

Malattia respiratoria del cane associata ad infezione da *Canine pneumovirus*: prima segnalazione in Italia

RIASSUNTO

Si riportano i risultati delle indagini virologiche e molecolari condotte nell'ambito di un focolaio di malattia respiratoria acuta (CIRD) associata ad infezione da canine pneumovirus (CnPnV). Il focolaio di CIRD è stato osservato in un canile della Puglia ed ha interessato 37 dei 350 cani ospitati presso tale struttura, con comparsa di tosse e/o scolo nasale, mentre la febbre era assente. L'analisi di sequenza dell'intero genoma virale ha dimostrato che l'agente causale (stipite Bari/100-12) è geneticamente correlato a ceppi CnPnV isolati negli Stati Uniti, ma anche al virus della polmonite del topo o pneumovirus murino (MPV). Il presente studio rappresenta un utile contributo per la conoscenza del potenziale patogenetico di CnPnV e del ruolo di questo virus nell'insorgenza della CIRD. Ulteriori studi potranno chiarire la patogenesi e l'epidemiologia del virus, rispondendo così all'eventuale necessità di allestire vaccini specifici.

INTRODUZIONE

La malattia infettiva respiratoria del cane (CIRD) è una patologia multifattoriale che colpisce cani di tutte le età ed è causata generalmente da infezioni di natura virale e batterica, spesso associate¹.

Conosciuta anche come tosse dei canili o tracheobronchite del cane, la CIRD è considerata una delle principali malattie infettive del cane soprattutto negli ambienti sovraffollati. I principali agenti patogeni associati a CIRD sono rappresentati da *Bordetella bronchiseptica*, micoplasmi, adenovirus del cane tipo 2, virus influenzali e parainfluenzali, herpesvirus canino, coronavirus respiratorio del cane e reovirus. Dal punto di vista clinico la malattia è caratterizzata da due forme: una più comune, ad andamento benigno ed una più grave caratterizzata da febbre elevata, presente solo nei casi in cui è associata una concomitante infezione batterica, accessi di tosse secca che spesso possono sfociare in conati di vomito, scolo oculo-nasale e tonsillite. In associazione alla tosse ed allo scolo oculo-nasale, gli animali presentano febbre, anoressia, letargia e possono mostrare segni evidenti di alterazioni polmonari con dispnea e tachipnea. La polmonite è un reperto di non frequente riscontro e la mortalità è generalmente molto bassa¹.

Recentemente, tra gli agenti emergenti di CIRD, è stato segnalato negli USA uno stipite pneumovirus del cane (CnPnV) correlato geneticamente con l'analogo virus del topo (MPV)^{2,3}. CnPnV appartiene alla famiglia *Paramyxoviridae*, sottofamiglia *Pneumovirinae*, genere *Pneumovirus*, che comprende anche il virus respiratorio sinciziale umano (HRSV) e bovino (BRVS) ed il virus della polmonite del topo (MPV). In microscopia elettronica gli pneumovirus si presentano come particelle virali ad elevato pleomorfismo, di diametro compreso tra i 50 ed i 300 nm e provviste di envelope, in genere sferiche, anche se possono assumere forme diverse con lunghe proiezioni filamentose. L'acido nucleico è costituito da un'unica molecola di RNA monocatenario a polarità negativa⁴.

CnPnV è strettamente correlato al virus della polmonite del topo o pneumovirus murino (MPV), mostrando il 95% di identità nucleotidica con il ceppo MPV J3666^{2,3}. Inoltre, le prove di infezione sperimentale di topi con CnPnV hanno dimostrato che il virus è in grado di replicare nel tessuto polmonare murino e indurre polmonite e cross-protezione nei confronti di una successiva esposizione a MPV⁵. Sebbene CnPnV sia stato isolato da più di 4 anni, non esistono ancora segnalazioni dell'infezione in Italia, né è disponibile la sequenza dell'intero genoma degli stipiti isolati.

Nel presente lavoro si riportano l'identificazione e la caratterizzazione genomica di uno stipite CnPnV associato ad un focolaio di malattia respiratoria osservato nei cani in Italia.

N. Decaro¹, P. Pinto¹, V. Mari¹, V. Larocca¹, M.L. Colaianni², M. Losurdo^{1,2}, L. Occhiogrosso³, V. Martella¹, C. Buonavoglia¹

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

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia

³ Veterinario libero professionista, Bari

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 13/12/2013 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 19/02/2014”.

MATERIALI E METODI

Caso clinico e raccolta dei campioni

La malattia respiratoria è stata osservata in un cane della Puglia nel 2012 ed ha interessato 37 dei 350 cani ospitati presso tale struttura. Gli animali erano sottoposti a regolari vaccinazioni nei confronti delle comuni malattie infettive del cane, ma nessuna profilassi specifica per CIRDC era attuata. I sintomi respiratori, in genere moderati, erano caratterizzati da tosse e/o scolo nasale, mentre la febbre era assente. Da due soggetti, un maschio di 7 mesi ed una femmina di 3 anni, sono stati prelevati tamponi nasali e faringei per le successive analisi di laboratorio.

Dopo la raccolta, i tamponi sono stati immersi, stemperandoli, in provette contenenti 900 µl di terreno di Dulbecco modificato da Eagle (DMEM), con aggiunta del 5% di siero fetale bovino (SFB), 1000 IU/ml di penicillina, 1000 µg/ml di streptomina e 10 µg/ml di anfotericina B. I campioni sono stati centrifugati a 13.000 × g per 5 minuti ed il surnatante è stato utilizzato per le successive prove di laboratorio.

Identificazione e quantificazione dell'RNA di CnPnV

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata, a partire da 140 µl di surnatante, mediante QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen S.p.A., Milano-Italia), seguendo il protocollo della casa produttrice.

Per la ricerca di CnPnV, è stato utilizzato un test RT-PCR precedentemente messo a punto per la diagnosi di infezione da CnPnV³ ed il kit SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates (Invitrogen srl, Milano). I primers SH1F/SH187R (Tab. I) amplificano un frammento di 208 pb del gene codificante per la piccola proteina idrofoba SH di CnPnV. Il protocollo termico utilizzato è stato il seguente: retrotrascrizione a 50°C per 30 min, inattivazione della Supercript II RT a 95°C per 15 min, seguiti da 35 cicli di PCR a 95°C per

60 sec, 54°C per 30 sec ed estensione finale a 72°C per 90 sec. I prodotti di PCR sono stati poi analizzati e visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%.

Per la quantificazione dell'RNA virale nei campioni clinici è stato sviluppato un test real-time RT-PCR basato sulla chimica TaqMan. La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando il kit Platinum Quantitative PCR ThermoScript One-Step System (Invitrogen srl) e la seguente mix di reazione in 50 µl composta da: 25 µl della master mix, 300 nM di primers di CnPnV-For e CnPnV-Rev, 200 nM di sonda CnPnV-Pb (Tab. I) e 10 µl di RNA. Duplicati delle diluizioni in base log₁₀ di RNA standard sono stati analizzati simultaneamente per ottenere una curva standard per la quantificazione assoluta. Il profilo termico utilizzato prevedeva la retrotrascrizione dell'RNA virale a 50°C per 20 min e l'attivazione della DNA polimerasi con Platinum Taq a 95°C per 2 min, seguiti da 45 cicli di denaturazione a 95°C per 15 sec, appaiamento a 48°C per 30 sec ed estensione a 60°C per 30 sec.

Prove di isolamento virale

I campioni clinici positivi per CnPnV contenenti discreti titoli virali (non meno di 10⁴ copie di RNA µl⁻¹ di CnPnV) sono stati inoculati su cellule semi-confluenti di fibroma mammario di cane (A72), secondo quanto descritto in precedenza⁴. Le cellule sono state mantenute in D-MEM con 5% di SFB e monitorate giornalmente al fine di osservare la comparsa di effetto citopatico. Dopo 6 giorni di incubazione, i monostrati sono stati testati per l'identificazione dell'antigene di CnPnV, utilizzando un anticorpo monoclonale per HRSV (Monosan®, Sanbio BV, Uden, Paesi Bassi), mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI). Le cellule sono state sub-coltivate ogni 6-8 giorni per 5 passaggi consecutivi.

Analisi di sequenza e filogenesi

I prodotti della RT-PCR ottenuti con la coppia di primer SH1F/SH187R sono stati sottoposti a se-

TABELLA I
Sequenze, posizioni e specificità per CnPnV, degli oligonucleotidi utilizzati nelle prove di RT-PCR convenzionale ed in real-time

Test	Dato bibliografico	Primer/probe	Sequenza (da 5' a 3')	Polarità	Gene target	Posizione ^a	Amplificato
Real-time RT-PCR	Questo studio	CnPnV-For	AAGATAAATTCTTCTATGAAACAGAATGA	+	M2	8065-8094	110 bp
		CnPnV-Rev	CCCATCGTAAGTGAGGTTTCTATT	-		8151-8174	
		CnPnV-Pb	6-FAM-CTGCCCTAAATACTATCCAGCCATACTGC-BHQ1	-		8100-8127	
RT-PCR convenzionale	3	SH1F	ATGGATCCTAACATGACCTCACAC	+	SH	4104-4127	208 bp
		SH187R	GATTGGGATGAACCGTGCATTG	-		4290-4311	

^a La posizione degli oligonucleotidi è riferita alla sequenza di CnPnV stipite dog/Ane4/USA/2008 (numero di accesso di GenBank HQ734815)

quenziamento diretto dalla BaseClear B.V. (Leiden, The Netherlands). Le sequenze sono state corrette manualmente e analizzate utilizzando il pacchetto software BioEdit⁶ e gli strumenti di analisi di NCBI's (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e EMBL's (<http://www.ebi.ac.uk>).

Per ottenere informazioni sulla variabilità genetica di CnPnV, il prototipo italiano dog/Bari/100-12/ITA/2012 è stato sottoposto a prove di amplificazione in RT-PCR utilizzando il kit SuperScript[®] II RT/Platinum[®] Taq Hi Fi (Invitrogen srl), in modo da coprire l'intero genoma virale. Ulteriori oligonucleotidi, disegnati sulle sequenze di MPV, sono stati utilizzati per sequenziare le regioni genomiche non determinate in precedenza. Le regioni leader 3' e trailer 5' sono state amplificate mediante un kit 5' RACE (Invitrogen Ltd, Milano). Le sequenze ottenute sono state assemblate e confrontate con quelle di stipti *Pneumovirus* di riferimento.

L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il software Mega 4.1 Beta⁷ mediante analisi di stato dei caratteri (metodo della parsimonia) ed analisi della distanza (metodo neighbour-joining), fornendo un supporto statistico mediante bootstrapping pari a 1000. Per gli studi di filogenesi sono stati utilizzati i seguenti ceppi *Pneumovirus* (tra parentesi sono indicati i numeri di accesso alla banca dati GenBank): CnPnV dog/Brne17/ USA/2008 (GU247050) e dog/Ane4/USA/2008 (HQ734815); MPV 15 (AY729016) e J3666 (NC006579); HRSV BI (NC_001781), BRSV ATue51908 (NC_001989). Lo stipte metapneumovirus umano (HMPV) CAN97-83 (NC_004148), correlato in maniera distante al genere *Pneumovirus*, è stato utilizzato come outgroup.

Ricerca di altri patogeni respiratori del cane

Gli agenti responsabili di CIRP sono stati ricercati mediante test molecolari effettuati sugli estratti RNA e DNA. Sono stati ricercati i seguenti patogeni respiratori: virus parainfluenzale del cane⁸, reovirus⁹, adenovirus del cane tipo I e tipo 2¹⁰, virus del cimurro¹¹, herpesvirus del cane tipo 1¹², coronavirus respiratorio del cane¹³, coronavirus pantropico del cane^{14,15}, canine minute virus¹⁶, virus influenzali¹⁷, hepacivirus del cane¹⁸. Sono stati ricercati anche batteri, quali *Bordetella bronchiseptica*¹⁹, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*²⁰, *Mycoplasma cynos* e *Mycoplasma canis*²¹.

RISULTATI

Identificazione di CnPnV nei campioni respiratori di cani con CIRP

Entrambi i cani analizzati sono risultati positivi al test RT-PCR per la ricerca di CnPnV. I due stipti

CnPnV identificati in soggetti dello stesso canile (100/12 e 101/12) hanno evidenziato un'identità nucleotidica del 100% a livello del gene target SH. I titoli virali, rilevati nei mix di tamponi nasali e faringei, sono risultati pari a $2,06 \times 10^5$ e $1,59 \times 10^4$ copie di RNA virale μl^{-1} di estratto.

Non sono stati messi in evidenza altri patogeni respiratori del cane e le prove di isolamento virale per CnPnV hanno fornito esito negativo, nonostante i ripetuti passaggi seriali.

Le successive analisi sono state effettuate sullo stipte 100/12 (dog/100-12/Italy/2012), che è stato assunto come prototipo dei ceppi CnPnV italiani.

Analisi genomica dello stipte CnPnV prototipo Bari/100-12

L'analisi di sequenza dell'intero genoma del virus prototipo dog/bari/100-12/ITA/2012 (Bari/100-12), ha mostrato una organizzazione genomica sovrapponibile a quella di MPV, con 10 geni che codificano per un totale di 12 proteine.

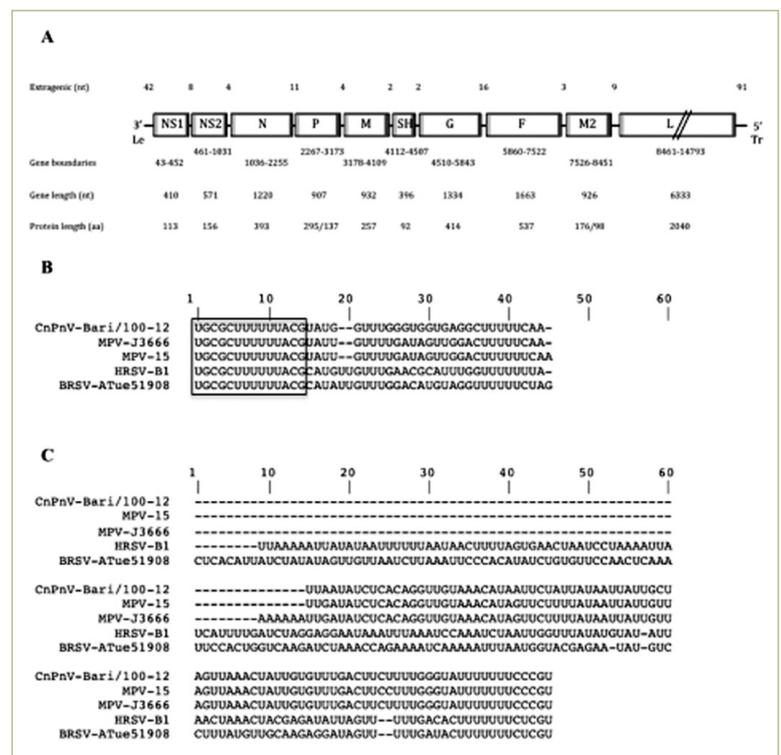


FIGURA 1 - **A**) Organizzazione genomica dello stipte CnPnV Bari/100-12. La mappa del genoma virale (non in scala) è stata disegnata dall'estremità 3' a quella 5', in modo che la direzione della trascrizione sia da sinistra a destra. I geni sono rappresentati da rettangoli, mentre le barre laterali indicano i segnali di inizio e fine della trascrizione genica. La linea orizzontale rappresenta le regioni extrageniche, in particolare la sequenza leader 3' (Le), la sequenza trailer 5' (Tr) e le sequenze intergeniche. Le dimensioni in nucleotidi (nt) delle regioni extrageniche sono riportate nella parte superiore; nella parte inferiore sono indicate le coordinate geniche, la lunghezza degli mRNA e le dimensioni in aminoacidi (aa) delle corrispondenti proteine. I geni P e M2 codificano ciascuno per due proteine distinte. **B, C**) Regioni leader (B) e trailer (C) di CnPnV Bari/100-12 allineate con le sequenze analoghe degli altri *Pneumovirus*; tutte le sequenze mostrate si riferiscono al genoma a polarità negativa, dall'estremità 3' all'estremità 5'.

Il genoma del virus Bari/100-12 è risultato essere lungo 14.884 nt ed è organizzato secondo il seguente ordine genico: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' (Fig. 1A). Come in altri membri del genere *Pneumovirus*, alle estremità del genoma sono presenti le regioni leader 3' e trailer 5' (Fig. 1B). La più elevata correlazione genetica, pari al 95,7-95,8% di identità nucleotidica, è stata osservata nei confronti di MPV, mentre nei confronti di HRSV e del virus respiratorio sinciziale bovino (BRSV) i valori di identità nucleotidica sono scesi sotto il 50% (Tab. 2).

Nella successiva analisi sono stati inclusi anche i ceppi di riferimento CnPnV Brne17 e Ane4, considerando una sequenza più corta, di 8.598-8.660 nt, che va dall'estremità 3' del gene L, all'estremità 5' della regione leader. In questa regione è stata evidenziata un'identità nucleotidica del 96,5-96,6% tra lo stipite Bari/100-12 e gli altri ceppi CnPnV.

Le correlazioni genetiche tra CnPnV Bari/100-12 e gli altri membri del genere *Pneumovirus* nelle diverse regioni genomiche sono riportate nella Tabella 2.

Analisi filogenetica

Al fine di includere nell'analisi le sequenze nucleotidiche disponibili per gli stipiti CnPnV noti, è stato costruito un albero filogenetico su un fram-

mento di 8.598 nucleotidi, che si estende dall'estremità 3' del gene L all'estremità 5' della regione leader. Nell'albero elaborato con il metodo della massima parsimonia, lo stipite italiano Bari/100-12 ricade nello stesso cluster dei virus appartenenti al genere *Pneumovirus*, risultando maggiormente correlato con il ceppo murino J3666, mentre lo stipite MPV-15 risulta essere filogeneticamente più lontano (Fig. 2A).

Lo stipite CnPnV italiano è risultato strettamente correlato ai ceppi canini isolati, anche considerando l'albero costruito sulla sequenza della proteina N (Fig. 2B), mentre quello ottenuto dalla sequenza della proteina F rivela un inaspettato sotto-raggruppamento con i ceppi murini (Fig. 2C). L'albero costruito con il metodo neighbor-joining ha rivelato un analogo pattern di segregazione.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni nuovi virus sono stati riconosciuti come agenti responsabili della malattia respiratoria acuta del cane (CIRD), tra cui virus influenzali, hepacivirus e bocavirus. Negli anni 2008-2009 CnPnV è stato diagnosticato in Nord America in due rifugi per animali che presentavano sintomi ri-

TABELLA 2
Identità nucleotidiche (%) (Tab. 2a) e aminoacidiche (Tab. 2b) dello stipite CnPnV Bari/100-12 con stipiti *Pneumovirus* di riferimento nelle diverse regioni genomiche

Tabella 2a

Stipite <i>Pneumovirus</i> (Numero di accesso GenBank)	Leader	NS1	NS2	N	P	M	SH	G	F	M2	L	Trailer	Intero genoma	Frammento di 8598-nt
CnPnV/Brne17 (GU247050)	NA	94,7	94,7	97,2	97,4	96,8	95,5	96,4	97,4	96,4	N.A.	NA	NA	96,5
CnPnV/Ane4 (HQ734815)	NA	94,7	94,7	97,1	97,4	96,9	95,5	96,6	97,4	96,4	N.A.	NA	NA	96,6
MPV/strain 15 (AY729016)	78,6	94,2	94,2	95,9	94,8	95,3	89,4	94,1	96,8	95,1	96,7	94,5	95,7	94,8
MPV/J3666 (NC_006579)	83,3	94,2	94,2	95,8	95,6	95,4	90	94,4	96,9	95,1	96,6	95,6	95,8	95
HRSV/BI (NC_001803)	68,2	39,6	39,9	61,4	45,8	49,5	44,7	36,8	49,1	44,6	54	52,7	48,7	51,1
BRSV/ATue51908 (NC_001989)	72,7	36,7	38,6	60	44,8	50,9	32,5	35,3	50,5	45	54	47,3	48,6	51,5

NA, sequenza non disponibile.

Tabella 2b

Stipite <i>Pneumovirus</i> (Numero di accesso GenBank)	NS1	NS2	N	P	M	SH	G	F	M2-1	M2-2	L
CnPnV/Brne17 (GU247050)	99,1	93,6	98,5	99,7	98,1	95,7	93,4	98,3	98,9	99	NA
CnPnV/Ane4 (HQ734815)	99,1	93,6	98,5	99,7	98,5	95,7	97,1	98,3	98,9	99	NA
MPV/strain 15 (AY729016)	92,9	95,5	97,7	95,3	98,1	92,4	92,2	98	97,7	96,9	98,5
MPV/J3666 (NC_006579)	92,9	95,5	97,5	96,9	98,1	97,8	91,9	98,3	97,7	96,9	98,5
HRSV/BI (NC_001803)	14,8	16,7	59	33,1	41	15,7	8,9	40,4	42,1	13,3	49,9
BRSV/ATue51908 (NC_001989)	11,9	18,1	59,5	36,2	41	16,1	13,2	41,6	42,1	14,3	49,1

NA, sequenza non disponibile.

conducibili alla CIRDA, ma solo recentemente questo virus è stato segnalato anche in Europa²². Inoltre, sebbene CnPnV sia stato scoperto più di quattro anni fa, solo 2/3 del genoma virale sono stati finora analizzati.

In questo studio, è stata riportata, per la prima volta, l'identificazione di CnPnV in Italia, con un'ulteriore prova della sua associazione alla malattia respiratoria acuta del cane. L'intero genoma del ceppo Bari/100-12, indicato come prototipo italiano, è stato determinato, confermando la sua stretta correlazione genetica con i ceppi americani isolati, nonché con MPV.

In base ai dati attualmente disponibili non è possibile determinare se MPV sia l'ancestrore di CnPnV oppure i due virus si siano evoluti parallelamente da un ancestrore comune. Si rendono necessari ulteriori studi che forniscano sequenze virali canine e murine supplementari, al fine di ricostruire la storia evolutiva di questo gruppo di virus.

Nonostante la presenza di titoli virali discreti nei campioni clinici, calcolati attraverso il test real-time RT-PCR, i tentativi di isolamento del virus in vitro non hanno avuto successo. Questo potrebbe essere spiegato con l'inattivazione del virus durante il trasporto o la conservazione dei campioni, o in alternativa, con una scarsa sensibilità del clone di cellule di fibroma mammario canino, impiegate per l'isolamento del virus. Infatti, anche se è stato riportato che le cellule A-72 sono altamente permissive per la replicazione di CnPnV², l'adattamento del virus alla crescita in vitro può variare in base ai diversi cloni della stessa linea cellulare ed a causa di diversi livelli di espressione dei recettori cellulari.

Attualmente il potenziale patogeno di CnPnV non è completamente noto; tuttavia, le recenti segnalazioni di infezioni naturali nei cani^{2,22} e le prove di infezione sperimentale nel topo^{5,23} hanno suggerito un suo potenziale ruolo nella comparsa di CIRDA. Questo ruolo è confermato anche dai risultati prodotti dal presente studio, in cui il ceppo CnPnV Bari/100-12 è risultato associato a malattia respiratoria acuta in un rifugio per cani.

Nonostante le indagini di laboratorio abbiano fornito esito negativo, non è possibile escludere la presenza di ulteriori patogeni associati alla CIRDA.

Canili e rifugi, infatti, risultano essere maggiormente esposti a molteplici patogeni, in quanto le precarie condizioni igieniche, lo scarso controllo da parte delle autorità sanitarie e il sovraffollamento possono facilitare una maggiore virulenza degli agenti responsabili di CIRDA, nonché una diffusa circolazione degli agenti causali tra gli animali (Buonavoglia e Martella, 2007). Ulteriori studi potranno chiarire la patogenicità e l'epidemiologia di questo *Pneumovirus* emergente nel cane, affrontando l'eventuale necessità dello sviluppo di vaccini specifici.

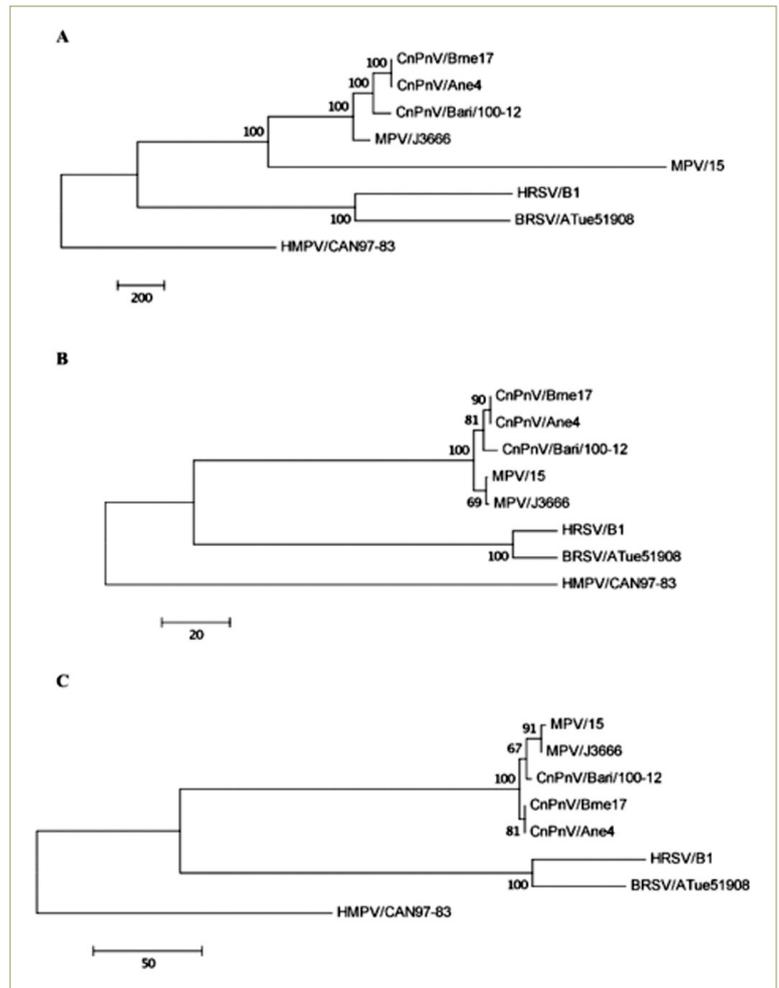


FIGURA 2 - Albero filogenetico ottenuto col metodo neighbor-joining su un frammento di 1005 nucleotidi del gene VP2 dei ceppi di CnMV. Per la costruzione dell'albero filogenetico sono state utilizzate le sequenze di CnMV elencate nella Tabella 1. Lo stipite di bocavirus del cane (CBoV) Con-161 è stato 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.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la studentessa Valeria Lepore del corso di Laurea in Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Bari per la collaborazione prestata nelle attività di laboratorio.

Parole chiave

Cane; Canine pneumovirus; malattia respiratoria.

Canine infectious respiratory disease associated to Canine pneumovirus infection

Summary

An outbreak of canine infectious respiratory disease (CIRD) associated to canine pneumovirus

(CnPnV) infection is reported. The outbreak occurred in a shelter of the Apulia region and involved 37 out of 350 dogs that displayed cough and/or nasal discharge with no evidence of fever. The full-genomic characterisation showed that the causative agent (strain Bari/100-12) was closely related to CnPnVs that have been recently isolated in the USA, as well as to murine pneumovirus (MVP), which is responsible for respiratory disease in mice. The present study represents a use-

ful contribution to the knowledge of the pathogenic potential of CnPnV and its association to CIRDC in dogs. Further studies will elucidate the pathogenicity and epidemiology of this novel pneumovirus, thus addressing the eventual need for specific vaccines.

Key words

Dog; Canine pneumovirus; canine infectious respiratory disease.

BIBLIOGRAFIA

- Buonavoglia C, Martella V: Canine respiratory viruses. *Vet Res* 38: 355-373, 2007.
- Renshaw RW, Zyllich NC, Laverack MA, et al: Pneumovirus in dogs with acute respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 16:993-995, 2010.
- Renshaw R, Laverack M, Zyllich N, et al: Genomic analysis of a pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease. *Vet Microbiol* 150:88-95, 2011.
- Lamb RA, Collins PL, Kolakifsky D, et al: Family Paramyxoviridae. 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 549-561.
- Percopo CM, Dubovi EJ, Renshaw RW, et al: Canine pneumovirus replicates in mouse lung tissue and elicits inflammatory pathology. *Virology* 416:26-31, 2011.
- 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.
- Erls K, Dubovi EJ, Brooks HW, et al: Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol* 42:4524-4529, 2004.
- Leary TP, 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: 1368-1375, 2002.
- 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: 77-84, 2001.
- Elia G, Decaro N, Martella V, et al: Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 136: 171-176, 2006.
- Decaro N, Amorisco F, Desario C, et al: Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canine herpesvirus 1. *J Virol Methods* 169:176-180, 2010.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, et al: Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods* 151: 167-171, 2008.
- 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: 145-150, 2004.
- 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: 72-78, 2005.
- Decaro N, Altamura M, Pratelli A, et al: Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type I infection. *New Microbiol* 25:291-298, 2002.
- Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, et al: A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis* 6:87, 2006.
- Bukh J: Hepatitis C homolog in dogs with respiratory illness. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12563-12564, 2011.
- Zhao Z, Wang C, Xue Y, et al: The occurrence of Bordetella bronchiseptica in pigs with clinical respiratory disease. *Vet J* 188:337-340, 2011.
- Priestnall SL, Erls K, Brooks HW, et al: Characterization of pneumonia due to Streptococcus equi subsp. zooepidemicus in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1790-1796, 2010.
- Chalker VJ, Owen WM, Paterson C, et al: Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology* 150: 3491-3497, 2004.
- Mitchell JA, Cardwell JM, Renshaw RW, et al: Detection of canine pneumovirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol* 51: 4112-4119, 2013.
- Glineur SF, Renshaw RW, Percopo CM, et al: Novel pneumoviruses (PnVs): Evolution and inflammatory pathology. *Virology* 443: 257-264, 2013.