

Epidemiologia del parvovirus del cane (CPV) in Europa: identificazione di una ulteriore mutante CPV-2c ed implicazioni diagnostiche

RIASSUNTO

Si riportano i risultati di un'indagine epidemiologica per parvovirus del cane (CPV) condotta in diversi Paesi europei mediante analisi di 615 campioni fecali di cani con gastroenterite acuta. Le metodiche molecolari utilizzate per l'identificazione e la caratterizzazione di CPV hanno mostrato che la variante CPV-2a è quella predominante nella maggior parte dei Paesi, seguita da CPV-2c e CPV-2b, mentre trenta ceppi non sono stati caratterizzati. Dall'analisi della sequenza dell'intero gene VP2 di 20 ceppi non caratterizzati è risultato che tali virus erano CPV-2c con la mutazione sinonima A406IG nel sito di attacco della sonda, la quale ne impediva il corretto annealing. È stato quindi messo a punto un test real-time PCR con sonde minor groove binder per l'identificazione dei virus CPV-2c classici e mutanti. L'identificazione di stipti CPV con mutazioni nella regione di attacco degli oligonucleotidi richiede un continuo aggiornamento degli strumenti di diagnostica molecolare, in modo da rilevare in maniera ottimale gli eventuali stipti mutanti.

INTRODUZIONE

Il parvovirus del cane (CPV) è uno dei principali agenti causali di gastroenterite acuta dei cuccioli¹, unitamente al coronavirus del cane^{2,3}, all'adenovirus del cane tipo I⁴ ed al virus del cimurro⁵.

Dopo la prima comparsa alla fine degli anni settanta, il virus originario CPV-2 si è evoluto dando origine a due differenti varianti antigeniche, CPV-2a e CPV-2b, le quali hanno sostituito il vecchio tipo, ormai non più in circolazione da diverso tempo^{6,7}. Una terza variante antigenica, CPV-2c, è stata identificata per la prima volta nel 2000 in Italia⁸ e successivamente si è diffusa in Europa^{9,10,11,12,13,14,15,16,17}, Asia^{18,19}, America^{20,21,22,23,24} e Africa²⁵. Rispetto all'originale tipo CPV-2, le varianti antigeniche, in particolare la variante 2c, sono più virulente e possono infettare e causare malattia anche nei cani vaccinati^{26,27,28,29} nonché nei gatti^{30,31}.

Attualmente la diagnosi di infezione da CPV è effettuata con tecniche basate sul rilievo dell'antigene^{32,33,34,35,36} o dell'acido nucleico^{37,34,36,38}. Inoltre, in corso di studi epidemiologici, è necessario effettuare la caratterizzazione del virus con l'inibizione dell'emoagglutinazione oppure con metodi molecolari^{39,40,41,42,43,36,44,38}. Ad oggi la real-time PCR con sonde *minor groove binder* (MGB) rappresenta il metodo più rapido ed inequivocabile per identificare le varianti antigeniche di CPV^{39,40,41,42,43}. Questi metodi si basano sulla complementarità perfetta tra le sonde MGB specifiche e la regione del genoma del virus da caratterizzare, in modo che anche un singolo polimorfismo nucleotidico (SNP) possa essere facilmente discriminato. L'identificazione di ceppi CPV-2c con una mutazione inattesa nella regione di legame della sonda specie-specifica (mutazione A406IG nel gene della proteina VP2) ha evidenziato la necessità di aggiornare gli strumenti molecolari diagnostici per l'identificazione di queste mutazioni⁴⁵. Il presente lavoro riporta i dati sulla diffusione dei ceppi CPV-2c mutanti insieme alla messa a punto di un test MGB specifico in grado di superare i limiti di natura metodologica dei test esistenti.

MATERIALI E METODI

Raccolta ed analisi dei campioni

Sono stati analizzati 615 campioni fecali raccolti nel periodo 2009-2012 da cani con gastroenterite acuta in diverse nazioni europee, in particolare l'Italia ($n = 518$), la Gran Bretagna ($n = 30$), la Spagna ($n = 41$), la Germania ($n = 10$), la Francia ($n = 7$), il Belgio ($n = 2$) e l'Ungheria ($n = 7$) (Tabella 1). I soggetti sottoposti a campionamento sono stati reclutati in canili, negozi di animali e in ambulatori privati o universitari.

I campioni sono stati omogenizzati (10% peso/volume) in terreno di Dulbecco modificato da Eagle (DMEM) e successivamente chiarificati tramite centrifugazione a $2.500 \times g$ per 10 min. Il DNA virale è stato

M. Losurdo^{1,2}, C. Desario¹, A. Parisi²,
M. Terlizzi¹, G. Elia¹, V. Martella¹,
C. Buonavoglia¹, N. Decaro¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Valenzano (BA)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 09/10/2012 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 22/01/2013".

TABELLA 1
Risultati dell'attività di sorveglianza per parvovirus del cane in alcuni Paesi europei

Nazione	Numero di campioni	Campioni positivi				Non caratterizzati
		CPV	CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c	
Italia	518	360	186	50	94	30
Regno Unito	30	23	11	12	0	0
Spagna	41	19	4	11	4	0
Germania	10	8	5	2	1	0
Francia	7	7	4	2	1	0
Belgio	2	2	1	1	0	0
Ungheria	7	6	6	0	0	0
Totale	615	425	217	78	100	30

estratto dai supernatanti degli omogenati fecali attraverso bollitura per 10 min e successivo raffreddamento in ghiaccio. Ciascun estratto di DNA è stato diluito 1:10 in acqua distillata per ridurre gli inibitori della PCR a concentrazioni inefficaci⁴¹. Il DNA di CPV è stato rilevato mediante real-time PCR con sonda TaqMan convenzionale³⁷, mentre la caratterizzazione del virus è stata ottenuta con diversi test real-time PCR con sonde MGB in grado di identificare le varianti antigeniche e di discriminare i ceppi vaccinali da quelli di campo di CPV^{40,42}. Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati sono riportate nella Tabella 2.

Analisi di sequenza e filogenetica dei ceppi CPV non caratterizzati

Gli estratti di DNA di 20 dei 30 campioni fecali contenenti i ceppi non caratterizzati sono stati sottoposti ad amplificazione in PCR di tre frammenti che coprono l'intera sequenza del gene VP2^{46,45}. Le reazioni di sequenziamento sono state condotte utilizzando la mix BigDye 3.1 Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) secondo le istruzioni della casa produttrice. I prodotti sequenziati sono stati separati mediante Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Le sequenze sono state importate e assemblate con il software Bionumerics 5.0 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgio). Le sequenze assemblate sono state depositate nell'archivio GenBank sotto i numeri di accesso JX305946-JX305965 ed analizzate utilizzando il BioEdit software package⁴⁷ e gli strumenti di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ed EMBL (www.ebi.ac.uk). Le sequenze ottenute sono state confrontate con analoghe sequenze di ceppi di riferimento disponibili in GenBank. Le relazioni filogenetiche sono state determinate utilizzando il software Mega 4.0⁴⁸ ed il metodo neighbor-joining. Il livello di confidenza di ciascun nodo è stato verificato mediante analisi bootstrap con 1000 repliche ed i valori di bootstrap > 70% sono stati considerati significativi.

Messa a punto di un test real-time PCR con sonda MGB per l'identificazione della mutazione A4061G di CPV-2c

Tutti gli stipiti non caratterizzati (20 ceppi sottoposti ad analisi di sequenza del gene VP2 ed ulteriori 10 ceppi non sequenziati), sono stati testati mediante un protocollo di real-time PCR con sonda MGB per l'identificazione rapida di CPV-2c mutanti.

La sonda specifica per CPV-2c disegnata in uno studio precedente⁴¹ è stata modificata tenendo conto della sostituzione sinonima A4061G rilevata nel gene della proteina VP2 dei ceppi mutanti. La sonda è stata contrassegnata con fluoroforo e gruppo MGB rispettivamente alle estremità 5' e 3' (Tabella 2). I primer e le condizioni di PCR erano le stesse del protocollo di caratterizzazione delle varianti 2b e 2c⁴¹ (Tabella 2).

Il DNA standard è stato ottenuto da un campione di feci di campo caratterizzato come mutante di CPV-2c⁴⁵. Il quantitativo di DNA virale è stato calcolato mediante real-time PCR per l'identificazione di tutti i ceppi di CPV³⁷ ed il DNA standard è stato sottoposto a diluizioni logaritmiche in base 10 in una sospensione fecale negativa. Le aliquote di ciascuna diluizione sono state congelate a -70°C e utilizzate una volta sola. Le concentrazioni di DNA standard comprese tra 10⁹ e 10⁰ copie di DNA/10 µl del template sono state utilizzate per determinare la sensibilità e la linearità del test diagnostico. I valori di ciclo soglia (C_T) sono stati misurati in triplice copia. La specificità dell'analisi è stata determinata processando alte e basse concentrazioni del DNA delle tre varianti di CPV (2a, 2b e ceppi classici di 2c), preparazioni di DNA di altri virus del cane non correlati, inclusi il parvovirus tipo 1 o virus minuto del cane⁴⁹, l'herpesvirus del cane tipo 1⁵⁰, l'adenovirus del cane tipo 1⁵¹ e tipo 2⁵², oppure acqua sterile. Le riproducibilità intra-assay e inter-assay sono state determinate utilizzando campioni contenenti concentrazioni alte, medie e basse di DNA standard di-

TABELLA 2
Sequenza, posizione e specificità degli oligonucleotidi utilizzati nei test real-time PCR del presente studio

Test	Primer/sonda	Sequenza (5' - 3')	Polarità	Specificità	Posizione	Ampiezza amplificata
Test TaqMan ^a	CPV-For	AAACAGGAATTAACATACTAATATATTTA	+	Tutte le varianti	4104-4135 ^e	95 bp
	CPV-Rev	AAATTTGACCATTTGGATAAACT	-		4176-4198 ^e	
	CPV-Pb	FAM - TGGTCCTTTAACTGCATTAATAATGTACC - TAMRA	+		4143-4172 ^e	
Test MGB 2a/2b ^b	CPVa/b-For	AGGAAGATATCCAGAAGGAGATTGGA	+	Tutte le varianti	1719-1744 ^{fg}	93 bp
	CPVa/b-Rev	CCAATTGGATCTGTTGGTAGCAATACA	-		1785-1811 ^{fg}	
	CPVa-Pb	VIC - CTCCTGTAACAAATGATA - MGB	+	CPV-2a	1765-1783 ^f	
	CPVb1-Pb	FAM - CTCCTGTAACAGATGATA - MGB	+	CPV-2b	1765-1783 ^g	
Test MGB 2b/2c ^b	CPVb/c-For	GAAGATATCCAGAAGGAGATTGGATTCA	+	Tutte le varianti	1721-1748 ^g	150 bp
	CPVb/c-Rev	ATGCAGTTAAAGGACCATAAGTATTAATATATTAG TATAGTTAATTC	-		1155-1182 ^h	
	CPVb2-Pb	FAM - CCTGTAACAGATGATAAT - MGB	+	CPV-2b	1823-1870 ^g	
	CPVc-Pb	VIC - CCTGTAACAGAAGATAAT - MGB	+	CPV-2c	1257-1304 ^h	
	mCPVc-Pb	VIC - CCTGTAACGGAAGATAAT - MGB	+	CPV-2c (A4061G)	1768-1785 ^g	
					1202-1219 ^h	
Test MGB CPV-2/varianti ^c	CPV2/v-For	GCAGTTAACGGAAACATGGCTTTAG	+	Tutte le varianti	3057-3081 ^e	68 bp
	CPV2/v-Rev	TCAACCAATGACCAAGGTGTTACAA	-		772-796 ^f	
	CPV2-Pb	FAM - TGTGCATGAATATCAT - MGB	+	CPV-2 (tipo originale)	3100-3124 ^e	
	CPVv-Pb	VIC - TTTGTGCATGAGTATCAT - MGB	+	Stipiti di campo	815-839 ^f	
				3082-3097 ^e	797-814 ^f	
Test MGB SAH/field ^d	SAH/f-For	CAACAAGATAAAAAGACGTGGTGTAACCTC	+	Tutte le varianti	3711-3738 ^e	85 bp
	SAH/f-Rev	CAACCTCAGCTGGTCTCATAATAGT	-		1426-1453 ^g	
	SAH-Pb	VIC-AAATGGGAAAAACAACT-MGB	+	Stipite SAH	3771-3795 ^e	
	CPVf1-Pb	FAM-AAATGGGAAATACAACT-MGB	+	Stipiti di campo	1486-1510 ^g	
				1454-1471 ^e	1454-1471 ^g	
Test MGB 39/field ^d	CPV39/f-For	GCATTGGGCTTACCACCATTCTAA	+	Tutte le varianti	3636-3660 ^e	95 bp
	CPV39/f-Rev	CCACGTCTTTTATCTTGTTGAACTCCTATA	-		1351-1375 ^g	
	CPV39-Pb	VIC-CTTTGCCTCAATCTGAA-MGB	+	Stipite CPV-39	3701-3730 ^e	
	CPVf2-Pb	FAM- TTTGCCTCAAGCTGAA-MGB	+	Stipiti di campo	1416-1445 ^g	
				1379-1395 ^g	1380-1395 ^g	

^a [37]. ^b [41]. ^c [40]. ^d [42].

^{e,f,g,h} La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza di ^e CPV-2 (tipo originario) stipite CPV-b (numero di accesso M38245).

^f CPV-2a stipite CPV-15 (M24003), ^g CPV-2b stipite CPV-39 (M74849), ^h CPV-2c stipite 56/00 (AY380577).

luito in una sospensione fecale negativa per CPV. I coefficienti di variazione (CV) sono stati calcolati come descritto in precedenza^{37,40,41,42}.

RISULTATI

Epidemiologia delle varianti di CPV-2

Quattrocentoventicinque campioni fecali (69,10%) sono risultati positivi per CPV, tra cui 360/518 campioni italiani (69,5%), 23/30 britannici (76,6%), 19/41 spagnoli (46,3%), 8/10 tedeschi (80%), 7/7 francesi (100%), 2/2 belgi (100,0%) e 6/7 ungheresi (85,7%). Sebbene la distribuzione degli stipiti di CPV variasse sulla base del Paese di

origine dei campioni, CPV-2a è stata la variante più frequentemente identificata, con una maggiore incidenza in Italia, Germania, Francia, Belgio e Ungheria (Tabella 1). La variante CPV-2c è risultata largamente diffusa in Italia e in Spagna, mentre non è stata evidenziata in Ungheria, Belgio e Regno Unito, sebbene la scarsità del campione potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti per questi Paesi. CPV-2b è risultato predominante in Spagna e nel Regno Unito, ma in quest'ultimo anche la variante CPV-2a è stata rilevata con frequenza elevata. Da evidenziare che 30 campioni italiani (8,3% del totale dei campioni positivi per CPV), risultati positivi all'analisi TaqMan, non sono stati caratterizzati mediante analisi tipo-specifiche con sonde MGB.

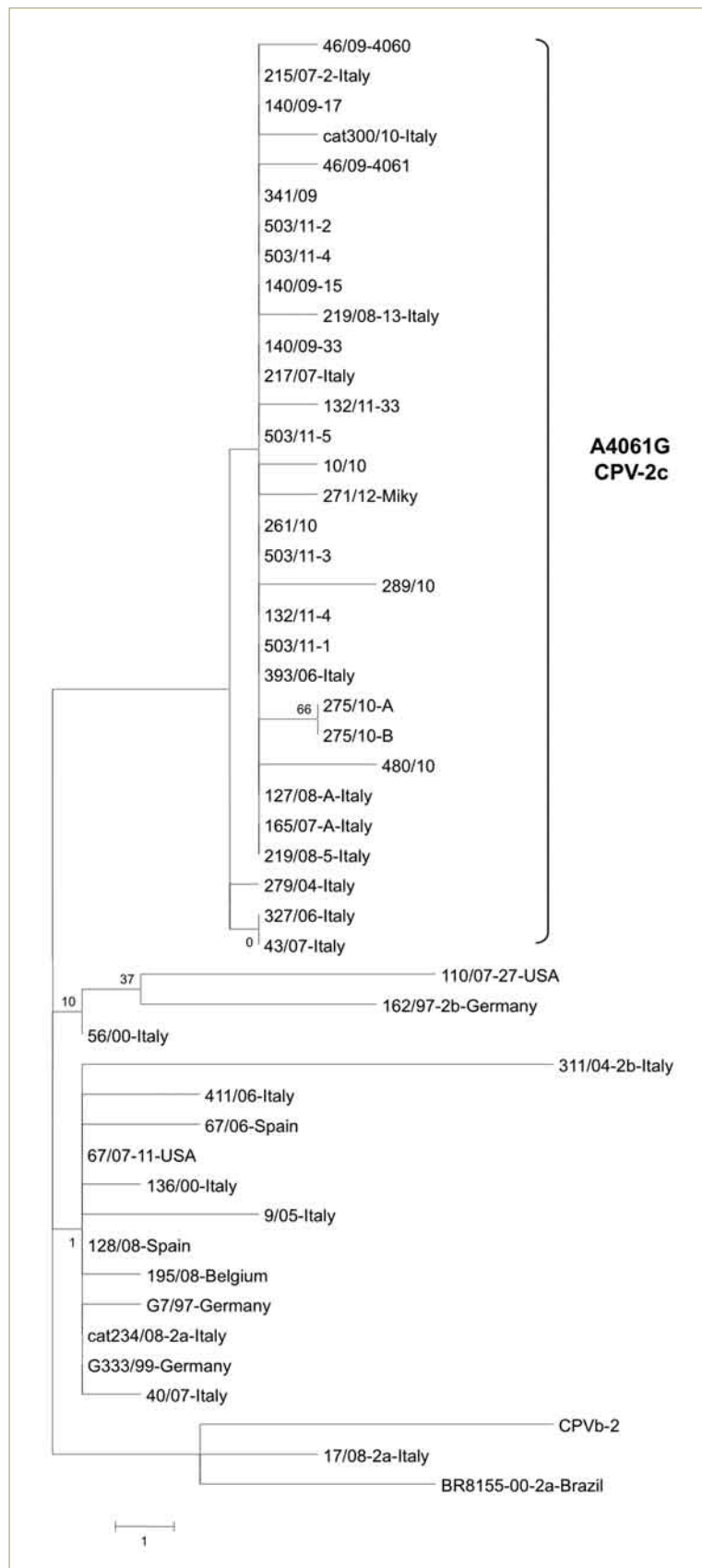


FIGURA 1 - Albero filogenetico costruito con il metodo neighbor-joining sulla sequenza nucleotidica del gene VP2 (1.755 nucleotidi) degli stipti CPV-2c con la mutazione A4061G. I virus di riferimento sono stati selezionati da studi precedenti^{30,45}. La barra rappresenta il numero stimato di sostituzioni nucleotidiche per sito; i valori di bootstrap sono stati calcolati in 1000 repliche e sono indicati in corrispondenza di ciascun nodo. Se non indicato diversamente, gli stipti appartengono alla variante CPV-2c.

Rilevazione e caratterizzazione molecolare dei ceppi A4061G di CPV-2c

Venti ceppi atipici sono stati sottoposti all'analisi di sequenza del gene della proteina VP2, mostrando le mutazioni aminoacidiche (aa) tipiche delle varianti rispetto al ceppo CPV-2 originale (M87L, I101T, A300G, D305Y, N375D), compresa la mutazione S297A identificata negli isolati recenti. La presenza del codone GAA in posizione 4062-4064, che corrisponde al residuo E426 della proteina VP2 codificata, ha permesso di assegnare gli stipti non caratterizzati alla variante CPV-2c. Tuttavia, la mutazione sinonima A4061G è stata individuata nella regione di attacco della sonda specifica della variante 2c, determinando l'assenza di fluorescenza VIC nel test MGB 2b/2c⁴¹. Inoltre, 10 mutazioni puntiformi sono state individuate a livello nucleotidico (nt), tutti singleton, ad eccezione di due ceppi identici (275/10-A e 275/10-B) che condividevano la sostituzione G3119A. Di queste, sette mutazioni erano non-sinonime.

Mediante analisi di sequenza, gli stipti A4061G sono risultati strettamente correlati tra di essi, mostrando identità nt pari al 99,7-100%, mentre la correlazione con i classici stipti CPV-2c era leggermente più bassa (99,2-100% di identità nt).

L'albero filogenetico, costruito con il metodo neighbor-joining a partire dalle 20 sequenze nucleotidiche del gene VP2 dei ceppi A4061G e da 29 sequenze disponibili nel database GenBank, non è stato supportato da alti valori di bootstrap, ad eccezione di alcuni nodi, confermando che il gene VP2 non è altamente informativo da un punto di vista filogenetico, a causa della bassa variabilità osservata^{45,35}. Non è stata osservata una chiara separazione dei ceppi analizzati in base alla variante di appartenenza, confermando dunque che le mutazioni A4062G e T4064A, che differenziano rispettivamente CPV-2a da CPV-2b e CPV-2b da CPV-2c, non sono monofiletiche⁵³. Allo stesso tempo, tutti i ceppi A4061G sono stati inclusi in un cluster monofiletico, separato chiaramente da quelli comprendenti i virus CPV-2c classici (Fig. 1).

Performance del test real-time PCR con sonda MGB per l'identificazione della mutazione A4061G di CPV-2c

Il test MGB per l'identificazione dei ceppi mutanti di CPV-2c è risultato altamente sensibile, riuscendo a rilevare fino a 10¹ copie di DNA virale, mentre la curva standard ha dimostrato una forte correlazione lineare nel range compreso tra 10¹ e 10⁹ copie (slope = 3,288, coefficiente di correlazione = 0,992). Inaspettatamente, le prove di specificità hanno evidenziato che i ceppi classici di CPV-2c erano rilevati con la stessa efficienza dei virus mutanti, in quanto i segnali di fluorescenza VIC sono stati generati non solo dai virus A4061G ma anche da tutti gli al-

tri stipiti caratterizzati dal residuo E426. Al contrario, nessuno degli altri virus della specie canina analizzati, compresi CPV-2, CPV-2a e CPV-2b, hanno mostrato cross-reattività con la sonda costruita sui ceppi CPV-2c mutanti. I CV intra-assay erano compresi tra il 7,21% (campione contenente $2,88 \times 10^7$ copie del DNA) ed il 43,44% ($1,54 \times 10^2$ copie del DNA), mentre i CV interassay variavano dal 14,32% ($2,14 \times 10^5$ copie del DNA) al 34,95% ($1,01 \times 10^3$ copie del DNA). Al fine di includere la mutante A4061G nel test MGB per la discriminazione tra CPV-2b e CPV-2c, la sonda originalmente progettata per identificare la variante 2c è stata sostituita da quella costruita per i ceppi mutanti, mantenendo gli altri oligonucleotidi e le condizioni di reazione precedentemente descritti⁴¹. Questa sostituzione ha comportato la corretta identificazione di CPV-2b (fluorescenza FAM) e di tutti i ceppi di CPV-2c, mutanti e classici (fluorescenza VIC).

DISCUSSIONE

In questo studio sono stati analizzati complessivamente 615 campioni fecali di cane di diversa origine geografica. I risultati hanno mostrato che 425 campioni erano positivi per CPV e che CPV-2a rappresenta la variante predominante nel continente europeo. Al contrario, CPV-2c è stato individuato con frequenza inferiore rispetto a quanto osservato in precedenza¹³. Perez e colleghi hanno osservato che CPV-2c, diffusosi in Uruguay tra il 2007 ed il 2009, negli ultimi anni è stato completamente sostituito da uno stipite CPV-2a⁵⁴. Mentre gli studi precedenti hanno evidenziato una diffusione rapida di CPV-2c in Europa e una decrescente frequenza di identificazione delle varianti 2a/2b^{9,10,11,12,13,14,15,16,17}, il presente lavoro testimonia una nuova espansione di CPV-2a. Tuttavia, la completa sostituzione di CPV-2c da parte di CPV-2a non è stata registrata nel continente europeo.

A differenza del suo antenato, il virus della panleucopenia felina (FPLV), che è sostanzialmente in stasi evolutiva⁴⁶, CPV è in continua evoluzione, probabilmente in conseguenza dell'accumulo di errori della polimerasi durante la replicazione virale^{55,53}. Durante lo shift dal tipo originale 2 alle sue varianti CPV2a/2b, le mutazioni sono state accumulate nei domini della VP2 responsabili del legame con il recettore canino della transferrina (TfR)⁵⁵. Al contrario, le differenze genetiche fra CPV-2a, 2b e 2c si limitano ad un singolo residuo e consistono nella mutazione N426D/E, collocata nel più importante sito antigenico, l'epitopo A^{6,56}. Ulteriori mutazioni nel gene VP2 sono state descritte più recentemente¹, in particolare le mutazioni A4104G^{21,45} e A4061G⁴⁵ individuate in recenti isolati di CPV-2c. Mentre la prima mutazione non ha inficiato i protocolli molecolari di caratterizzazione delle varianti antigeniche, la seconda,

localizzata nel sito di attacco della sonda specifica per CPV-2c, impedisce la corretta ibridazione della sonda e la caratterizzazione dei ceppi mutanti⁴⁵. Il presente studio evidenzia che la distribuzione dei virus mutanti A4061G è attualmente limitata alla sola Italia, anche se con una crescente diffusione, considerato che l'8,3% dei campioni risultati positivi per CPV e provenienti da diverse regioni italiane sono risultati mutanti CPV-2c. La bassa rappresentatività del campionamento effettuato in altri Paesi non permette di escludere definitivamente la circolazione della mutante A4061G anche perché l'identificazione delle varianti antigeniche non è effettuata comunemente per scopi diagnostici, ma solo per scopi di ricerca e per studi epidemiologici. Questo inevitabilmente limita le informazioni per scopi terapeutici e/o profilattici. Inoltre, anche quando è richiesta la caratterizzazione del ceppo, bisogna considerare che solo pochi laboratori diagnostici ed universitari sono in grado di effettuare i test con sonde MGB, per cui la reale circolazione della mutante CPV-2c potrebbe essere sottostimata in diverse parti del mondo.

CONCLUSIONI

L'emergere di ceppi mutanti può avere effetti negativi sugli strumenti diagnostici basati sull'amplificazione dell'acido nucleico, a causa del verificarsi di mutazioni nelle regioni di attacco degli oligonucleotidi. Di conseguenza, le tecniche molecolari devono essere costantemente aggiornate in modo da essere al passo con le eventuali mutanti che si presentano nel corso del tempo.

Parole chiave

Cane; parvovirus; sorveglianza epidemiologica; mutante CPV-2c.

■ Canine parvovirus epidemiology in Europe: detection of a type 2c with a non-coding mutation in the main capsid protein gene and its implications for molecular characterisation

Summary

The results of an epidemiological survey for canine parvovirus (CPV) in European countries are reported. Faecal samples collected from 615 dogs with acute gastroenteritis were analysed by using molecular methods, showing that CPV-2a is the predominant variant in most countries, followed by CPV-2c and CPV-2b. Thirty uncharacterised strains were types as CPV-2c by sequence analysis of the full-length VP2 gene, but they displayed the non-coding mutation A4061G in the probe-binding region, which prevented the correct oligo-

nucleotide annealing. A minor groove binding probe assay was developed for the detection of the A4061G mutant and classical CPV-2c strains. The detection of mutations in the oligonucleotide-binding region highlights the need to update the mo-

lecular diagnostic tools in order to identify emerging mutant CPVs.

Key words

Dog; canine parvovirus; epidemiology; CPV-2c mutant.

BIBLIOGRAFIA

- Decaro N, Buonavoglia C: Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol* 155: 1-12, 2012.
- Decaro N, Buonavoglia C: An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol* 132: 221-234, 2008.
- Decaro N, Buonavoglia C: Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38: 799-814, 2011.
- Decaro N, Martella V, Buonavoglia C, et al: Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract Practice* 38: 799-814, 2008.
- Martella V, Elia G, Buonavoglia C: Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38: 787-797, 2008.
- Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, et al: Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 65: 6544-6552, 1991.
- Truyen U, Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet Microbiol* 117: 9-13, 2006.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol* 82: 1555-1560, 2001.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, et al: A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol* 42: 1333-1336, 2004.
- Martella V, Decaro N, Elia G, et al: Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med B* 52: 312-315, 2005.
- Decaro N, Martella V, Desario C, et al: First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B* 53: 468-472, 2006.
- Decaro N, Desario C, Addie D, et al: Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13: 1222-1224, 2007.
- Decaro N, Desario C, Billi M, et al: Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet J* 187: 195-199, 2011.
- Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, et al: Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *J Vet Diagn Invest* 20: 488-491, 2008.
- Ntakis V, Xylouri E, Kalli I, et al: Characterization of Canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. *J Vet Diagn Invest* 22: 737-740, 2010.
- Filipov C, Decaro N, Desario C, et al: Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *J Vet Diagn Invest* 23: 152-154, 2011.
- 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* 14: 379-384, 2011.
- Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, et al: A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 149: 2261-2269, 2004.
- Nandi S, Chidri S, Kumar M, et al: Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Res Vet Sci* 88: 169-171, 2010.
- Hong C, Decaro N, Desario C, et al: Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19: 535-539, 2007.
- Kapil S, Cooper E, Lamm C, et al: Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 45: 4044-4047, 2007.
- Pérez R, Francia L, Romero V, et al: First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 124: 147-152, 2007.
- Calderón MG, Romanutti C, D'Antuono A, et al: Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res* 157: 106-110, 2011.
- Pinto LD, Streck AF, Gonçalves KR, et al: Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res* 165: 29-33, 2012.
- Touihri L, Imen Daoud R, Desario C, et al: First characterization of canine parvovirus strains circulating in dogs in Tunisia. *Virus Gen* 38: 249-258, 2009.
- Decaro N, Desario C, Elia G, et al: Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol* 31: 125-130, 2008.
- Decaro N, Cirone F, Desario C, et al: Severe parvovirosis in a repeatedly vaccinated 12-year-old dog. *Vet Rec* 164: 593-595, 2009.
- Calderón MG, Mattion N, Bucafusco D, et al: Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J Virol Methods* 159: 141-145, 2009.
- Castro TX, Costa EM, Leite JP, et al: Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res Vet Sci* 90: 336-340, 2011.
- Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, et al: Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res Vet Sci* 89: 275-278, 2010.
- Decaro N, Desario C, Amorisco F, et al: Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *J Feline Med and Sur* 13: 231-236, 2011.
- Esfandiari J, Klingeborn B: A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J Vet Med B* 47: 145-153, 2000.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, et al: Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods* 121: 179-185, 2005.
- Schmitz S, Coenen C, König M, et al: Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 21: 344-345, 2009.
- Decaro N, Desario C, Beall MJ, et al: Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet J* 184: 373-375, 2010.
- Kumar M, Nandi S: Molecular typing of canine parvovirus variants by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Transbound Emerg Dis* 57: 458-463, 2010.
- 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: 19-28, 2005.
- Parthiban M, Divya KC, Kumanan K, et al: A rapid and highly reliable field-based LAMP assay of canine parvovirus. *Acta Virol* 56: 71-74, 2012.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, et al: New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B* 52: 316-319, 2005.
- Decaro N, Elia G, Desario C, et al: 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* 136: 65-70, 2006.
- 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: 92-99, 2006.
- Decaro N, Martella V, Elia G, et al: Diagnostic tools based on minor groove binder probe technology for rapid identification of vaccinal and field strains of canine parvovirus type 2b. *J Virol Methods* 138: 10-16, 2006.
- Decaro N, Desario C, Lucente MS, et al: Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes. *J Virol Methods* 147: 67-71, 2008.
- Naidu H, Subramanian BM, Chinchkar SR, et al: Typing of canine parvovirus isolates using mini-sequencing based single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol Methods* 181: 197-201, 2012.
- Decaro N, Desario C, Parisi A, et al: Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385: 5-10, 2009.
- Decaro N, Desario C, Miccolupo A, et al: Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J Gen Virol* 89: 2290-2298, 2008.
- Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98, 1999.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599, 2007.
- 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: 291-298, 2002.
- 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: 176-180, 2010.
- Decaro N, Campolo M, Elia G, et al: Infectious canine hepatitis: An "old" disease reemerging in Italy. *Res Vet Sci* 83: 269-273, 2007.
- Decaro N, Camero M, Greco G, et al: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol* 27: 177-181, 2004.
- Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR, et al: Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* 89: 2280-2289, 2008.
- Pérez R, Bianchi P, Calleros L, et al: Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet Microbiol* 155: 214-219, 2012.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, et al: High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 379-384, 2005.
- Martella V, Decaro N, Buonavoglia C: Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Gen* 33: 11-13, 2006.