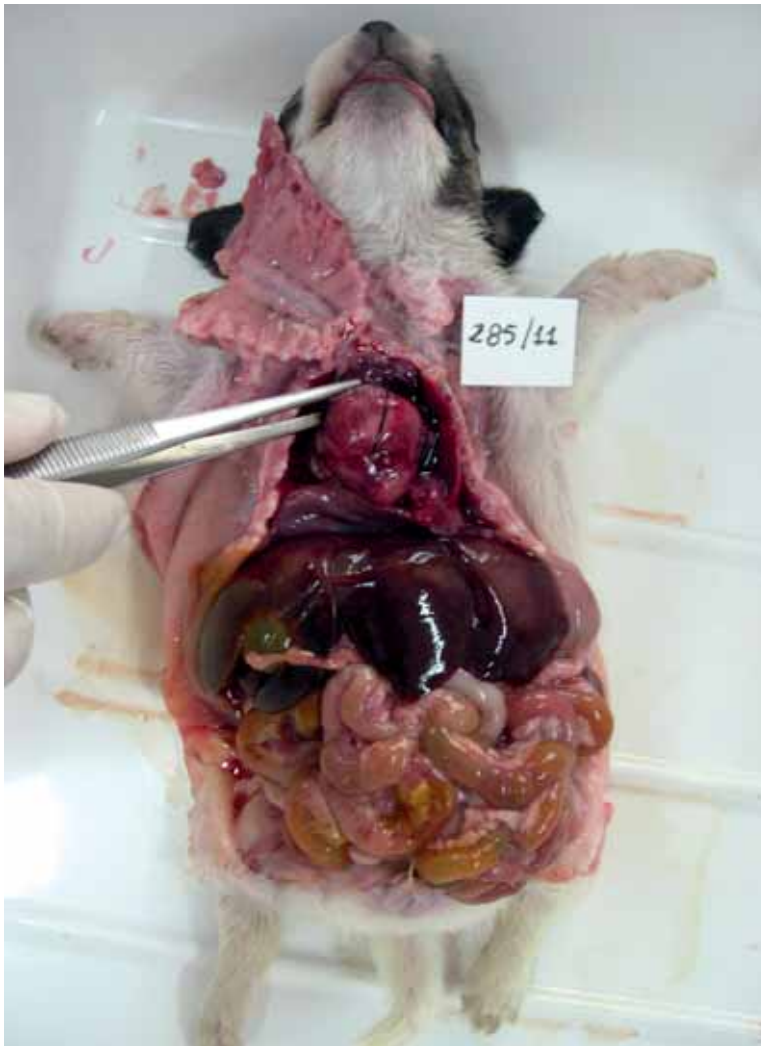


FIGURA 1 - Cucciolo M2 (285/11). Enterite, polmonite, aree di degenerazione a carico di fegato e miocardio.



FIGURA 2 - Cucciolo M2 (285/11). Cuore con estese aree di necrosi.

F2 hanno sviluppato una malattia sistemica caratterizzata da dispnea e morte improvvisa a 12, 20 e 23 giorni di età, rispettivamente. I due cuccioli sopravvissuti (F1 ed M1) non hanno evidenziato segni clinici, ad eccezione di una lieve alterazione del segmento ST del tracciato elettrocardiografico. La carcassa del cucciolo M2 (285/11) è stata sottoposta ad accertamenti batteriologici e virologici.

All'esame anatomico-patologico sono state evidenziate lesioni di notevole gravità a carico di polmoni, intestino, fegato e miocardio (Fig. 1, 2). I polmoni presentavano focolai di broncopolmonite, mentre l'intestino era interessato da enterite catarrale. A carico del fegato e del miocardio si evidenziavano ampie aree di degenerazione e necrosi. Campioni di organi sono stati utilizzati per le analisi virologiche e batteriologiche. Contemporaneamente sono stati raccolti campioni di siero, tamponi rettali ed orofaringei dalla madre, dai cuccioli F1 ed M1 e da altri sei cuccioli dello stesso allevamento.

Preparazione dei campioni

Per l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni d'organo e dai tamponi rettali ed orofaringei sono stati utilizzati i seguenti kit: QIAamp® Viral RNA mini Kit (QIAGEN S.p.A., Milano) per l'estrazione, se presente, dell'RNA virale; Dneasy Tissue (QIAGEN S.p.A., Milano) per l'estrazione di DNA totale.

Sui campioni di polmone, fegato, milza, cuore ed intestino del cucciolo M2 e sui campioni prelevati dagli altri cani è stata effettuata la ricerca per i comuni agenti patogeni del cane, quali herpesvirus del cane tipo I¹⁶, CnMV¹⁵, coronavirus del cane^{17,18}, reovirus^{19,20}, rotavirus²¹, calicivirus²², parvovirus del cane tipo 2^{23,24,25}, adenovirus del cane tipo I e tipo 2²⁶ e virus del cimurro²⁷. Per la ricerca di CnMV, ciascun estratto DNA è stato sottoposto a PCR utilizzando la coppia di primer 268/276¹⁵, in grado di amplificare un frammento di 1080 bp della VP2. La reazione di amplificazione è stata ottenuta in un volume di 100 µl costituiti da PCR buffer II I X, 1.5 mM di MgCl₂, 150 µM di dNTPs, 2.5 U di DNA polimerasi e 50 nM di ciascun primer, effettuando 45 cicli (denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 60°C per 1 min e polimerizzazione a 72°C per 1 min), seguiti da una fase finale di estensione a 72°C per 10 min. Un'aliquota di 8 µl di ciascun prodotto PCR è stata sottoposta ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% e poi visualizzata previa colorazione con etidio bromuro.

Esami batteriologici

Tutti i campioni prelevati, dopo opportuna preparazione, sono stati seminati su piastre di agar sangue (contenenti il 5% sangue di pecora), incubati a 37°C per 24 ore, in condizioni di aerobiosi, per la ricerca di batteri aerobi. Per l'isolamento di batteri anaerobi, i campioni sono stati risospesi in ter-

reno liquido con aggiunta di tioglicolato e diluizioni logaritmiche in base 10 di ciascun campione sono state seminate in agar sangue e in agar tuorlo d'uovo con aggiunta di 400 µg/ml di D-cicloserina.

Isolamento virale

I campioni prelevati dal cucciolo M2, risultati positivi per CnMV al test PCR, sono stati sottoposti a prove di isolamento virale. A tal fine sono stati preparati i corrispondenti omogenati in terreno minimo essenziale di Eagle (E-MEM). Dopo centrifugazione a 4000 x g per 20 minuti a +4°C, il surnatante di ciascun campione è stato trattato con antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 g/ml streptomicina), quindi utilizzato per inoculare cellule di cisti subdermoide (WRCC) e di rene (MDCK) di cane appena tripsinizzate, coltivate in E-MEM con l'aggiunta del 5% di siero fetale bovino. Gli stessi omogenati sono stati inoculati su cellule WRCC e MDCK sviluppate su piastre a 12 pozzetti con vetrino, utilizzando 3 pozzetti per campione. Le cellule sono state incubate a 37°C in termostato in presenza di CO₂ e sottoposte ad osservazione quotidiana per rilevare l'eventuale comparsa di effetto citopatico.

Dopo 3 giorni di incubazione, i monostrati cellulari sono stati sottoposti sia al test di immunofluorescenza indiretta (IFI) per CnMV, sia alla colorazione con ematossilina-eosina per la ricerca di eventuali corpi inclusi intranucleari.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Gli amplificati ottenuti dalla PCR specifica per CnMV sono stati purificati mediante il kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin) e sequenziati presso la Base Clear B.V. (Leiden, Paesi Bassi).

Le sequenze ottenute sono state assemblate ed analizzate usando il software Bioedit versione 2.1²⁸ e gli strumenti di analisi dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e dell'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>).

I dati di sequenza sono stati confrontati con le sequenze di riferimento, utilizzando lo strumento ClustalW dell'European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk>).

L'analisi filogenetica è stata realizzata sulla medesima regione genomica del ceppo prototipo 285/11, utilizzando il programma MEGA, versione 4.1²⁹. I dendrogrammi sono stati realizzati mediante analisi di stato dei caratteri (metodo della parsimonia) ed analisi della distanza (metodo neighbour-joining, con correzione secondo Kimura). L'analisi statistica è stata effettuata mediante bootstrap in 1000 repliche.

Test sierologici

La ricerca di anticorpi specifici per CnMV nei campioni di siero dei cani è stata effettuata mediante test IFI, come descritto precedentemente¹⁴. Come

antigene è stato utilizzato il ceppo CnMV/GA3⁸ inoculato su cellule WRCC. La titolazione degli anticorpi presenti nei sieri dei cani è stata effettuata con diluizioni del siero per raddoppio in base 2 in tampone fosfato PBS, partendo dalla diluizione iniziale 1:50 fino alla diluizione 1:800, e testando contemporaneamente un siero positivo, con titolo anticorpale noto, ed uno negativo di controllo per CnMV. I titoli anticorpali sono stati espressi come la più alta diluizione del siero alla quale si osserva ancora fluorescenza delle cellule.

RISULTATI

Gli organi del cucciolo 285/11 ed i tamponi rettali raccolti da 2 cuccioli di 3 mesi, provenienti da 2 diverse cucciolate, sono risultati positivi alla PCR specifica per CnMV (Fig. 3). Gli esami virologici e batteriologici non hanno evidenziato la presenza di altri comuni agenti patogeni del cane associati a mortalità neonatale.

Le prove di isolamento su cellule, partendo dai campioni risultati positivi per CnMV, non hanno avuto successo, considerando sia la mancata comparsa di ECP specifico nei monostrati infetti, sia la negatività del test IFI e sia l'assenza di inclusi intranucleari.

L'analisi di sequenza di un frammento di 1005 nt del gene codificante la proteina VP2 ha evidenziato il 100% di similarità fra i tre ceppi virali identificati rispettivamente nel cucciolo 285/11 e nei tamponi rettali degli altri 2 cuccioli. Per i successivi confronti con le sequenze di riferimento è stata dunque utilizzata solo la sequenza del virus rilevata nel cucciolo morto (ceppo 285/11). L'analisi di sequenza ha dimostrato che il ceppo 285/11

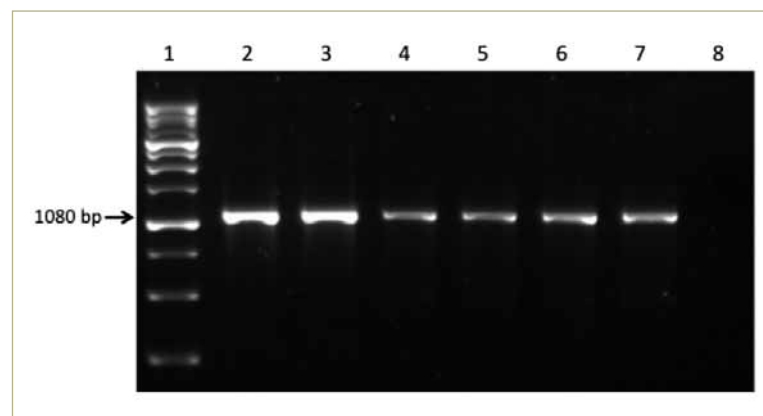


FIGURA 3 - Elettroforesi su gel dei prodotti PCR per la ricerca di CnMV sui campioni clinici. Corsia 1, marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germania); corsia 2, controllo positivo (ceppo CnMV/GA3, gentilmente fornito dal Prof. L.E. Carmichael, James A. Baker Institute for Animal Health, Cornell University, Ithaca, NY); corsie 3-5, campioni tissutali (milza, polmone, intestino) del cucciolo morto M2; corsie 6-7, tamponi rettali di due cuccioli dello stesso cane; corsia 8, controllo negativo (cuore di un cucciolo negativo per CnMV).

TABELLA I
Identità (%) nucleotidica (in alto a destra) e aminoacidica (in basso a sinistra) tra ceppi di *Canine minute virus* nella sequenza parziale del gene per la VP2.

Stipite	285/11	NC_004442	97-114	08-017	97-047	SH1	AF495467	GA3	HM-6
285/11	ID	98.4	98.2	98.8	98.6	97.9	98.4	98.4	97.4
NC_004442	98.2	ID	97.8	97.9	98.1	97.2	100	99.9	97.2
97-114	99.1	98.5	ID	98.2	98.4	97.5	97.8	97.9	97.0
08-017	99.1	97.9	98.8	ID	98.6	97.9	97.9	98.0	97.4
97-047	99.1	99.1	99.4	98.8	ID	98.2	98.1	98.2	97.8
SH1	98.8	98.2	98.5	98.5	99.1	ID	97.2	97.3	96.8
AF495467	98.2	100	98.5	97.9	99.1	98.2	ID	99.9	97.2
GA3	98.5	99.7	98.8	98.2	99.4	95.5	99.7	ID	97.3
HM-6	97.0	97.4	97.3	96.7	97.9	97.0	97.3	97.6	ID

è strettamente correlato al ceppo 08-017, isolato in Giappone da un cane anziano con grave gastroenterite, con una identità nucleotidica pari al 98,8% (Tabella I). La correlazione con il ceppo giapponese era anche evidente a livello aminoacidico, con una identità pari al 99,1%.

L'analisi filogenetica, basata sulla sequenza nucleotidica ed effettuata utilizzando il metodo neighbor-joining, ha mostrato che il ceppo italiano di CnMV forma un unico cluster con gli stipiti asiatici ed americani, differenziandosi chiaramente dai bocavirus del cane recentemente identificati nell'ambito di forme respiratorie (prototipo CBoV-Con-161) (Fig. 4).

Il test IFI ha evidenziato la presenza di anticorpi specifici per CnMV nei campioni di siero della cagna e dei suoi due cuccioli sopravvissuti, con titolo rispettivamente di 1:100, 1:200 e 1:400. Come

atteso, anche i 2 cuccioli risultati positivi al test PCR sui tamponi fecali hanno evidenziato anticorpi specifici per CnMV con titoli IFI, rispettivamente, di 1:100 e 1:200.

DISCUSSIONE

In questa nota viene descritto un caso di infezione da CnMV associato a mortalità neonatale. Il virus è stato identificato mediante PCR e sottoposto a caratterizzazione molecolare. La circolazione di questo virus nell'allevamento è stata dimostrata dalla presenza del DNA virale in soggetti di differenti cucciolate e dalla presenza di anticorpi specifici sia nel siero della cagna e dei suoi due cuccioli sopravvissuti, sia nel siero di cuccioli appartenenti ad altre cucciolate.

Non è stato possibile effettuare indagini istopatologiche sulla carcassa del cucciolo infetto, a causa del cattivo stato di conservazione. Il virus identificato non è stato isolato su colture cellulari, nonostante siano stati effettuati tre passaggi seriali seguiti da test IFI prima di considerare fallite le prove di isolamento virale. Anche in questo caso, il cattivo stato di conservazione della carcassa potrebbe avere influito negativamente sull'isolamento del virus nelle colture cellulari. Il sequenziamento del prodotto PCR e l'analisi filogenetica hanno evidenziato una stretta correlazione del ceppo isolato con quello recentemente descritto in Giappone.

Il caso clinico descritto in questa nota conferma che CnMV è un importante patogeno responsabile di mortalità neonatale dei cuccioli⁷, anche se le segnalazioni di infezione da CnMV nei canili e negli allevamenti sono ancora molto limitate. Probabilmente ciò è da imputare alla scarsa conoscenza di questo virus e ad un conseguente ridotto numero di campioni sottoposti ad accertamenti virologici a seguito di episodi di mortalità neonatale, soprat-

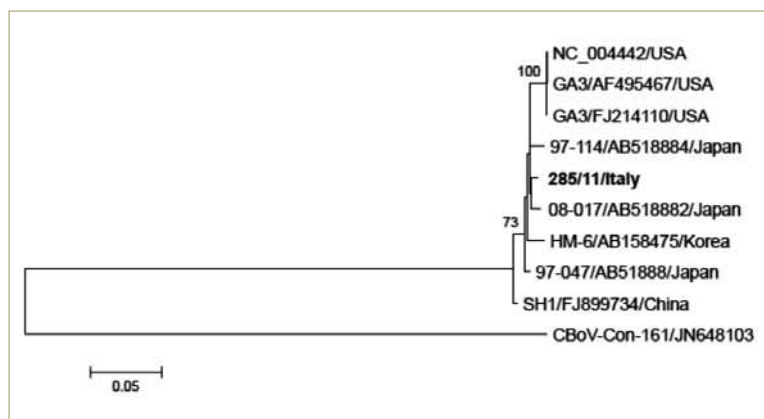


FIGURA 4 - Albero filogenetico ottenuto col metodo neighbor-joining su un frammento di 1005 nucleotidi del gene VP2 dei ceppi di CnMV. Per la costruzione dell'albero filogenetico sono state utilizzate le sequenze di CnMV elencate nella Tabella I. Lo stipite di bocavirus del cane (CBoV) Con-161 è stato inserito come outgroup. Per ogni ceppo sono indicati i numeri di accesso in GenBank. La barra rappresenta il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche per sito; i valori di bootstrap sono stati calcolati ed i valori superiori al 70% sono indicati in corrispondenza di ciascun nodo.

tutto quando questa interessa, come nel caso descritto, pochi membri di un'unica cucciolata. È, inoltre, importante sottolineare che CnMV può causare infezioni subcliniche e inapparenti negli animali adulti, facendo sottostimare la reale circolazione di CnMV nella popolazione canina. Gli aspetti epidemiologici di questa infezione non sono, tuttavia, gli unici a dover essere approfonditi. Ancora oggi non sono conosciuti alcuni aspetti patogenetici di questa infezione, come dimostra il recente ritrovamento del virus nel liquido cerebrospinale di cani adulti con problemi neurologici¹⁰, o nelle feci di cani anziani con grave gastroenterite¹¹.

Appare quindi opportuno sensibilizzare i veterinari sull'importanza di CnMV e sull'inserimento di questo virus nell'algoritmo diagnostico dei patogeni associati a mortalità neonatale. Questa iniziativa faciliterebbe la sorveglianza molecolare per CnMV nei canili e negli allevamenti, ampliando di conseguenza le conoscenze sull'epidemiologia e sulla patogenesi di un virus noto già dal 1967¹, ma sotto molti aspetti ancora poco conosciuto.

Parole chiave

Cane; Canine minute virus; mortalità neonatale.

■ Neonatal mortality associated to Canine minute virus infection

Summary

An outbreak of neonatal death associated to *Canine minute virus* (CnMV) infection is reported. Three Jack Russel terrier newborn littermates died as a result of systemic disease and necropsy revealed the presence of severe lesions in internal organs. A CnMV strain was detected by polymerase chain reaction in all analysed samples. Serological and molecular assays confirmed the CnMV circulation in the breeding kennel. By sequence and phylogenetic analyses the CnMV strain was found to be strictly related to a recent Japanese isolate.

Key words

Dog; Canine minute virus; neonatal death.

BIBLIOGRAFIA

1. Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, et al: Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun* 1 (5):503-508, 1970.
2. Schwartz D, Green B, Carmichael LE, et al: The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology* 302 (2): 219-223, 2002.
3. Decaro N, Buonavoglia C: Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 155 (1):1-12, 2012.
4. Tattersall P, Bergoin M, Bloom ME et al: Family Parvoviridae. In: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Ed CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, et al. London, Elsevier Academic Press, 2005, pp 353-369.
5. Siegl G: Biology pathogenicity of autonomous parvoviruses. In: *The Parvoviruses*. Ed KL Berns. New York, Plenum Press, 1984, pp 297-362.
6. Pattison JR: B19 Virus infection in pregnancy. In: *Parvoviruses and Human Disease*. Ed JR Pattison, Boca Raton, CRC Press, 1988, pp 133-137.
7. Decaro N, Carmichael LE, Buonavoglia C: Viral reproductive pathogens of dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 42 (3):583-598, 2012.
8. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A: Minute virus of canine (MCV, canine parvovirus type-1): Pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest* 6 (2):165-174, 1994.
9. Mengeking WL: Porcine parvovirus. In: *Virus infections of Vertebrates*. Ed MC Horzinek, MB Pensaert, Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1989, pp 83-94.
10. Eminaga S, Palus V, Cherubini GB: Minute virus as a possible cause of neurological problems in dogs. *Vet Rec* 168 (4):111-112, 2011.
11. Ohshima T, Kawakami K, Abe T, et al: A minute virus of canines (MVC: canine bocavirus) isolated from an elderly dog with severe gastroenteritis, and phylogenetic analysis of MVC strains. *Vet Microbiol* 145 (3-4):334-338, 2010.
12. Harrison LR, Styer EL, Pursell AR, et al: Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canine. *J Vet Diagn Invest* 4 (1):19-22, 1992.
13. Jarpild B, Johansson H, Carmichael LE: A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). *J Vet Diagn Invest* 8 (4):484-487, 1996.
14. Pratelli A, Buonavoglia D, Tempesta M, et al: Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy. *J Vet Diagn Invest* 11 (4):365-367, 1999.
15. Decaro N, Altamura M, Pratelli A, et al: Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection. *New Microbiol* 25 (3):291-298, 2002.
16. Decaro N, Amorisco F, Desario C, et al: Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *J Virol Methods* 169 (1):176-180, 2010.
17. Decaro N, Pratelli A, Campolo M, et al: Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. *J Virol Methods* 119 (2):145-150, 2004.
18. Decaro N, Martella V, Ricci D, et al: Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *J Virol Methods* 130 (1-2):72-78, 2005.
19. Leary PL, Erker JC, Chalmers ML, et al: Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the λ 3-encoding L1 gene. *J Clin Microbiol* 40 (4):1368-1375, 2002.
20. Decaro N, Campolo M, Desario C, et al: Virological and molecular characterization of a mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet Microbiol* 109 (1-2): 19-27, 2005.
21. Gouvea V, Santos N, Timenetsky M, et al: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32 (5):1338-1340, 1994.
22. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83 (1-2):145-154, 1999.
23. Decaro N, Elia G, Campolo M, et al: New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52 (7-8):316-319, 2005.
24. Decaro N, Elia G, Martella V, et al: A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 105 (1):19-28, 2005.
25. Decaro N, Elia G, Martella V, et al: Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods* 133 (1):92-99, 2006.
26. Hu RL, Huang G, Qiu W, et al: Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet Res Commun* 25 (1): 77-84, 2001.
27. Elia G, Decaro N, Martella V, et al: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 136 (1-2):171-176, 2006.
28. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41 (41):95-98, 1999.
29. Tamura K, Dudley J, Nei et al: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24 (8):1596-1599, 2007.