

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO GENOTIPO DEL CORONAVIRUS DEL CANE NELLE FECI DI CUCCIOLI CON DIARREA IN ITALIA

ANNAMARIA PRATELLI, NICOLA DECARO, ANTONELLA TINELLI,
VITO MARTELLA, GABRIELLA ELIA, FRANCESCO CIRONE,
COSTANTINA DESARIO, MARIA TEMPESTA, CANIO BUONAVOGLIA
*Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali - Centro di Patologia Infettiva dei Carnivori (CePIC)
Facoltà di Medicina Veterinaria - Bari*

Riassunto

L'analisi di sequenza del gene M e del gene S del coronavirus del cane (CCoV) ha permesso di verificare la presenza di due distinti genotipi di CCoV nelle feci di cuccioli con diarrea. Sono stati testati 69 campioni di feci con coppie di primers specifiche per i due genotipi di CCoV. Dieci campioni sono stati caratterizzati come CCoV tipo I, 6 come CCoV tipo II, mentre nei restanti 53 campioni è stata osservata la contemporanea presenza di entrambi i genotipi. Le prove di isolamento virale su colture cellulari feline e canine hanno fornito esito positivo solo per 13 dei 69 campioni testati. La caratterizzazione mediante PCR sui criolisati dei ceppi isolati ha messo in evidenza solo la presenza del genotipo II.

Summary

The sequence analysis of the M and S genes of canine coronavirus (CCoV) has shown the simultaneous presence of two genotypes of CCoV in the faeces of pups. Sixty-nine samples from diarrhoeic pups have been tested with specific primers for CCoV type I and CCoV type II genotypes. Ten faecal samples were recognised as CCoV type I, 6 samples as CCoV type II, while in 53 out of the 69 samples both the two genotypes were identified. Virus isolation attempts on both canine and feline cell lines, have given positive results in 13 out of the 69 samples. Genomic characterization by PCR of the isolated CCoV strains has revealed only the presence of CCoV type II.

INTRODUZIONE

Nella famiglia delle *Coronaviridae*, recentemente inclusa nell'ordine *Nidovirales* (de Vries et al., 1997; Siddel, 1995), sono inclusi virus patogeni dei mammiferi e degli uccelli. In base all'analisi filogenetica e alla cross reattività antigenica i coronavirus vengono suddivisi in tre distinti *cluster*. Il gruppo antigenico I include il coronavirus del cane (CCoV), il virus della gastroenterite trasmissibile del suino (TGEV), il virus della diarrea epidemica del suino (PEDV), il coronavirus respiratorio del suino (PRCoV), il coronavirus felino tipo I e il coronavirus felino tipo II (FCoVs) e il coronavirus dell'uomo 229E (HCoV 229E). Sono virus provvisti di envelope con un RNA a polarità positiva non segmentato di 27-32 kb (Siddel, 1995). I due ter-

zi del genoma all'estremità 5' sono occupati dalle ORFs 1a e 1b, l'espressione delle quali porta alla sintesi della polimerasi virale. Di seguito all'ORF 1b sono posizionate 8-10 ORFs più piccole che codificano per le proteine strutturali S, E, M, per la proteina del nucleocapside (N) e per una serie di presunte proteine non strutturali (Luytjes, 1995).

La proteina S, o *spike* di membrana, è responsabile dell'adesione del virus sui recettori cellulari, della fusione virus-cellula (de Haan et al., 2000) e della induzione degli anticorpi neutralizzanti (Gebauer et al., 1991). La piccola proteina di membrana E, solo recentemente individuata come una componente strutturale dei coronavirus, si ritiene sia importante nella fase di assemblaggio dell'envelope virale (Raamsman et al., 2000). La proteina M, la più rappresentata tra le componenti strutturali, è una glicoproteina di III tipo, costituita da un breve dominio amino-terminale esterno, da un dominio transmembranario che attraversa tre volte la membrana lipoproteica, e da un esteso dominio carbossiterminale all'interno del virione (Rottier, 1995).

CCoV è stato isolato per la prima volta in Germania nel 1971 da un episodio di enterite in un cane (Binn et al., 1974). Successivamente il virus è stato ripetutamente isolato da cuccioli con diarrea e le indagini sierologiche hanno dimostrato una distribuzione cosmopolita dell'infezione, con una percentuale più elevata nei canili (Appel et al., 1979; Bandai et al., 1999; Carmichael & Binn, 1981; Marsilio et al., 2002; Tennant et al., 1993; Pratelli et al., 1999a).

La patologia indotta da CCoV presenta ancora dei lati oscuri. CCoV è responsabile di enteriti di diversa gravità in cuccioli di età compresa tra 6 e 12 settimane, probabilmente in coincidenza del calo degli anticorpi materni. Nei cuccioli è responsabile di vomito e diarrea, anoressia, disidratazione e talvolta morte. Il virus replica negli enterociti e la sua escrezione con le feci può protrarsi fino a 150 giorni post infezione (Pratelli et al., 2001a; Pratelli et al., 2002a).

La diagnosi sierologica può essere effettuata con la sieroneutralizzazione (SN), il test Elisa e con il western blotting (Elia et al., 2002; Pratelli et al., 2002b). La SN ha rivelato una bassa sensibilità quando confrontata con l'Elisa e il western blotting. Quest'ultimo test, oltre ad una elevata sensibilità e specificità, permette di valutare la diversa reattività di un siero nei confronti delle proteine di CCoV.

La diagnosi virologica, oltre che con esami al microscopio elettronico, può essere effettuata con l'isolamento su colture cellulari e con la PCR. CCoV è tuttavia un virus che poco si adatta alla replicazione *in vitro* (Pratelli et al., 2000; Tennant et al., 1994), e questo spiegherebbe il limitato numero di ceppi CCoV isolati e le scarse conoscenze attualmente disponibili sulla patogenesi e sulle proprietà antigeniche e genomiche del virus.

Recentemente è stato messo a punto un test PCR per la ricerca di CCoV nei campioni di feci (Pratelli et al., 1999b). La regione amplificata è un frammento del gene che codifica per la proteina M di CCoV che si estende dal nucleotide 337 al 726. Secondo il modello classico descritto per la proteina (Risco et al., 1995), il frammento analizzato corrisponde alla parte terminale del terzo dominio intramembranario e al primo segmento del dominio interno carbossiterminale. Il test PCR, rivelatosi molto sensibile e specifico, ha permesso di acquisire importanti informazioni di tipo epidemiologico sulla reale diffusione dell'infezione da CCoV nella popolazione canina e sulle caratteristiche genomiche di questo virus. Recentemente, l'analisi di sequenza di CCoV estratto dai campioni di feci di cuccioli con diarrea ha messo in evidenza sostituzioni nucleotidiche multiple nel frammento del gene M (Pratelli et al., 2001b). Inoltre, l'analisi della sequenza del frammento del gene M di CCoVs identificati nelle feci di due cuccioli che hanno presentato una escrezione prolungata di virus, ha messo in evidenza un *drift* genetico verso la sequenza di FCoV tipo II. Questa osservazione ha fatto ipotizzare che: (i) i cani fossero infetti con una popolazione mista di CCoVs geneticamente differenti; (ii) i virus identificati nelle feci di questi due cuccioli rappresentassero il frutto di processi di ricombinazione o mutazione (Pratelli et al., 2002a). Successivamente, l'analisi completa del gene M e di porzioni del gene della polimerasi, *pol1a* e *pol1b*, di diversi campioni di feci raccolti da cuccioli con diarrea, ha confermato l'esistenza di due *clusters* separati di CCoV. Il primo *cluster* include virus con caratteristiche analoghe ai ceppi CCoV di riferimento (Insavc e K378), l'altro invece

racchiude virus che segregano insieme a FCoVs e che probabilmente rappresentano un *outlier* distinto (Pratelli et al., 2003a). Questi dati preliminari sono stati ulteriormente confermati dall'analisi del gene S che ha dimostrato inequivocabilmente la esistenza nel cane di un nuovo genotipo di CCoV. L'analisi di sequenza del gene S del nuovo genotipo virale ha rivelato una bassa identità nucleotidica (61%) e aminoacidica (54%) con i ceppi CCoV di riferimento e, al contrario, una elevata identità nucleotidica (77%) e aminoacidica (81,7%) con FCoV tipo I. Sulla base di questa stretta identità con FCoV tipo I, il nuovo genotipo è stato indicato come CCoV tipo I, mentre quello "classico" come CCoV tipo II (Pratelli et al., 2003b).

L'aspetto più intrigante dell'intera questione è tuttavia emerso da alcuni risultati preliminari che indicavano la contemporanea presenza di CCoV tipo I e II nello stesso soggetto. Volendo approfondire e confermare questo dato, è stata effettuata un'indagine virologica mirata su diversi campioni di feci di cuccioli con diarrea.

MATERIALI E METODI

Campioni

L'indagine è stata effettuata su 69 campioni di feci raccolti da cuccioli di età compresa tra 6 e 12 mesi e di diverse regioni d'Italia. Tutti i cuccioli testati presentavano sintomi di gastroenterite acuta di diversa entità e in alcuni soggetti era di tipo emorragico. I campioni risultati positivi al test PCR per CCoV (Pratelli et al., 1999b) e negativi al test di emoagglutinazione per parvovirus tipo 2 (CPV2), erano stati conservati a -70°C fino al momento dell'esame.

Isolamento su colture cellulari

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari: cellule in linea continua di fibroma di cane A-72 e cellule in linea continua di feto di gatto fcwf-4. I campioni di feci sono stati omogenati al 10% in D-MEM contenente antibiotici (5000 UI/ml penicillina, 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anfotericina), centrifugati a 4000 x g per 20 min a $+4^{\circ}\text{C}$ e i surnatanti sono stati utilizzati per inoculare i monostrati cellulari. Le colture cellulari sono state incubate a 37°C in termostato a CO_2 ed osservate quotidianamente per l'eventuale comparsa di effetto citopatico (ecp). Dopo 5 giorni di incubazione è stato effettuato il test di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando anticorpi monoclonali specifici (MoAbs) per coronavirus.

Test PCR per CCoV

L'estrazione dell'RNA virale dai campioni di feci è stata effettuata utilizzando il kit commerciale RNeasy kit (*Qiagen GmbH, Germany*). Tutti i campioni sono stati testati per la ricerca di CCoV tipo I e CCoV tipo II analizzando frammenti del gene M e del gene S dei due virus. La PCR è stata anche effettuata sui criolisati del terzo passaggio su colture cellulari degli stipiti isolati. L'RNA virale è stato trascritto con primers random e la MuLV RT (*Applied Bio-*

systems, Roma, Italy). La sequenza e la posizione delle diverse coppie di primers utilizzate per le diverse PCR sono riportate nella Tabella 1.

PCR per CCoV tipo I

La PCR è stata effettuata utilizzando due diverse coppie di primers. La prima coppia, CCoV1a-CCoV2, amplifica selettivamente un frammento di 239 bp del gene M di CCoV tipo I (Pratelli et al., 2002c). L'amplificazione è stata effettuata con AmpliTaq DNA polymerase (*Applied Biosystems, Roma, Italy*) utilizzando 35 cicli (94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min).

La seconda coppia di primers, EL1F-EL1R, che amplifica un frammento di 346 bp del gene S, è stata selezionata in una regione conservata del ceppo Elmo/02 di CCoV tipo I (Pratelli et al., 2003b). La reazione di PCR è stata condotta per 40 cicli (94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min).

PCR per CCoV tipo II

La coppia di primers Can1F-CCoV2, che amplifica selettivamente un frammento di 202 bp del gene M di CCoV tipo II, è stata selezionata sulla base dei *mismatch* tra CCoVs tipo II e CCoV tipo I di riferimento, ceppo 259/01 (Pratelli et al., 2003a). L'amplificazione è stata effettuata con 35 cicli (94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min).

I primers S5-S6 sono stati selezionati in base all'omologia di sequenza del gene S di diversi stipiti CCoV II di riferimento (Insavc, K378, C54, 5821) estrapolati dal DDBJ/EMBL/GeneBank. L'amplificato di 694 bp è stato ottenuto dopo 40 cicli di amplificazione (94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min).

Sequenziamento e analisi filogenetica

I prodotti PCR sono stati purificati attraverso colonnine *Ultrafree-DA* (Amicon, Millipore, Bedford, USA) e sequenziati presso la *Genome Express* (Grenoble - France). Per ciascuna regione la sequenza nucleotidica di tutti i campioni è stata determinata in tutte e due le direzioni e almeno su due differenti ampliconi. L'analisi di sequenza è stata eseguita utilizzando gli strumenti di analisi dell'NCBI (*National Center for Biotechnologies and Information*) e dell'EMBL (*European Molecular Biology Laboratories*). L'analisi filogenetica è stata effettuata con il programma MEGA, versione 2.1 (Kumar et al., 2001). I dendrogrammi sono stati realizzati utilizzando il metodo della parsimonia ed effettuando un bootstrapping in 100 repliche per fornire un supporto statistico.

I numeri di accesso e i riferimenti bibliografici delle sequenze dei geni M e S utilizzate nel presente studio sono riportate in Tabella 2.

Tabella 1
Sequenza e posizione dei primers utilizzati nel presente studio

Primer	Gene	Virus	Sequenza 5' verso 3'	Senso	Posizione	Amplificato
CCoV1a ^o CCoV2*	M	CCoV tipo I	GTGCTTCTCTTGAAGGTACA TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	+ -	6900-6920 7118-7138 ^a	239 bp
EL1F EL1R	S	CCoV tipo I	CAAGTTGACCGTCTTATTACTGGTAG TCATATACGTACCATTATAGCTGAAGA	+ -	3469-3494 ^b 3788-3814 ^b	346 bp
Can1F CCoV2*	M	CCoV tipo II	TAACATTGCTCTCAGGGAATTTG TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	+ -	6937-6959 ^a 7118-7138 ^a	202 bp
S5 S6	S	CCoV tipo II	TGCATTTGTGTCTCAGACTT CCAAGGCCATTTACATAAG	+ -	3545-3565 ^a 4219-4238 ^a	694 bp

^oPratelli et al., 2002c.

*Pratelli et al., 1999b.

^a La posizione dei primers è riferita alla sequenza di CCoV ceppo Insavc (numero di accesso: D13096).

^b La posizione dei primers è riferita alla sequenza di FCoV tipo I ceppo UCD1 (numero di accesso: AB088222).

Tabella 2a
Numeri di accesso del gene M dei ceppi utilizzati nel presente studio

Ceppo	Numero di accesso	Bibliografia
Insavc	D13096	(Horsburgh et al., 1992)
K 378*	/	/
UCD1	AB086902	(Motokawa et al., 1996)
Black	AB086903	(Motokawa et al., 1996)
79-1146	AF326575	(de Groot et al., 1987)
79-1683	AB086904	(Motokawa et al., 1996)
259/01	AF502583	(Pratelli et al., 2003a)

*Non indicato in GenBank.

Tabella 2b
Numeri di accesso del gene S dei ceppi utilizzati nel presente studio

Ceppo	Numero di accesso	Bibliografia
Insavc	D13096	(Horsburgh et al., 1992)
K 378	X77047	(Wesseling et al., 1994)
UCD1	AB088222	(Motokawa et al., 1996)
Black	AB088223	(Motokawa et al., 1996)
79-1146	X06170	(de Groot et al., 1987)
79-1683	X80799	(Lewis, direct submission)
Elmo/02	AY170345	(Pratelli et al., 2003b)

RISULTATI

Le prove di PCR per la caratterizzazione di CCoV tipo I sono risultate positive in 10 campioni (14,49%), fornendo un amplificato PCR atteso di 239 bp con la coppia di primers CCoV1a-CCoV2 del gene M, e un amplificato di 346 bp con la coppia di primers EL1F-EL1R che amplifica un frammento del gene S.

I test PCR effettuati con le coppie di primers Can1F-CCoV2 (202bp) e S5-S6 (694bp) che amplificano selettivamente il gene M e il gene S di CCoV tipo II, sono risultati positivi per 6 campioni testati (8,69%) (Fig. 1). CCoV tipo I e CCoV tipo II sono stati identificati in 53 dei 69 campioni testati (76,8%).

I monostrati di cellule A-72 e fcwf-4 inoculati con tredici campioni sono risultati positivi al test IFI per CCoV (Fig. 2) e hanno sviluppato un ecp riconducibile a CCoV. L'analisi mediante PCR di tutti i campioni da cui è stato possibile isolare CCoV, ha evidenziato la contemporanea presenza di entrambi i genotipi. Tuttavia, le prove di PCR effettuate sui criolisati del terzo passaggio seriale sulle colture cellulari di questi campioni hanno fornito esito positivo solo per CCoV tipo II evidenziando quindi la mancata crescita *in vitro* di CCoV tipo I.

L'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche del gene M e del gene S dei ceppi CCoV tipo I ha chiaramente evidenziato che i campioni amplificati non vengono raggruppati con i ceppi CCoV tipo II (CCoVs classici), ma

segregano con il nuovo genotipo CCoV tipo I, e in particolare con il ceppo 259/01 per quanto concerne il gene M (Pratelli et al., 2003a) e con il ceppo Elmo/02 per il gene S (Pratelli et al., 2003b) (Fig. 3A).

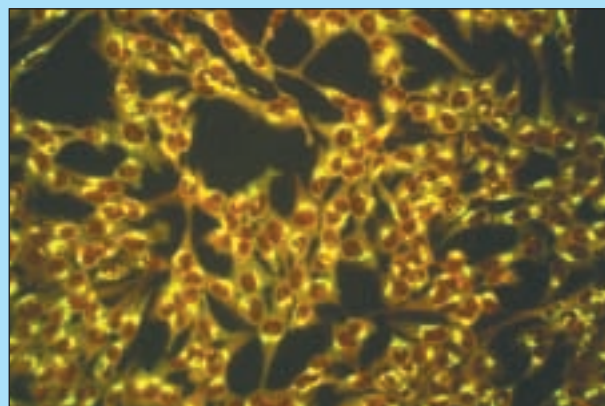


FIGURA 2 - Cellule A-72 infette con CCoV: immunofluorescenza con anticorpo monoclonale.

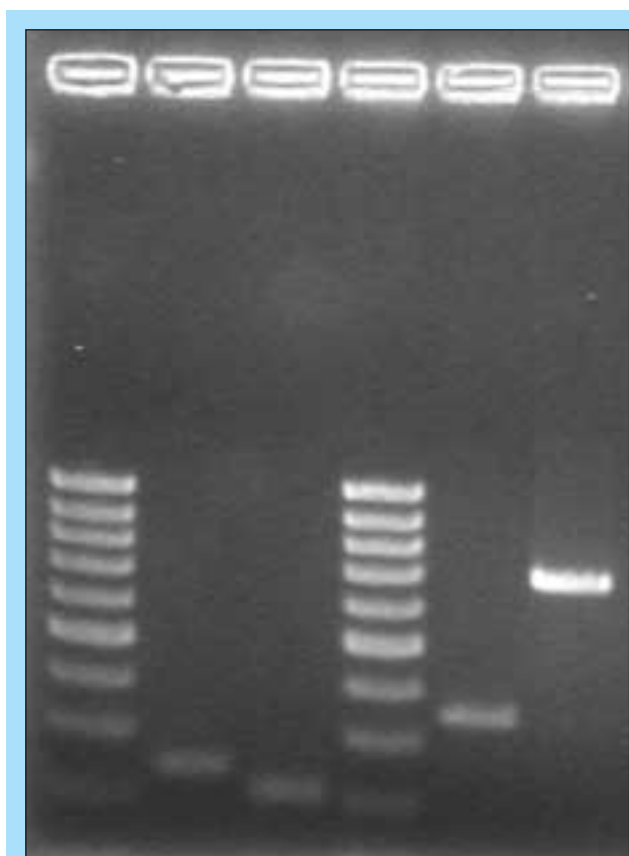


FIGURA 1 - PCR differenziale sul gene M e gene S di CCoV tipo I e CCoV tipo II. Linee 1 e 4: marker Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, Germania). Linea 2: gene M di CCoV tipo I (239 bp). Linea 3: gene M di CCoV tipo II (202 bp). Linea 5: gene S di CCoV tipo I (346 bp). Linea 6: gene S di CCoV tipo II (694 bp).

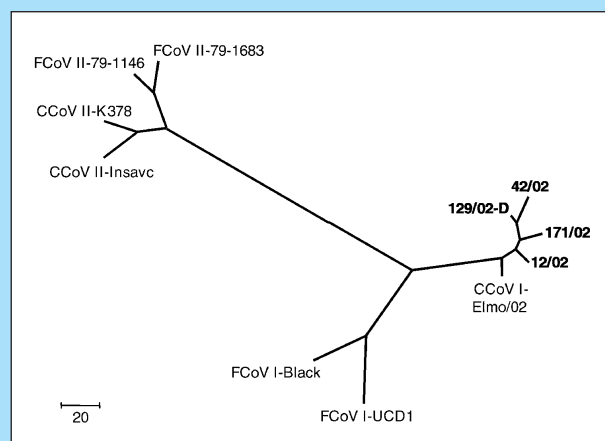


Figura 3A

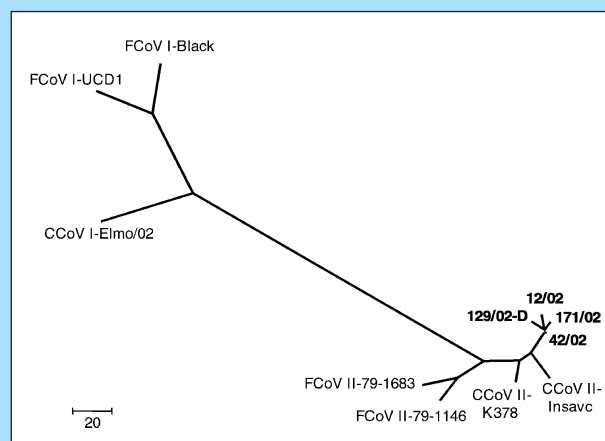


Figura 3B

FIGURA 3 - Dendrogrammi ottenuti con il metodo della parsimonia da frammenti del gene S di stipiti CCoV tipo I (A) e CCoV tipo II (B) presenti simultaneamente nei campioni di feci. (A) Frammento di 346 bp del gene S degli stipiti CCoV tipo I (primers EL1F-EL1R). (B) Frammento di 694 bp del gene S degli stipiti CCoV tipo II (primers S5-S6). I valori di bootstrap non sono riportati. In grassetto sono indicati i campioni di feci nei quali sono stati evidenziati entrambi i genotipi di CCoV.

Secondo quanto atteso l'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche dei frammenti del gene M e del gene S dei ceppi CCoV tipo II, ha evidenziato la stretta identità delle regioni amplificate con i ceppi CCoV tipo II e FCoV tipo II (Fig. 3B).

DISCUSSIONE

I risultati di indagini sierologiche effettuate nei canili e negli allevamenti (Pratelli et al., 2002b; Tennant et al., 1993) e i recenti dati di diagnosi virologica ottenuti con la PCR (Pratelli et al., 2000) indicano che l'infezione da CCoV è ampiamente diffusa nella popolazione canina e che, molto spesso, è responsabile di episodi di enterite più o meno gravi. Tuttavia la diffusione di CCoV è stata per molto tempo sottostimata e al virus è stato attribuito un ruolo di scarsa importanza nel determinismo delle gastroenteriti a causa del ridotto numero di isolamenti virali da campioni di feci di cani con diarrea (Pratelli et al., 2000). Indagini recenti hanno messo in evidenza una elevata variabilità genomica di CCoV, sia attraverso analisi del gene M che del gene S (Pratelli et al., 2001b; 2002a; 2003a; 2003b). Analoghe variazioni sono state osservate in altri coronavirus appartenenti allo stesso gruppo antigenico nei quali sono state spesso individuate delezioni e ricombinazioni che rappresentano un chiaro segnale dell'evoluzione genetica dei virus a RNA come i coronavirus. Ad esempio, la proteina S di PEDV ha caratteristiche intermedie tra TGEV e HCoV-229E (Kocherhans et al., 2001), mentre la glicoproteina S di PRCoV è strettamente correlata a quella di TGEV, ma presenta una estesa delezione, oltre 200 aminoacidi, all'estremità N-terminale responsabile della diversa patogenicità e diverso tropismo dei due virus (Vaughn et al., 1994). Anche nell'ambito dei coronavirus felini, è stata osservata un'ampia variabilità, al punto che si riconoscono due sierotipi, FCoV tipo I e FCoV tipo II. Il sierotipo II è il risultato di un processo di ricombinazione tra CCoV tipo II e FCoV tipo I a livello del gene M, del gene S e del gene della polimerasi (Herrewegh et al., 1998). CCoV tipo II ("classico") è un virus notoriamente correlato con FCoV tipo II, con TGEV e PRCoV, ma estremamente divergente da FCoV tipo I, PEDV e HCoV-229E (Wesseling et al., 1994). Il nuovo genotipo di CCoV risulta essere molto simile a FCoV tipo I (Pratelli et al., 2003b). L'indagine virologica effettuata nel presente studio conferma la presenza di questo nuovo e distinto genotipo di CCoV nelle feci di cani con diarrea. Di particolare rilievo è l'osservazione che l'infezione da CCoV nel cane è quasi sempre conseguenza di una duplice infezione da parte di CCoV tipo I e CCoV tipo II: 53 campioni dei 69 testati sono infatti risultati positivi ad entrambi i virus. Sono state anche confermate precedenti osservazioni circa la difficile adattabilità alla coltivazione *in vitro* di CCoV (Pratelli et al., 2000), dal momento che solo 13 campioni sono stati isolati su colture cellulari. È interessante notare che tutti gli isolati sulle cellule sono stati caratterizzati come CCoV tipo II e questo conferma quanto osservato a proposito di FCoV tipo I che cresce con estrema difficoltà *in vitro* rispetto a FCoV tipo II (Pedersen et al., 1984). Il mancato isolamento di CCoV tipo I rende sicuramente più complessi gli studi su questo nuovo

genotipo ed impedisce, al momento, di rispondere a tanti quesiti. Perché CCoV I e II infettano contemporaneamente il cane? Qual è l'esatto ruolo patogeno di entrambi i genotipi? Qual è la risposta immunitaria verso il nuovo genotipo? L'immunità è omotipica? ecc...

Gli aspetti non chiari sono ancora tanti, forse troppi, ma comprendere la biologia dell'infezione da CCoV può risultare di cruciale importanza sia per la profilassi di questa infezione nel cane, sia, soprattutto, per fornire un modello per lo studio delle infezioni da coronavirus, sicuramente più gravi, che recentemente hanno colpito l'uomo.

Parole chiave

Coronavirus, cane, genotipi.

Key words

Coronavirus, dog, genotypes.

Bibliografia

- Appel MJ, Cooper BJ, Greisen H, Scott F, Carmichael LE: Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet.* 69: 123-133, 1979.
- Bandai C, Ishiguro S, Masuya N, et al: Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 731-736, 1999.
- Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, et al: Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. Annu. Mtg. U.S. Anim. Health Assoc.* 78: 359-366, 1974.
- Carmichael LE, Binn LN: New canine enteric viral infection. *Adv. Vet. Sci.* 25: 1-37, 1981.
- de Haan CA, Vennema H, Rottier PJ: Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J. Virol.* 74: 4967-4978, 2000.
- de Groot RJ, Maduro J, Lenstra JA, et al: cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J. Gen. Virol.* 68: 2639-2646, 1987.
- de Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM., de Groot RJ: The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. *Semin. Virol.* 8: 33-47, 1997.
- Elia G, Decaro N, Tinelli A, et al: Evaluation of antibody response to canine coronavirus infection in dogs by Western Blotting analysis. *New Microbiologica* 25: 275-280, 2002.
- Gebauer F, Posthumus WAP, Correa I, et al: Residues involved in the formation of the antigenic sites of the S protein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virology* 183: 225-238, 1991.
- Herrewegh AAPM, Smeenk I, Horzinek MC, et al: Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J. Virol.* 72: 4508-4514, 1998.
- Horsburgh BC, Brierley I, Brown TD: Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2849-2862, 1992.
- Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K: Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 23: 137-144, 2001.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M: MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245, 2001.
- Luytjes W: Coronavirus gene expression: genome organization and protein expression. In: *The coronaviridae*. Ed. by SG Siddell. Plenum Press, New York, 1995, pp 33-49.
- Marsilio F, Pratelli A, Elia G, Ricci L: Enterite da coronavirus del cane: caratterizzazione del virus isolato. *Veterinaria* 2: 1-4, 2002.
- Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H: Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline canine and porcine coronaviruses. *Microbiol. Immunol.* 40: 425-433, 1996.
- Pedersen NC, Black JW, Boyle JF, et al: Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. In: *Molecular Biology and Pathoge-*

- nesis of Coronaviruses. Ed. by P JM Rottier, BAM van der Zeijst, WJM Spaan, MC Horzinek. Plenum Press, New York, 1984, pp 365-380.
- Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, et al: Enteriti virali del cane: risultati di un'indagine virologica. *Veterinaria*, Anno 13, n.6, 57-63, 1999a.
- Pratelli A, Tempesta M, Greco G, et al: Development of a nested PCR for the detection of canine coronavirus. *J. Virol. Methods* 80: 11-15, 1999b.
- Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, et al: Diagnosis of canine coronavirus infection using n-PCR. *J. Virol. Methods* 84: 91-94, 2000.
- Pratelli A, Martella V, Elia G, et al: Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. *J. Vet. Med. B* 48: 85-392, 2001a.
- Pratelli A, Martella V, Elia G, et al: Variation of the sequence in the gene encoding for transmembrane protein M of canine coronavirus (CCV). *Mol. Cell. Probes* 15: 229-233, 2001b.
- Pratelli A, Elia G, Martella V, et al: M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. *Vet. Rec.* 151: 758-761, 2002a.
- Pratelli A, Elia G, Martella V, et al: Prevalence of canine coronavirus antibodies in dogs in the south of Italy by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 102: 67-71, 2002b.
- Pratelli A, Tinelli A, Decaro N, et al: PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs. *J. Virol. Methods* 106: 209-213, 2002c.
- Pratelli A, Martella V, Pistello M, et al: Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *J. Virol. Methods* 107: 213-222, 2003a.
- Pratelli A, Martella V, Decaro N, et al: Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy. *J. Virol. Methods*, 110: 9-17, 2003b.
- Raamsman MJB, Locker JK, de Hooge A, et al: Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J. Virol.* 74: 2333-2342, 2000.
- Risco C, Antón IM, Sune C: Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. *J. Virol.* 69: 5269-5277, 1995.
- Rottier PJM: The coronavirus membrane protein. In: *The Coronaviridae*. Ed. SG Siddell. Plenum Press, New York, 1995, pp 115-139.
- Siddell SG: The coronaviridae, an introduction. In: *The Coronaviridae*. Ed. SG Siddell. Plenum Press, New York, 1995, pp 1-10.
- Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ: Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet. Rec* 132: 7-11, 1993.
- Tennant BJ, Gaskell RM, Gaskell CJ: Studies on the survival of canine coronavirus under different environmental conditions. *Vet. Microbiol.* 42:255-259, 1994.
- Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS: Three new isolates of porcine respiratory coronavirus with various pathogenicities and spike (S) gene deletions. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1809-1812, 1994.
- Wesseling JG, Vennema H, Godeke G, et al: Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 75: 1789-1794, 1994.



CALL FOR ABSTRACTS 2004 RHODES WSAVA/FECAVA WORLD CONGRESS

Rhodes, October 6-9, 2004

The WSAVA (World Small Animal Veterinary Association), FECAVA (Federation of European Companion Animal Veterinary Associations) and HVMS (Hellenic Veterinary Medical Society) welcome proposals for papers to be presented at the 2004 Rhodes WSAVA/FECAVA World Congress, to be held in the island of Rhodes (Greece) on October 6-9, 2004. Free oral and poster presentations will take place. Abstracts relating to research into any aspect of clinical small animal medicine and surgery including exotics, will be considered. Unique case reports of exceptional interest, but not reviews, will also be considered. The deadline for submission of abstracts is **April 25, 2004**. Abstracts may be submitted online or as an e-mail attachment or by post [two hard copies for each abstract on A4 paper and a 3.5" floppy disk (MS Word for Windows only) are required]. The abstract form may be downloaded from the Congress website. Complete information on abstract submission, instructions for abstract submission, instructions for abstract preparation, along with additional information about the Congress itself, are available online from the Congress website at:

www.hvms.gr/rhodes2004
www.triaenatours.gr/small_animal/
e-mail: efik@triaenatours.gr