



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Medicina animale, produzioni e salute (MAPS)*

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
CICLO XXXI

Epidemiologia molecolare di canine parvovirus (CPV) in Italia
Molecular epidemiology of canine parvovirus (CPV) in Italy

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Valentina Zappulli

Supervisore: Ch.mo Prof. Michele Drigo

Dottoranda: Dott.ssa Claudia Maria Tucciarone

Indice

Riassunto	4
Abstract	5
1. Introduzione	6
1.1 Eziologia.....	7
1.1.1 Tassonomia.....	7
1.1.2 Struttura e caratteristiche del virus.....	8
1.1.3 Ingresso nella cellula, replicazione e assemblaggio	10
1.2 Epidemiologia	12
1.2.1 Evoluzione e host jump	12
1.2.2 Spettro d'ospite e trasmissione	16
1.2.3 CPV nel gatto	17
1.2.4 Feline panleukopenia virus/feline parvovirus	19
1.2.5 Ricombinazione-coinfezione	21
1.2.6 Distribuzione	21
1.2.7 Fattori di rischio.....	23
1.3 Aspetti patogenetici e clinici.....	25
1.3.1 Patogenesi	25
1.3.2 Immunità	27
1.3.3 Segni clinici	28
1.3.4 Alterazioni emato-biochimiche	28
1.3.5 Fattori prognostici	29
1.3.6 Lesioni anatomo-istopatologiche	31
1.4 Gestione della parvovirosi	33
1.4.1 Diagnosi e cross-reazione	33
1.4.2 Prevenzione	34
1.4.3 Vaccinazione	35

1.4.4 Terapia	37
1.5 Metodi bioinformatici.....	39
1.5.1 Filogenesi.....	39
1.5.2 Filodinamica	42
2. Parte sperimentale	47
2.1 Scopo della tesi.....	47
2.2 Molecular insight into Italian canine parvovirus heterogeneity and comparison with the worldwide scenario.....	48
2.3 Dinamica di popolazione	57
2.3.1 Materiali e metodi	57
2.3.2 Risultati.....	58
2.3.3 Discussione.....	61
3. Conclusioni	65
4. Bibliografia.....	67

Riassunto

Il canino parvovirus (CPV) è uno dei patogeni più importanti per lo stato sanitario del cane. La sua storia è caratterizzata da una rapida comparsa e diffusione, che ne hanno condizionato lo studio, catalizzando l'attenzione verso le differenze fenotipiche tra i ceppi in circolazione, ritenute finora elementi correlabili alle manifestazioni cliniche e all'epidemiologia. Negli ultimi anni però, la classificazione su base antigenica che ha permesso la distinzione delle diverse varianti, è stata rimessa in discussione, in quanto la variabilità misurata mediante semplici marker amminoacidici appare riduttiva rispetto alla sottostante eterogeneità nucleotidica del virus. Solo sulla base del genoma di CPV è infatti possibile ricostruire i legami filogenetici ed evolutivi tra i ceppi circolanti, massimizzando l'informazione a disposizione ed evitando di ricondurre l'affinità dei ceppi virali alla presenza di caratteri morfologici simili, promossi frequentemente da un'evoluzione convergente piuttosto che da un'origine comune. In questa cornice si inserisce il presente lavoro che mira a descrivere l'epidemiologia molecolare italiana di CPV, attraverso l'analisi delle sequenze del gene codificante la proteina VP2, ottenute da campioni provenienti da svariate regioni e raccolti tra il 2008 e il 2015. L'orizzonte dello studio è stato poi esteso al confronto di tali dati con un database di sequenze mondiali. I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare come le elevate eterogeneità e circolazione virali a livello locale rispecchino la situazione globale, mettendo in luce uno scenario epidemiologico caratterizzato dall'occorrenza di molteplici eventi introduttivi, cui sovente segue una prolungata persistenza territoriale. Ciò esita sia in una frequente co-circolazione di alcuni ceppi nella medesima regione, sia nella presenza di stipti strettamente correlati in località molto distanti. Oltre a restituire la misura della capacità di diffusione del virus, delle connessioni tra i paesi e delle conseguenti vie di disseminazione virale, esplorabili anche con un approccio filogeografico, la variabilità nucleotidica di CPV permette di ricostruire le dinamiche di popolazione, monitorandone l'espansione nel tempo e interpretandone le fluttuazioni in relazione a possibili eventi impattanti sulla variabilità genetica, come l'introduzione di nuovi virus o della vaccinazione, l'insorgenza dell'immunità di popolazione, ecc. CPV si conferma un virus recente, originato all'inizio degli anni '70 e caratterizzato da un elevato tasso evolutivo ($\sim 10^{-4}$ sostituzioni* sito⁻¹*anno⁻¹), in grado perciò di sostenere l'espansione della popolazione virale osservabile sin dalla sua comparsa e, potenzialmente, di comportare variazioni imprevedibili a carico degli aspetti clinici della patologia. L'insieme di questi elementi sottolinea da un lato l'importanza e le potenzialità delle informazioni racchiuse nella sequenza nucleotidica, che non devono essere sottovalutate, dall'altra la necessità di un'analisi più approfondita sulla natura di CPV, investigando i determinanti genetici, ancora inesplorati, alla base delle caratteristiche biologiche, epidemiologiche e cliniche di CPV.

Abstract

Canine parvovirus (CPV) is a major pathogen for dogs. Its history is featured by a quick emergence and diffusion that guided the research on the disease, with particular attention towards the phenotypic differences among the circulating strains, as traits related to clinical manifestations and epidemiology. However, the antigenic classification that recognized several variants has been recently questioned, because of the low variability represented by the selected amino acidic markers instead of the whole nucleotide heterogeneity. The real evolutionary and phylogenetic relationships among CPV circulating strains are in fact evaluable only on genome bases, embracing the widest information available and avoiding the misinterpretation of the strain affinity due to similar morphological features, which could actually be due to convergent evolution rather than necessarily to a common ancestor. The present study aims to describe Italian molecular epidemiology of CPV, by analysing VP2 sequences from samples collected from several regions between 2008 and 2015. Additionally, the Italian scenario has been compared to a database of worldwide sequences. The results highlighted a huge variability and circulation at the Italian level, which is also mirrored by the global situation, where many introduction events take place with the consequent strain persistence. These circumstances set the premises both for the co-circulation of different strains in the same region and the presence of strictly related strains in distant places. Other than measuring the spread of the virus, the international connections and dissemination patterns using a phylogeographic approach, CPV nucleotide variability allows the reconstruction of the population dynamics, depicting the viral expansion in relation to time and possible impacting events on genetic variability, such as vaccination or new strain introduction, population immunity onset, etc. CPV appears to be a recent virus, with its origin placed in the early '70s, characterized by a high substitution rate ($\sim 10^{-4}$ substitutions*site⁻¹*year⁻¹), which can be the cause of the ongoing viral population expansion and possibly of unexpected variations in the clinical aspects of the disease. These elements enforce the importance and usefulness of the genetic information, whose collection should be improved in order to achieve a deeper knowledge of CPV and the genetic determinants of its peculiar biological, epidemiological and clinical features.

1. Introduzione

Per chi si occupa di malattie infettive veterinarie, nell'ambito della ricerca e della diagnostica, spaziando tra animali da reddito e d'affezione, può essere difficile capire a pieno l'impatto di una patologia come la parvovirus del cane. Non essendo una zoonosi, è priva di ricadute dirette sulla salute umana e, colpendo il cane prevalentemente nel primo anno di vita, può sembrare un problema circoscritto. In realtà, per la sua natura acuta, a decorso rapido e infausto se non adeguatamente trattata, la parvovirus grava pesantemente sulla quotidiana attività clinica ed emergenzistica del veterinario dei "piccoli animali" e, in modo ancora più drammatico, sul proprietario del cucciolo malato.

Una bellissima e particolare review "storiografica" del Professor Carmichael (Carmichael, 2005), una delle persone che più si è concentrata sullo studio del parvovirus del cane, racconta la storia di questo virus e le prime reazioni alla sua comparsa, con grande attenzione alla circolazione del virus, definendone i primi anni addirittura un "pandemonio". Il canino parvovirus (CPV) è comparso nel 1978 negli USA (Appel et al., 1979a), ma quasi contemporaneamente in tutto il mondo venivano segnalati casi di questa nuova epidemia (Johnson and Spradbrow, 1979; Carmichael, 2005). Lo studio della struttura e delle proprietà del virus ne ha subito sottolineato gli aspetti comuni ad altri parvovirus dei carnivori, come le caratteristiche biologiche, patogenetiche e antigeniche.

Questi presupposti e problematiche hanno alimentato e continuano a mantenere elevato, l'interesse scientifico nei confronti di CPV, sotto l'aspetto clinico, della virulenza e della profilassi, ma soprattutto della sua variabilità antigenica che risulta particolarmente rilevante dal punto di vista epidemiologico ed evolutivo, riflettendosi inevitabilmente sugli altri aspetti. Il focus di questa tesi verte sugli aspetti molecolari del virus, mettendo direttamente in relazione la natura, il genoma e la classificazione antigenica fenotipica che ne deriva, con la distribuzione italiana e mondiale e le caratteristiche della popolazione virale. Per esplorare e comprendere nel dettaglio questi aspetti, è necessaria una presentazione articolata di CPV.

1.1 Eziologia

1.1.1 Tassonomia

La classificazione di CPV è stata più volte rielaborata. Al momento della sua scoperta, è stato inizialmente messo in relazione con il *Canine minute virus* (CnMV), un virus identificato nel 1970 (Binn et al., 1970) e inserito nel genere *Parvovirus* sulla base di proprietà valutate tramite microscopia elettronica e studi di caratterizzazione virale. Questo virus, originariamente chiamato anche *Minute virus of canine* (MVC), causa patologie neonatali (Carmichael et al., 1991), ipofertilità e in alcuni casi anche forme enteriche (Harrison et al., 1992) ed era stato considerato il primo parvovirus del cane, ottenendo ufficiosamente il nome di *Canine parvovirus 1* (CPV-1) (Carmichael and Binn, 1981; Macartney et al., 1988).

La successiva comparsa di CPV, ne ha condizionato il battesimo a “type 2” (CPV-2), nomenclatura poi entrata nel linguaggio comune e rimasta come riferimento, nonostante i cambiamenti in quella ufficiale. Il confronto con CnMV, dal punto di vista genetico (Macartney et al., 1988) e antigenico (Carmichael et al., 1980), ha infatti sottolineato le differenze tra CPV e CnMV, che hanno spinto a riconsiderare la classificazione di quest’ultimo, proponendo una maggiore affinità tra CnMV e *Bovine parvovirus* (BPV) (Schwartz et al., 2002). La più recente classificazione di CnMV lo inserisce nella specie *Carnivore bocaparvovirus 1* (CaBoV-1) (Adams et al., 2014), genere *Bocaparvovirus*, assieme al vecchio BPV, rinominato *Ungulate bocaparvovirus 1* (UBV-1).

Come anticipato, anche la classificazione di CPV ha subito numerose modifiche: il suo primo riconoscimento come specie avviene nel 1995, all’interno della famiglia *Parvoviridae*, sottofamiglia *Parvovirinae* e genere *Parvovirus*, assieme alle specie *Feline panleukopenia virus* (FPV), *Mink enteritis virus* (MEV) e *Raccoon parvovirus* (RPV) (Murphy et al., 1995). Nel 2004, il riesame di CPV e delle altre specie, li ha raggruppati come ceppi o varianti all’interno della specie *Feline panleukopenia virus* (Tattersall et al., 2005), sulla base della similitudine a livello genetico tra i virus, in modo che entro la stessa specie le sequenze differissero meno del 5% nel gene codificante la principale proteina non strutturale e, tra specie dello stesso genere, la differenza fosse compresa tra il 10 e il 50%. Inoltre, a specie distinte erano richieste bassa cross-reattività e una discreta separazione dello spettro d’ospite, caratteristiche non soddisfatte da questi virus, riuniti quindi nella specie *Feline panleukopenia virus* (Tattersall et al., 2005). Successivamente, dopo una riorganizzazione generale della tassonomia della famiglia *Parvoviridae* nel 2013, il genere *Parvovirus* e la specie *Feline panleukopenia virus* sono stati rinominati rispettivamente *Protoparvovirus* e *Carnivore protoparvovirus 1*, dopo aver deciso che virus appartenenti allo stesso genere dovessero risultare monofiletici in una ricostruzione basata sulla proteina non strutturale NS1 e differire meno del 30% nella sequenza aminoacidica, mentre a virus

appartenenti a generi diversi è ora richiesta una differenza maggiore del 30% (Cotmore et al., 2014). La nuova nomenclatura ha permesso di adottare uno stile non latino, che comprende nel nome lo spettro d'ospite e il genere, tenendo in considerazione altre caratteristiche distintive del virus (Cotmore et al., 2014). Oltre a vincolare la classificazione, la variabilità molto contenuta a livello genetico tra i parvovirus dei carnivori (Parrish, 1995a), ma soprattutto entro CPV, non permette di suddividere ulteriormente questo virus in genotipi; infatti, la distinzione comunemente in uso non è basata su relazioni filogenetiche tra i ceppi, bensì ne descrive la variabilità antigenica.

1.1.2 Struttura e caratteristiche del virus

CPV è un virus a singolo filamento di DNA con polarità negativa (Reed et al., 1988), privo di envelope (Cotmore and Tattersall, 1987), con il capsido del diametro di circa 23.3-26.6 nm, a simmetria icosaedrica (Paradiso et al., 1982). Il virus presenta una densità di flottazione in cloruro di cesio (CsCl) di 1.44 g/ml (Paradiso et al., 1982), un coefficiente di sedimentazione di 110-120 S e una massa molecolare di 5.5–6.2x10³ kDa (Cotmore and Tattersall, 2007), similmente ad altri parvovirus. CPV può resistere per mesi nell'ambiente (Crawford and Sellon, 2010), fino a 60 minuti a 56°C e a valori di pH tra 3 e 9, mentre può essere inattivato da formalina, propiolattone, idrossilammina, agenti ossidanti e ipoclorito di sodio (Berns and Parrish, 2013), ma non dai disinfettanti a base di sali di ammonio quaternario (Crawford and Sellon, 2010).

Il genoma di CPV è lungo circa 5 kb (Reed et al., 1988) e comprende due *open reading frame* (ORF) principali, che codificano proteine strutturali e non. Il genoma ha conformazione lineare e alle estremità possiede due strutture a forma di forcina, costituite da tratti palindromici ripiegati che contengono regioni non codificanti ma necessarie per l'inizio della replicazione (Reed et al., 1988). La struttura a forcina dell'estremità 3' o *left-hand* del filamento negativo si ripiega con una forma a Y per una lunghezza di 115-121 nucleotidi (Tattersall, 2006) (118 nucleotidi secondo Reed et al., 1988), mentre all'estremità 5', *right-hand*, può avere forma lineare o a croce per circa 200-248 nucleotidi (Tattersall, 2006) (255 nucleotidi secondo Reed et al., 1988).

Le due ORF sono separate da un piccolo introne, quella all'estremità 3' (ORF1) codifica le proteine non strutturali, NS1 e NS2, mentre l'ORF all'estremità 5' (ORF2) codifica le proteine strutturali, VP1, VP2 e VP3 (Reed et al., 1988). Le proteine non strutturali vengono trascritte a partire da un promotore (P4), con la caratteristica sequenza TATA, in posizione 4 della mappa genica (Reed et al., 1988). P4 innesca la trascrizione dell'mRNA codificante la proteina NS1 (668 aa) che è tradotta senza *splicing* da un tratto di 2004 bp. La proteina NS2 (165 aa, 495 bp) è tradotta invece con *splicing* alternativo a partire dal trascritto della proteina NS1, unendo le prime 261 basi della regione N-terminale nello stesso *frame* di lettura di NS1 e le ultime 234 basi della regione C-terminale (Shackelton et al., 2005), in un *frame* diverso. La proteina NS1 è deputata alle attività di *nicking* ed

elicasi del DNA virale ripiegato in corrispondenza dell'origine di replicazione nella struttura a forcina, fornendo un'estremità 3' per l'inizio della replicazione del genoma e separando il filamento di cDNA una volta copiato (Cotmore and Tattersall, 2007). La NS1 infatti, dopo aver creato il *nick*, resta ancorata all'estremità 5' che si crea e recluta altre proteine NS1 per formare il complesso proteico dell'elicasi; inoltre questa proteina ha l'effetto di attivare i promotori di sintesi, P4 e P38, con un effetto di feedback positivo sulle attività di replicazione del virus e dell'infezione della cellula (Rhode, 1985a; Cotmore and Tattersall, 2007). Al termine della replicazione e dell'assemblaggio del virione, la NS1 resta legata all'estremità 5' del nuovo filamento di DNA e sporge dalla struttura capsidica assieme a uno *stretch* di circa 24 nucleotidi (virione in forma s1), fino al clivaggio ad opera di proteasi o nucleasi della cellula infetta, contribuendo potenzialmente alla maturazione del virione (forma s2) prima del rilascio (Cotmore and Tattersall, 1989). Mentre la proteina NS1 è fondamentale per la replicazione virale, la NS2 non è indispensabile e la produzione di virus mutanti nella sua sequenza non ne altera la vitalità e l'efficienza replicativa (Wang et al., 1998).

Il tratto del genoma codificante le proteine strutturali è compreso tra le posizioni 33 e 95 della mappa genica (Rhode, 1985b). La trascrizione della VP1 (748 residui aminoacidici (Langeveld et al., 1994), 83 kDa (Paradiso et al., 1982)) viene iniziata dal promotore P38, localizzato a monte dell'introne che precede il gene ORF2 (Reed et al., 1988) e la sintesi prevede lo *splicing* della regione intronica (Cotmore and Tattersall, 2007). La regione codificante la proteina VP2, quindi anche la VP3, inizia circa 400 nucleotidi a valle dell'introne (Cotmore and Tattersall, 2007). La VP2 consiste in un polipeptide di 584 aminoacidi (64 kDa) (Langeveld et al., 1994), privo di una parte della porzione N-terminale del gene VP1 e la VP3 è un polipeptide di circa 15-20 residui aminoacidici in meno (~60 kDa) (Tsao et al., 1991), prodotto da proteasi dell'ospite per clivaggio post-traslazionale della regione N-terminale della proteina VP2 (Cotmore and Tattersall, 2007). Le proteine strutturali contribuiscono in proporzioni differenti (VP1:VP2 1:5) (Cotmore and Tattersall, 2007), alla formazione delle 60 subunità che costituiscono il capsido, conferendogli simmetria icosaedrica ($T=1$) (Tsao et al., 1991). La proteina VP1 non è ritenuta essenziale per il *packaging* del DNA, per l'assemblaggio capsidico o per il rilascio del virione, è invece fondamentale per l'infettività virale e il *trafficking* intracellulare, possedendo dei *basic nuclear localization signals* (NLS) (Harbison et al., 2008) e un dominio fosfolipidico (PLA2) in grado di forare la membrana delle vescicole endosomiali (Cotmore and Tattersall, 2007). La VP2 è la componente principale del capsido, possiede una struttura secondaria circonvolta con *loop* esposti sulla superficie e internamente otto foglietti β ripiegati a β -barrel (Agbandje-McKenna et al., 1995). La proteina VP3, presente nel virione, è invece assente nelle *virus-like particles* (VLP) (Yuan and Parrish, 2001), ossia i capsidi virali assemblati molto rapidamente senza contenuto genetico, suggerendo una differenza nella conformazione tale da non far protrudere la

porzione N-terminale della VP2 attraverso il poro a livello di *5-fold axis* (Wu and Rossmann, 1993), prevenendone quindi il clivaggio a VP3 (Tsao et al., 1991).

Una volta assemblato, il capsido presenta due proiezioni dette *spike* al centro di ogni faccia dell'icosaedro (*threefold axes*), un poro cilindrico costituito dai β -*barrel* delle cinque subunità che si incontrano in corrispondenza dei vertici (*fivefold axes*), una regione a *canyon* che circonda i vertici ed è separata tramite un rilievo esterno da un avvallamento (*dimple*) lungo gli spigoli (*twofold axes*) tra le *spike* (Tsao et al., 1991). Ogni poro mette in comunicazione l'interno del virione con l'ambiente esterno e permette la protrusione della catena polipeptidica N-terminale di una delle proteine VP2 che lo formano, per circa 25 residui aminoacidici, esponendo il tratto che, se rimosso, trasforma la proteina in una VP3 (Cotmore and Tattersall, 2007).

1.1.3 Ingresso nella cellula, replicazione e assemblaggio

Nella fase iniziale di infezione della cellula, i processi di *uptake* virale avvengono rapidamente tramite endocitosi clatrina-mediata (Parker and Parrish, 2000), a seguito dell'adesione del virus a recettori specifici della membrana. CPV lega primariamente il *Transferrin receptor* (TfR) (Harbison et al., 2008), una glicoproteina presente su numerosi tipi cellulari ma espressa a livelli più elevati da cellule in attiva proliferazione (Parrish and Kawaoka, 2005). In misura minore, CPV lega anche l'acido sialico (Barbis et al., 1992; Löfling et al., 2013), abilità che gli conferisce capacità emoagglutinanti, ma non è implicata nelle fasi di infezione (López-Bueno et al., 2006). I virioni internalizzati possono talvolta liberarsi rapidamente dalle membrane endosomiali, ma più frequentemente rimangono a lungo all'interno delle vescicole associate al TfR, oppure attraversano le fasi di maturazione e processazione endosomiali (*trafficking*) di endosoma precoce, tardivo, vescicola idrolasica, endosoma di riciclaggio e endolisosoma, senza poi distruggere la membrana nella fase di passaggio e di rilascio citoplasmatico (Parker and Parrish, 2000), ma formando un poro attraverso cui far uscire l'acido nucleico. Queste fasi e l'esposizione al pH acido degli organelli, sembrano fondamentali per la capacità infettante di CPV, promossa da alterazioni conformazionali come l'esposizione del dominio PLA2 che facilita il rilascio intracellulare (Harbison et al., 2008), anche se la sensibilità a bassi livelli di pH risulta inaspettata per un virus a tropismo gastroenterico (Cotmore and Tattersall, 2007). CPV raggiunge il nucleo all'interno delle vescicole sfruttando i microtubuli cellulari (Vihinen-Ranta et al., 1998; Harbison et al., 2008) e può penetrare attraverso il complesso del poro nucleare (*nuclear pore complex*, NPC) legando la membrana del nucleo con i NLS virali della VP1 (Vihinen-Ranta et al., 1997).

Il virione penetra interamente nel nucleo, con l'intero capsido associato all'acido nucleico e resta quiescente fino all'ingresso spontaneo della cellula in fase S (Cotmore and Tattersall, 2006a). La replicazione di CPV dipende infatti dall'apparato replicativo della cellula ospite, con conseguente tropismo per tessuti a elevato indice mitotico.

La replicazione di CPV (*rolling hairpin replication*) avviene a partire dalle strutture telomeriche all'estremità del filamento, che contengono le regioni promotrici della sintesi del filamento complementare: la DNA polimerasi dell'ospite sintetizza dall'estremità 3' della struttura a forcina il filamento complementare, fino a raggiungere la struttura telomerica opposta, creando una molecola di DNA a doppio filamento come intermedio replicativo (*replicative-form*, RF) (Cotmore and Tattersall, 2006a). La replicazione può ora iniziare a partire dal doppio filamento, con il *nicking* ad opera della proteina NS1 che scinde il filamento complementare, ne espone l'estremità 3' rimanendo invece attaccata all'estremità 5' che precede la regione telomerica. La sintesi del filamento complementare procede, svolgendo e copiando anche la regione telomerica 5' a cui è ancorata la NS1. La replicazione riprende spiazzando il filamento originale e linearizzandolo, ruotando come un cardine attorno alla nuova estremità e copiandone tutta la lunghezza (Cotmore and Tattersall, 2006a). A ogni nuovo filamento sono legate le sequenze che formeranno le estremità a forcina attraverso due meccanismi, *terminal* e *junction resolution* (Cotmore and Tattersall, 2006a).

Nonostante le ridotte dimensioni del genoma di CPV, il processo di *packaging* dell'acido nucleico all'interno del capsido dei nuovi virioni, le cui dimensioni sono altrettanto contenute, risulta agevole solo per il primo tratto del genoma, con una rapida internalizzazione a partire dall'estremità 3'. Per il restante tratto vengono sfruttate polarità e sequenze nucleotidiche particolari che favoriscono le interazioni tra l'acido nucleico e la superficie interna del capsido, in modo da ottenere il ripiegamento del filamento stesso del DNA e la formazione di legami idrogeno con le sub-unità proteiche, in modo da stabilizzarlo (Cotmore and Tattersall, 2006b). Undici nucleotidi interagiscono con una tasca idrofobica sul versante interno di ogni subunità proteica, attraverso legami deboli DNA-proteina, per un totale di 660 basi (13% del genoma) coinvolte nell'interazione con le 60 subunità capsidiche (Tsao et al., 1991), mentre la catena deossiribosio-fosfato del DNA è rivolta verso l'interno e ogni *loop* è stabilizzato da legami con due ioni metallici (Tsao et al., 1991). L'estremità 5', assieme alla proteina NS1 a essa ancorata, rimane esterna al capsido virale (Cotmore and Tattersall, 1989).

Sebbene il genoma di CPV sia duplicato dalle DNA polimerasi dell'ospite, che generalmente garantiscono un'elevata fedeltà di replicazione, presenta un'estrema variabilità, comparabile a quella di virus a RNA (Shackelton et al., 2005). Ciò può dipendere da svariati motivi: la presenza di un singolo filamento e la monodirezionalità di replicazione, che potrebbero abbassare le performance della polimerasi cellulare e la produzione di svariate copie virali, che potrebbe predisporre a ricombinazioni inter- o intra-molecolari supportate dall'elevata ripetitività che caratterizza i parvovirus, fanno sì che non vi siano altri meccanismi di controllo sulla sequenza genomica, oltre alla fitness effettiva del virus durante l'infezione (Cotmore and Tattersall, 2006b).

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Evoluzione e host jump

Per affrontare gli aspetti epidemiologici di CPV è necessario ripercorrere le fasi che hanno portato all'emergenza, alla diffusione e alla definizione dello spettro d'ospite del virus. CPV si impone sullo scenario epidemiologico alla fine degli anni '70 mentre FPV, virus filogeneticamente e antigenicamente vicino a CPV, era già noto da inizio secolo (Parrish and Kawaoka, 2005). La relazione tra questi due virus appare evidente, sia dal punto di vista delle manifestazioni cliniche, molto simili tra cane e gatto, sia da quello antigenico e genetico (Parrish, 1999), visto che i due virus mostrano un'identità superiore al 98% (Truyen et al., 1995). Data l'importanza nella storia evolutiva di CPV di alcuni residui aminoacidici, individuati come responsabili del salto di specie, della variabilità antigenica e della conseguente classificazione su di essa basata, la nomenclatura CPV-2 (2a, 2b, 2c) verrà mantenuta nella presente sezione.

Il virus originale, CPV-2, compare negli USA nel 1978 in associazione a casi di patologia enterica (Appel et al., 1979a), miocardite e morte improvvisa nei cuccioli. Tuttavia, alcuni studi sierologici retrospettivi ne suggeriscono un'origine europea (Osterhaus et al., 1980), essendo stata riscontrata positività anticorpale in campioni del 1974, in Grecia (Koptopoulos et al., 1986) e del 1976-77, in Belgio e Olanda (Hoelzer and Parrish, 2010). La sua identificazione permette di accostarlo rapidamente ai parvovirus e i primi studi esplorano gli ambiti in cui CPV-2, FPV e gli altri parvovirus noti si differenziano. Dal punto di vista antigenico, l'utilizzo di sieri policlonali ha mostrato elevata cross-reazione tra CPV-2, FPV e MEV (Parrish, 1990), tuttavia CPV-2 può essere distinto dagli altri virus mediante anticorpi monoclonali (mAb) (Parrish et al., 1982). CPV-2 risulta in grado di replicare *in vivo* nel cane, ma non nel gatto e, dal confronto con FPV, emergono differenze nel range di pH necessario per l'emoagglutinazione (tra 6 e 8 per CPV, inferiore a 6.8 per FPV) (Carmichael et al., 1980) e dal punto di vista filogenetico, sotto il quale CPV appare formare una *clade* separata da FPV (Parrish, 1999).

Data la grande somiglianza tra i due virus, l'origine di CPV-2 è stata subito attribuita a FPV, ma con differenti modalità. La prima ipotesi proponeva CPV-2 come una variante d'ospite di FPV, emersa nella popolazione felina e passata direttamente a quella canina, dinamica difficilmente compatibile con l'incapacità di CPV-2 di replicare nel gatto (Truyen, 1999). La seconda ipotesi suggeriva che CPV-2 potesse essere mutato da FPV durante la produzione di vaccini attraverso i passaggi seriali di attenuazione su colture cellulari ed essere stato diffuso tramite le vaccinazioni, ma ciò avrebbe richiesto ulteriori mutazioni rispetto a quelle evidenziate nei ceppi vaccinali, prima di garantire la capacità di replicare nel cane *in vivo* (Tratschin et al., 1982). Inoltre, anche la simultanea comparsa di

CPV-2 nella popolazione domestica e selvatica, non vaccinata, indebolisce questo argomento (Parrish, 1990). La terza ipotesi, ritenuta più plausibile, avanza il ruolo di un ospite intermedio tra gatto e cane, in cui FPV possa aver perso delle caratteristiche adattandosi al nuovo ospite e avvicinandosi al cane, acquisendo le proprietà necessarie per replicarvi (Truyen, 1999). Il ritrovamento di sequenze intermedie tra FPV e CPV in una volpe rossa sembra suggerirne il contributo all'evoluzione di CPV-2 (Truyen et al., 1998; Hoelzer and Parrish, 2010). Altri studi (Allison et al., 2013) propongono invece l'origine parallela dei due virus da un antenato comune, che giustificerebbe la fase di adattamento precedente alla comparsa nell'ospite cane con la circolazione in ospiti selvatici (puma, lince, procione), entro i quali sono state dimostrate la circolazione e persistenza di ceppi FPV-like e CPV-like filogeneticamente eterogenei, riflesso dei numerosi contatti tra popolazioni selvatiche su base etologico-predatoria.

È interessante notare come FPV e CPV, sebbene siano entrambi virus a ssDNA con analoga struttura genomica e ciclo replicativo, presentino tassi evolutivi significativamente differenti, rispettivamente $\sim 10^{-5}$ e $\sim 10^{-3-4}$ (Hoelzer et al., 2008b). Ciò permette di ipotizzare una maggiore spinta evolutiva nel caso di CPV, dettata da differenti pressioni selettive legate al nuovo ambiente. In effetti, l'origine di CPV è stata stimata 10 anni prima della sua reale identificazione (Shackelton et al., 2005), il che implicherebbe un progressivo accumulo di mutazioni, poi fissatesi durante la circolazione nella popolazione canina, prima di potersi manifestare nella sua piena virulenza.

Parte dell'adattamento all'ospite può essere promosso anche da necessità strettamente connesse alla replicazione e al tropismo tissutale: il confronto del *codon bias*, ovvero la predilezione specifica di ogni organismo per l'utilizzo di alcuni codoni piuttosto di altri per la codifica dello stesso aminoacido, tra FPV e CPV, ha messo in luce l'adattamento dei due virus verso il *codon usage* dei rispettivi ospiti d'elezione, assieme a una più spiccata affinità per i differenti tessuti target dell'infezione, come il cervello per FPV e l'intestino per CPV (Franzo et al., 2017).

Le differenze tra i due virus, soprattutto per le conseguenze epidemiologiche a cui sono correlate, hanno suscitato molto interesse, tanto da permettere di identificare dettagliatamente le variazioni fenotipiche alla base del tropismo d'ospite e delle proprietà antigeniche. Poiché la selezione naturale agisce direttamente sul fenotipo e solo indirettamente sul genotipo, appare inoltre scontato attribuire una parte considerevole della variabilità aminoacidica alla necessità di adattarsi all'apparato recettoriale e alla biologia cellulare di una nuova specie.

Dai primi studi, alcuni ceppi di CPV-2 differivano da FPV per 19 posizioni nucleotidiche risultanti in 9 aminoacidi diversi, di cui 3 localizzati nel gene della proteina non strutturale NS1 (Martyn et al., 1990) e 6 nel gene della proteina capsidica VP1 (Parrish et al., 1988a; Martyn et al., 1990). Altri studi hanno permesso di identificare in tutto 8 residui aminoacidici nella VP2 che permettono di distinguere FPV e CPV-2 e si localizzano nelle posizioni 80 (Lys-Arg), 93 (Lys-Asn), 103 (Val-Ala), 232 (Val-Ile), 323 (Asp-

Asn), 375 (Asp-Asn), 564 (Asn-Ser), 568 (Ala-Gly) (Parrish, 1991; Chang et al., 1992; Hueffer et al., 2003a). Le mutazioni dei residui 93, 103 e 323 sono indispensabili per la replicazione nel cane e, tranne il 103, sono target di differenti mAb specifici per CPV e FPV. I residui 323 e 375 sono responsabili della peculiare capacità di emoagglutinazione dei due virus a valori differenti di pH (Chang et al., 1992); il residuo 375 non è esposto sulla superficie, ma è situato nei pressi della depressione “*dimple*” accessibile ai solventi, che racchiude il sito di legame all’acido sialico degli eritrociti (Parrish, 1991). Anche i residui 80, 564 e 568 sono coinvolti nella specificità di ospite, essendo in stretta relazione nella struttura terziaria della VP2 e il residuo 80 fa parte di un epitopo specifico di FPV (Truyen et al., 1994a).

La selezione di queste caratteristiche, probabilmente facilitata dalla circolazione in un ospite intermedio, determina una maggior affinità per il TfR canino, data l’impossibilità di FPV di legare uno specifico sito di glicosilazione del recettore nel cane (Palermo et al., 2006). Infatti, le regioni in cui si localizzano i residui ospite-specifici, sono situate nei pressi della *spike* capsidica e sono coinvolte prevalentemente nell’interazione virus-ospite (Hueffer et al., 2003b). Il recupero invece della capacità di infettare il gatto avviene con la comparsa della variante 2a (Parrish et al., 1988c), a partire dal virus CPV-2 originale, attraverso la mutazione di altri residui aminoacidici (87 Met-Leu, 101 Ile-Thr, 300 Ala-Gly, 305 Asp-Tyr) (Truyen et al., 1996a) e la reversione del residuo 375 ad aspartato (Asp) come in FPV (Chang et al., 1992; Truyen and Parrish, 1995): l’acquisizione di questi nuovi caratteri si riflette in svariati vantaggi, quali il mantenimento dell’affinità per il TfR del cane, l’ampliamento dello spettro d’ospite, un uso più efficiente del recettore o una differente conformazione che favorisca anche le fasi dell’infezione successive all’adesione recettoriale (Hueffer et al., 2003b). Inoltre, le varianti acquisiscono alcune peculiarità antigeniche tali da non essere riconosciute da alcuni mAb (Parrish, 1990). I primi isolati di CPV-2a mostrano una mutazione anche in posizione 555 (Val-Ile) (Parrish et al., 1991), che però non viene più rilevata successivamente (Martella et al., 2006), lasciando come unico carattere distintivo tra le nuove varianti il residuo 426 (Decaro and Buonavoglia, 2012). CPV-2b viene infatti identificato a partire dal 1984 (Parrish et al., 1991), come variante di CPV-2a (Hoelzer et al., 2008b) caratterizzata dalla reversione a valina (Val) del residuo 555 e dalla presenza di un aspartato (Asp) in posizione 426 al posto dell’asparagina (Asn), in stretta vicinanza con il residuo 93, assieme al quale costituisce un epitopo CPV-specifico, determinando la specificità d’ospite (Parrish et al., 1991). Nel 2000 viene poi identificata in Italia una terza variante (Buonavoglia et al., 2001), CPV-2c, che si distingue dalle precedenti solo per la presenza di un acido glutammico in posizione 426 (Glu 2c/Asn 2a/Asp 2b). La circolazione di CPV-2c viene rapidamente individuata in tutta Europa, con il primo ritrovamento inizialmente retrodatato al 1996 in Germania (Decaro et al., 2007a) e poi al 1995 in Polonia (Majer-Dziedzic et al., 2011). La rilevanza del residuo in posizione 426 è notevole, data la localizzazione assieme ai residui 93, 222 e 224 all’interno dell’epitopo A nella regione più rilevata

delle *spike* e target di anticorpi neutralizzanti. Oltre all'epitopo A è stato riconosciuto l'epitopo B, alla base delle *spike*, in cui sono localizzati i residui 299, 300, 303 (Strassheim et al., 1994).

Altre mutazioni sono state individuate a carico di residui aminoacidici diversi e trasversalmente in tutte le varianti 2a/2b/2c, lasciando come carattere realmente distintivo il solo residuo 426. Questo elemento ha permesso di riconsiderare la natura delle varianti 2b e 2c, non più come sottotipi distinti ma piuttosto come derivanti da CPV-2a (Organtini et al., 2015).

Anche per CPV-2a è stata proposta un'origine e una diffusione vaccinale, ma la contemporanea emergenza di questa variante in paesi in cui non era stata adottata alcuna forma di profilassi vaccinale (Australia, Europa, Giappone), ha permesso di escluderla (Parrish et al., 1988c). La comparsa di CPV-2a sembra imputabile a una fase di adattamento di CPV-2 nel procione, permettendo l'acquisizione di una maggior affinità per il TfR canino e la capacità di evadere parzialmente la risposta anticorpale generata da CPV-2, già molto diffuso nella popolazione canina: questo è supportato dal ritrovamento di sequenze filogeneticamente intermedie tra CPV-2 e 2a, anche se provviste di alcuni residui che ancora impediscono il legame al TfR canino (300 Asp, 305 His/Asp) e testimoniano la necessità di ulteriori mutazioni, successivamente acquisite nel cane (Allison et al., 2012). La contemporanea e ampia circolazione di CPV-2a anche nella popolazione selvatica, quindi non vaccinata, suggerisce come i caratteri acquisiti da questa variante siano la diretta conseguenza di una maggiore *fitness* e non di un'evoluzione spinta dalla vaccinazione (Parrish, 1990). La *fitness* di CPV-2a è infatti da ricercare più probabilmente in una maggiore abilità replicativa, di trasmissione e nella differente antigenicità, conferite dalla maggior flessibilità capsidica (Organtini et al., 2015). Inoltre, il più ampio spettro d'ospite ha facilitato enormemente la sua diffusione, tanto da mostrare prevalenze molto elevate nella popolazione felina sia domestica sia selvatica (Allison et al., 2014). Se l'acquisizione di una nuova nicchia ecologica ha richiesto una straordinaria evoluzione, il persistere nella stessa, con la capacità di circolare nonostante la crescente immunità di popolazione, è probabilmente responsabile del continuo emergere di nuove varianti virali. Le pressioni selettive in azione sui determinanti antigenici neutralizzanti possono aver promosso la successiva evoluzione delle altre due varianti, CPV-2b e 2c, con tempistiche differenti, data la rapida comparsa e diffusione di CPV-2b (426 Asp) nel 1984 (Parrish et al., 1991) e di CPV-2c (426 Glu) nel 2000 (Buonavoglia et al., 2001). Per quanto sia stata preconizzata la capacità di soppiantare le precedenti varianti per CPV-2b (Parrish et al., 1991), o una maggior virulenza per la variante 2c (Decaro et al., 2008; Larson and Schultz, 2008; Hernández-Blanco and Catala-López, 2015) e quindi un maggior successo epidemiologico, le tre varianti antigeniche 2a, 2b e 2c coesistono e co-circolano tuttora a livello globale (Miranda and Thompson, 2016a), senza evidenze di particolari differenze nella patogenicità (Markovich et al., 2012).

1.2.2 Spettro d'ospite e trasmissione

A seguito del suo complesso percorso evolutivo, CPV presenta uno spettro d'ospite molto ampio. L'ospite principale è il cane (*Canis lupus familiaris*) (Greene and Decaro, 2012), ma anche il gatto (*Felis catus*) (Truyen et al., 1996a) è sensibile al virus attualmente in circolazione. La presenza di CPV è stata confermata in numerosi carnivori selvatici (Steinel et al., 2001), tra cui il lupo (*Canis lupus*) (Martinello et al., 1997), il coyote (*Canis latrans*) (Evermann et al., 1980; Davidson et al., 1992), il dingo (*Canis lupus dingo*) (Steinel et al., 2001), la volpe rossa (*Vulpes vulpes*) (Frölich et al., 2005; Sobrino et al., 2008; Santos et al., 2009; Filipov et al., 2016), la volpe grigia (*Urocyon cinereoargenteus*) (Gabriel et al., 2010), la martora di Pennant (*Martes pennanti*) (Gabriel et al., 2010), il licaone (*Lycaon pictus*) (Goller et al., 2010; Woodroffe et al., 2012), il ghepardo (*Acinonyx jubatus*) (Steinel et al., 2000), la tigre (*Panthera tigris tigris*) (Steinel et al., 2000), il leopardo (*Felis bengalensis*) (Ikeda et al., 2000), il puma (*Puma concolor*) (Allison et al., 2013), la lince rossa (*Lynx rufus*) (Allison et al., 2013), lo sciacallo dorato (*Canis aureus*) (Namroodi et al., 2017), il procione (*Procyon lotor*) (Allison et al., 2013), il cane procione (*Nyctereutes procyonoides*) (Truyen et al., 1995), l'otocione (*Otocyon megalotis*) (Steinel et al., 2000), la civetta delle palme mascherata (*Paguma larvata*) (Xiao-ying et al., 2011) e la faina (*Martes foina*) (Decaro et al., 2012; Duarte et al., 2013). Inoltre CPV è stato individuato nel panda rosso (*Ailurus fulgens*) (Qin et al., 2007), mentre è stata accertata la positività sierologica nel panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) (Mainka et al., 1994), nell'urocione delle Channel Islands (*Urocyon littoralis*) (Clifford et al., 2006), nella lince pardina (*Lynx pardinus*) (Millán et al., 2009), nello sciacallo (*Canis mesomelas*) (Alexander et al., 1994), nella genetta comune (*Genetta genetta*) (Santos et al., 2009), nella martora (*Martes martes*) (Frölich et al., 2005) e nell'orso marsicano (*Ursus arctos marsicanus*) (Marsilio et al., 1997). A ridosso della sua comparsa, morbilità e mortalità causate da CPV si attestavano a livelli molto elevati, colpendo in modo pressoché uniforme animali giovani e adulti sprovvisti di immunità nei confronti del nuovo patogeno, fino a quando la diffusione dell'infezione e la vaccinazione non hanno arginato il problema alle fasce d'ospite meno immunocompetenti, ovvero il cucciolo neonato o nella fase di calo dell'immunità materna (Pollock and Coyne, 1993).

Essendo un virus estremamente resistente nell'ambiente (Crawford and Sellon, 2010), la sua persistenza su superfici, oggetti, persone e animali stessi, gioca un ruolo fondamentale nella trasmissione indiretta della patologia, imponendo perciò l'adozione di rigorose misure di disinfezione e biosicurezza, oltre all'isolamento e la quarantena degli animali colpiti, sia in caso di ospedalizzazione o permanenza in canile, sia se gestiti a casa dal proprietario. CPV è stato anche identificato sulle mosche, che agiscono da vettore meccanico e, la loro circolazione e contaminazione, è stata correlata a una maggior incidenza di casi di parvovirosi (Bagshaw et al., 2014).

La trasmissione diretta avviene per via oro-fecale, grazie all'eliminazione virale nelle feci a titoli elevati. Durante un'infezione sperimentale sono stati rilevati titoli tra 10^5 - 10^9 TCID₅₀/g al picco dello

shedding intorno al quinto giorno post-infezione (Pollock, 1982) (fino a 10^{10} copie/mg al decimo giorno in PCR, (Decaro et al., 2005b)) e il contagio di un animale sano posto a contatto con uno dei cani nel medesimo studio, è stato possibile fino 18 giorni (Pollock, 1982), mentre altri studi hanno accertato lo *shedding* prolungato, oltre la risoluzione della sintomatologia, fino a 22 (Carman and Povey, 1980) e 51 giorni (Decaro et al., 2005b). Per quanto riguarda la forma cardiaca, è stata proposta anche la trasmissione verticale con infezione transplacentare (Johnson et al., 1983) ma, al contrario di quanto avviene per FPV (Parrish, 1995b; Stuetzer and Hartmann, 2014), non ci sono evidenze di infezione naturale in utero con viremia materna (Lenghaus and Studdert, 1984) e la miocardite è stata riprodotta solo attraverso l'inoculazione fetale (Lenghaus et al., 1980) di CPV o neonatale (Meunier et al., 1984). Uno studio retrospettivo in alcuni allevamenti ha però rilevato un marcato calo nell'efficienza riproduttiva dalla comparsa di CPV, senza escludere la multifattorialità del problema ma suggerendo un possibile ruolo di questo patogeno nei disturbi riproduttivi (Gooding and Robinson, 1982).

CPV colpisce prevalentemente animali giovani sotto i 6 mesi (Prittie, 2004), soprattutto nella fase di calo dell'immunità materna (tra le 4 e 12 settimane), o anche più precocemente se sieronegativi (Decaro and Buonavoglia, 2012). Sono stati riportati però anche alcuni casi di infezione in animali adulti e vaccinati (Buonavoglia et al., 2001; Decaro et al., 2008, 2009), suggerendo una particolare virulenza della variante responsabile e l'inadeguatezza del ceppo, o piuttosto del protocollo vaccinale utilizzato (Cavalli et al., 2008; Decaro et al., 2008, 2009). Talvolta sono stati evidenziati casi di infezioni subcliniche (Duijvestijn et al., 2016) in animali parzialmente immunocompetenti, con un possibile ruolo epidemiologico importante nella disseminazione virale (Larson and Schultz, 2007).

1.2.3 CPV nel gatto

Fin dalla comparsa di CPV-2a, è stata riconosciuta alle varianti antigeniche di CPV, escluso il ceppo originale, la riacquisizione della capacità di replicare nell'ospite gatto (Truyen et al., 1996a). Le prime identificazioni di CPV nel gatto risalgono agli anni '80, quando in Giappone sono stati isolati da gatti non sintomatici dei ceppi di CPV simili alla variante 2a (Mochizuki et al., 1991, 1993). Successivamente CPV è stato accertato nel gatto anche negli USA con l'identificazione di due ceppi 2b (Truyen et al., 1996a) e in Germania delle varianti 2a e 2b (Truyen et al., 1996b).

A seguito di questi riscontri sono stati effettuati studi sperimentali di patogenicità per verificare l'effettiva capacità replicativa e patogena di CPV nel gatto: sperimentalmente CPV-2 ha mostrato limitata o nulla capacità replicativa (Truyen and Parrish, 1992; Truyen et al., 1996a), mentre CPV-2a e 2b sono stati identificati in tessuti target come intestino e tessuto linfoide (Truyen et al., 1996a). CPV-2b è risultato in grado di causare grave sintomatologia e mortalità (Gamoh et al., 2003), mentre è stata verificata la replicazione in tutti i tessuti e la sierconversione in gatti *specific-pathogen-free*

(SPF) infettati con un ceppo CPV-2a (Goto et al., 1984b), in assenza di sintomatologia clinica (Goto et al., 1984a). Ancora in gatti SPF (Nakamura et al., 2001), una comparazione della patogenicità di CPV-2a, 2c e FPV ha evidenziato sintomatologia e *shedding* simili a FPV, più omogenei e marcati negli animali infettati con il ceppo 2c rispetto al ceppo 2a e una sierconversione con titoli più elevati, anche nei confronti di FPV.

In svariati casi di infezione naturale, è stato segnalato il ritrovamento di CPV nelle feci di gatti asintomatici (Mochizuki et al., 1993; Hoelzer and Parrish, 2010; Clegg et al., 2012), come probabile esito di *shedding* prolungato o di infezioni subcliniche (Hoelzer and Parrish, 2010). Uno studio longitudinale (Clegg et al., 2012) su gatti accolti in due rifugi, ha messo in evidenza un'elevata prevalenza di CPV, in totale assenza di segni clinici e con eliminazione prolungata fino a 6 settimane, a dimostrazione del ruolo di *reservoir* del gatto, come portatore asintomatico e della sua capacità di trasmettere il virus ad altri ospiti, sia gatti sia cani. La mancanza di informazioni legate all'età degli animali testati, in assenza di dati anamnestici riguardanti animali privi di proprietario, impedisce di valutarne il ruolo quale eventuale "fattore di resistenza" allo sviluppo di sintomatologia. Resta inoltre probabile che la sensibilità alla malattia sia influenzata dalle condizioni generali dell'animale (Battilani et al., 2006b). Oltre allo *shedding* prolungato, anche la persistenza dell'infezione a livello di midollo e il ritrovamento di CPV e di FPV, nei leucociti di gatti generalmente asintomatici (Balboni et al., 2018), sottolinea il complesso ruolo di questo ospite che può albergare infezioni croniche e subcliniche. Molti altri casi riportano invece forme cliniche evidenti, più o meno simili alla panleucopenia felina o alla parvovirosi nel cane. CPV è stato identificato anche nel tessuto nervoso, ponendo la questione della capacità replicativa di questo virus, per di più nella sua variante originale, in cellule differenziate e non mitoticamente attive (Url et al., 2003). In letteratura, uno dei primi riscontri di infezione naturale da CPV nel gatto è avvenuto in una gatta di 1,5 anni con segni tipici di panleucopenia e positiva a un ceppo simile a CPV (Mochizuki et al., 1996); un altro caso di una gattina di 5 mesi con presentazione classica di panleucopenia felina, caratterizzata da abbattimento, febbre, disidratazione e marcata leucopenia, è risultato invece sostenuto da CPV-2c (Miranda et al., 2014), infezione già attestata nel gatto anche in Italia (Battilani et al., 2006a, 2011; Decaro et al., 2010a). CPV ha rivelato un'elevata prevalenza nella popolazione felina domestica e selvatica nel Sud-est asiatico (Ikeda et al., 2000) e ceppi 2a e 2b sono stati identificati anche in campioni provenienti da USA, Namibia e Germania da ghepardi, tigri e grandi felini selvatici con sintomatologia (Steinel et al., 2000). La variabilità di CPV nell'ospite gatto ha messo in evidenza la compresenza delle diverse varianti nello stesso animale, suggerendo come l'adattamento all'ospite possa promuoverne l'evoluzione, attraverso l'elevato tasso di sostituzione e di crescita di popolazione propri di CPV (Battilani et al., 2006b).

1.2.4 Feline panleukopenia virus/feline parvovirus

Il virus della panleucopenia felina (*feline parvovirus*, FPV) è stato identificato intorno agli anni '20-30 del Novecento (Truyen and Parrish, 2013) ed è ora considerato una variante appartenente alla specie *Carnivore protoparvovirus 1*. Può colpire il gatto, i felini in generale, i mustelidi e procionidi (Stuetzer and Hartmann, 2014). In infezioni sperimentali è stata dimostrata la capacità di FPV di replicare nel timo del cane (Truyen and Parrish, 1992), ma non nell'intestino, senza causare quindi malattia. Come gli altri *autonomous parvovirus*, FPV sfrutta l'apparato replicativo delle cellule dell'ospite nella fase di attiva replicazione (Stuetzer and Hartmann, 2014), indirizzandosi verso tessuti a elevato indice mitotico. Fra questi rientrano in particolare il midollo osseo, con conseguente deplezione leucocitaria, linfocitoli e immunosoppressione, l'epitelio intestinale, con distruzione delle cripte e alterazione dell'assorbimento da parte dei villi (Parrish, 1995b) e, infine, il sistema nervoso centrale, soprattutto a seguito di infezione intrauterina o neonatale, con ipoplasia cerebellare (Aeffner et al., 2006), idrocefalia, idranencefalia (Sharp et al., 1999) o displasia retinica (Percy et al., 1975).

L'infezione da FPV può essere anche subclinica (Csiza et al., 1971), a seconda dell'età dell'ospite, dello stato immunitario e di infezioni concomitanti (Stuetzer and Hartmann, 2014), mentre la sintomatologia clinica si presenta generalmente con una forma acuta caratterizzata da abbattimento, anoressia, febbre, vomito e, meno frequentemente, diarrea (Litster and Benjanirut, 2014). In caso di infezione intra-uterina precoce possono verificarsi riassorbimenti, mummificazione, natimortalità (Stuetzer and Hartmann, 2014) mentre, se infettati nell'ultima fase della gravidanza, i neonati possono manifestare sintomi neurologici come atassia, ipermetria, cecità e tremori (Sharp et al., 1999).

I meccanismi patogenetici della panleucopenia felina si riflettono in una grave leucopenia, fino a 50-3000 cellule/ μ l, con un'iniziale neutropenia causata dalla perdita cellulare attraverso l'epitelio intestinale danneggiato, peggiorata poi da mielosoppressione (Greene, 2012). Sebbene la sintomatologia enterica sia meno accentuata che nella parvovirosi canina, anche FPV replica nelle cripte dell'epitelio intestinale, causandone la distruzione e predisponendo a diarrea, malassorbimento, traslocazione batterica o shock endotossico (Parrish, 1995b). Altre frequenti alterazioni comprendono la trombocitopenia, dovuta a deplezione megacariocitica o al consumo in seguito a coagulazione intravasale disseminata (CID/DIC), ipoalbuminemia da enteropatia proteino-disperdente e squilibrio elettrolitico legato alla sintomatologia gastroenterica (Kruse et al., 2010). Queste alterazioni (Kruse et al., 2010), oltre a infezioni secondarie (Csiza et al., 1971), coagulazione intravasale disseminata (CID/DIC) e shock ipovolemico (Stuetzer and Hartmann, 2014), sono da considerare fattori prognostici negativi per la sopravvivenza dell'animale colpito (Litster and Benjanirut, 2014).

FPV colpisce animali giovani e sovente intere cucciolate, manifestando un'estrema facilità di trasmissione, grazie allo *shedding* elevato nelle feci (10^9 particelle virali per grammo di feci) e in tutti i fluidi corporei, alla grande resistenza ambientale e ad agenti chimici e fisici, alla trasmissione sia verticale sia per contatto diretto e indiretto, tramite oggetti, superfici e proprietari contaminati, tanto da costituire un rischio anche per gatti che vivono in appartamento (Greene, 2012). L'eliminazione virale prolungata, fino a 6 settimane dopo la scomparsa dei sintomi (Rezabek, 2008) e l'infezione subclinica e/o persistente, sono fattori che contribuiscono a mantenere un'elevata pressione infettante nell'ambiente, se non si prevedono appropriati interventi di disinfezione con prodotti efficaci, come ipoclorito di sodio o glutaraldeide (Gaskell et al., 2010) e strategie di prevenzione e immunizzazione di popolazione. La vaccinazione contro FPV è annoverata tra i *core vaccine*, ossia quelli essenziali secondo la World Small Animal Veterinary Association (WSAVA), che suggerisce tre vaccinazioni (a 8-9, 12-13 e 16 o più settimane) per il ciclo completo di immunizzazione, con un richiamo a 26 o 52 settimane e successivamente ogni tre anni (Truyen and Parrish, 2013; Day, 2017). Nonostante la vaccinazione, alcuni studi hanno messo in luce una certa difficoltà nella sierconversione (Addie et al., 1998; Dawson et al., 2001; Jakel et al., 2012), come conseguenza primaria della presenza degli anticorpi materni che possono interferire con la vaccinazione fino a 9-12 settimane di età, talvolta fino a 20 settimane (Jakel et al., 2012). Per questo motivo è necessaria un'immunità di popolazione almeno del 70% (Stuetzer and Hartmann, 2014), che può essere garantita in parte dalla sierconversione che segue l'infezione naturale, ma deve essere promossa soprattutto dalla profilassi vaccinale, in grado di limitare la popolazione sensibile, prevenire lo *shedding* e abbassare quindi la pressione infettante. Le strategie di controllo sono indispensabili in contesti di gruppo, come rifugi o colonie feline, ma risultano essenziali anche per proteggere singoli individui che, inevitabilmente, verranno a contatto con ambienti contaminati. La vaccinazione può prevedere l'uso di vaccini inattivati, con un *onset* della risposta anticorpale più lento (Richards et al., 2006), o attenuati, che garantiscono invece una sierconversione rapida ed efficace (Brun et al., 1979). Una controindicazione minore all'uso dei vaccini vivi attenuati risiede nello *shedding* del vaccino stesso (Stuetzer and Hartmann, 2014), che può complicare la diagnosi della patologia, data la difficoltà nel differenziarli dai ceppi di campo nella normale routine clinica. Come diagnosi immediata a livello ambulatoriale, sono infatti utilizzati dei test ELISA *in-house* rapidi (Neuerer et al., 2008; Patterson et al., 2007), prodotti per l'identificazione di CPV, in grado di rilevare i vari stipiti di entrambi i patogeni con buona sensibilità, ma non di distinguerli. Queste procedure e lo scarso ricorso a metodiche specifiche per la distinzione tra FPV e CPV, hanno generalmente attribuito a FPV la maggioranza degli episodi clinici nel gatto, deducendone la responsabilità in relazione all'ospite, portando invece alla sottostima della reale prevalenza di CPV nei felini.

1.2.5 Ricombinazione-coinfezione

A fronte della grande diffusione di CPV, della presenza in ospiti differenti e della contemporanea infezione con altri patogeni o varianti, la ricombinazione è stata proposta come meccanismo addizionale in grado di promuovere l'evoluzione di CPV. Alcuni ceppi sono stati riconosciuti come esito di eventi di ricombinazione tra CPV-2 e CPV-2a, CPV-2 e 2b (Mochizuki et al., 2008), CPV-2a e 2b (Sung et al., 2017), CPV-2a e 2c (Pérez et al., 2014), CPV e FPV (Ohshima and Mochizuki, 2009), CPV e MEV (Wang et al., 2012), favoriti dal particolare meccanismo replicativo dei parvovirus, in cui il templatò può essere scambiato dall'apparato replicativo durante la duplicazione del DNA (Pérez et al., 2014). Perché la ricombinazione avvenga, è però necessaria la presenza di ceppi diversi all'interno dello stesso ospite, evento potenzialmente inusuale, data la natura acuta della parvovirosi, sebbene favorito dall'ampia circolazione virale, che può predisporre all'ingresso simultaneo di due virus diversi (Pérez et al., 2014). La coinfezione, senza necessariamente esitare nella ricombinazione, potrebbe anche modulare la sintomatologia causata dalla malattia (Pérez et al., 2014), complicando lo scenario epidemiologico e clinico. Diverse coinfezioni sono state segnalate nel cane, tra CPV-2a e 2c (Battilani et al., 2007), tra ceppi filogeneticamente distanti della stessa variante (Hoelzer et al., 2008a) e anche nel gatto, tra CPV-2a e 2c, FPV e CPV-2a (Battilani et al., 2007, 2011). In quest'ultimo caso è stato individuato anche un ceppo intermedio tra i due virus. Tuttavia, analisi più approfondite hanno portato a ritenere che questo origini dall'esito più probabile dell'adattamento all'ospite gatto, piuttosto che da un evento di ricombinazione (Battilani et al., 2011). All'interno della complessità evolutiva di CPV, questi meccanismi arricchiscono la variabilità del virus e ne complicano l'epidemiologia, sottolineando la necessità di un incalzante monitoraggio a livello genetico.

1.2.6 Distribuzione

Fin dalla sua comparsa, CPV si è affermato come virus ubiquitario, con distribuzione mondiale sia nella popolazione domestica sia selvatica, venendo identificato quasi contemporaneamente in Nord e Sud America, Europa, Asia, Oceania e Africa (Miranda and Thompson, 2016a). I paesi in cui CPV è stato segnalato sono riportati in Tabella 1. In alcuni paesi non sono state identificate tutte le varianti, probabilmente a causa del ridotto numero di campioni esaminati. La disponibilità di un dettagliato quadro epidemiologico è infatti ostacolata dai limiti di alcuni strumenti diagnostici che non permettono di caratterizzare il virus, come gli SNAP® test comunemente impiegati negli ambulatori. In aggiunta, è stato dimostrato come, alcuni test non adeguatamente aggiornati allo scenario epidemiologico, possano restituire la diagnosi errata di una variante al posto di un'altra (Demeter et al., 2010). Le varianti di CPV risultano eterogeneamente distribuite a livello mondiale e possono essere presenti a livello locale in proporzioni diverse (Miranda and Thompson, 2016a); questo però non rispecchia le relazioni filogenetiche tra i virus circolanti (Grecco et al., 2018), che talvolta

risultano filogeneticamente distanti pur con un fenotipo simile, complicando l'interpretazione epidemiologica. Alcune delle sequenze comprese all'interno delle singole varianti antigeniche sembrano infatti presentare lo stesso fenotipo come esito di un'evoluzione convergente, piuttosto che per fenomeni di ereditarietà. Le pressioni selettive che agiscono su regioni coinvolte nell'interazione virus-ospite o nell'evasione della risposta immunitaria, possono promuovere l'acquisizione dei medesimi caratteri in virus non necessariamente correlati o accomunati da uno stesso antenato. L'utilizzo di questi siti per la classificazione di CPV, la cui variabilità può di fatto essere indirettamente condizionata da fattori ambientali (e.g. contesto epidemiologico locale, immunità di popolazione, vaccinazioni, ecc.), è responsabile della parziale scollatura fra classificazione fenotipica e genotipica. La comparsa infatti delle stesse mutazioni aminoacidiche in svariate regioni, si affianca alla fisiologica dispersione virale, contribuendo all'eterogeneità e alla complessità dell'epidemiologia molecolare di CPV.

Tabella 1: elenco delle principali identificazioni di CPV a livello globale con riferimenti temporali (in ordine alfabetico).

Paese	Varianti	Anno	Referenze
Europa			
Albania	2a-2c	2011–2013	(Cavalli et al., 2014)
Austria	2a-2b		(Truyen et al., 2000)
Belgio	2a-2b	2009-2012	(Decaro et al., 2013)
Bulgaria	2a-2b-2c	2004-2014	(Filipov et al., 2011, 2016)
Francia	2a-2b-2c	2008-2012	(Decaro et al., 2011, 2013)
Germania	2a-2b-2c	2008-2012	(Truyen et al., 2000; Decaro et al., 2011)
Grecia	2a-2b-2c	2008-2009	(Ntafis et al., 2010)
Irlanda	2a-2b	2008-2009	(McElligott et al., 2011)
Italia	2a-2b-2c	1994-2017	(Sagazio et al., 1998; Buonavoglia et al., 2001; Jacoboni et al., 2001; Battilani et al., 2002, 2016; Martella et al., 2004, 2005b; Dei Giudici et al., 2017; Mira et al., 2018a; Purpari et al., 2018)
Polonia	2a-2b-2c	1982-2009	(Majer-Dziedzic et al., 2011)
Portogallo	2a-2b-2c	2012-2014	(Miranda et al., 2016)
Regno Unito	2a-2b-2c	2005–2012	(Decaro et al., 2007a, 2011; Clegg et al., 2011)
Repubblica Ceca	2a	2005–2006	(Decaro et al., 2007a)
Romania	2a		(Decaro and Buonavoglia, 2012)
Slovenia	2a		(Decaro and Buonavoglia, 2012)
Spagna	2a-2b-2c	2008-2012	(Decaro et al., 2011, 2013)
Svezia	2c		(Sutton et al., 2013)
Svizzera	2a-2b		(Truyen et al., 2000)
Turchia	2a-2b-2c	2006–2011	(Muz et al., 2012; Tımurkan and Oğuzoğlu, 2015)

Ungheria	2a	2004-2012	(Demeter et al., 2010; Cságola et al., 2014)
Asia			
Cina	2a-2b-2c	2009-2014	(Wang et al., 2005; Zhang et al., 2010; Ju et al., 2012; Zhao et al., 2013, 2017; Geng et al., 2015; Xu et al., 2015; Wu et al., 2015)
Corea del Sud	2a-2b	2003-2007	(Jeoung et al., 2008; Kang et al., 2008; Yoon et al., 2009)
Giappone	2a-2b	1980-2011	(Doki et al., 2006; Ohshima et al., 2008; Soma et al., 2013)
India	2a-2b-2c	2003-2014	(Chinchkar et al., 2006; Kumar and Nandi, 2010a; Nandi et al., 2010; Mittal et al., 2014; Nookala et al., 2016; Mukhopadhyay et al., 2017)
Iran	2a-2b	2006-2008	(Firoozjahi et al., 2011)
Iraq	2a-2b	2011-2014	(Ahmed et al., 2012; Sheikh et al., 2017)
Russia	2b	1993	Genbank (Chausov et al., 2011)
Taiwan	2a-2b-2c	2003-2016	(Wang et al., 2005; Chou et al., 2013; Lin et al., 2014, 2017; Chiang et al., 2016; Sung et al., 2017)
Thailandia	2a-2b	2003-2009	(Phromnoi et al., 2010)
Vietnam	2b-2c	2002	(Nakamura et al., 2004)
Africa			
Israele	2c	2011	(Nivy et al., 2011)
Marocco	2a-2b-2c	2011-2015	(Amrani et al., 2016)
Namibia	2a-2b	1996-1998	(Steinel et al., 1998)
Nigeria	2a	2010	(Dogonyaro et al., 2013)
Sud Africa	2a-2b	1995-1998	(Steinel et al., 1998; Dogonyaro et al., 2013)
Tunisia	2a-2b-2c	2007-2008	(Touihri et al., 2009)
Nord America			
Messico	2c	2013-2014	(Pedroza-Roldán et al., 2015)
USA	2a-2b-2c	2006-2007	(Hong et al., 2007; Kapil et al., 2007)
Sud America			
Argentina	2a-2b-2c	2008-2010	(Calderón et al., 2011, 2015)
Brasile	2a-2b-2c	1980-2010	(Pereira et al., 2000; Streck et al., 2009; Castro et al., 2010; Pinto et al., 2012; Monteiro et al., 2016)
Colombia	2a-2b	2013-2016	(Duque-García et al., 2017)
Ecuador	2a-2b-2c	2011-2012	(Aldaz et al., 2013)
Paraguay	2c	2009	(Calderón et al., 2011)
Uruguay	2a-2c	2007-2010	(Pérez et al., 2012; Maya et al., 2013)
Oceania			
Australia	2a-2b-2c	1980-2015	(Meers et al., 2007; Woolford et al., 2017; Clark et al., 2018)
Nuova Zelanda	2a-2b	2009-2010	(Ohneiser et al., 2015)

1.2.7 Fattori di rischio

I fattori di rischio per lo sviluppo della parvovirosi nel cane sono stati oggetto di svariati studi osservazionali. La giovane età (fino a 6 mesi) (Glickman et al., 1985; Mohammed et al., 2008) rappresenta la prima condizione di rischio per lo sviluppo della malattia (Miranda et al., 2015), sia per

ragioni legate alla patogenesi sia per la delicata fase di transizione dello stato immunitario del cucciolo. Alcune razze, tra cui il Doberman pinscher, il Rottweiler (Glickman et al., 1985), l'American pit bull terrier e il Pastore tedesco (Houston et al., 1996), sembrano più sensibili all'infezione e, generalmente, diversi studi riportano un rischio maggiore per le razze pure e di grossa taglia, rispetto ai meticci (Kalli et al., 2010; Duijvestijn et al., 2016). Non tutti gli studi (Godsall et al., 2010; Miranda et al., 2015) sono però concordi e non è stata provata una particolare predisposizione genetica. Per alcuni autori non sembra esserci correlazione tra il sesso e la malattia legata a CPV (Glickman et al., 1985; Mohammed et al., 2008; Miranda et al., 2015), mentre altri riportano un rischio più elevato per i maschi interi che per le femmine intere (Houston et al., 1996). La condizione sessuale risulta un fattore di rischio secondo Houston et al. (1996), per i quali gli animali sterilizzati sono meno a rischio, ma la stessa evidenza non è stata confermata da altri studi (Godsall et al., 2010; Miranda et al., 2015), in cui la condizione sessuale è stata piuttosto proposta come un confondente legato all'età dell'animale. Una maggior incidenza di casi di parvovirosi è stata rilevata in estate (luglio, agosto, settembre) da Houston et al. (1996), in maggio-giugno da Mohammed et al. (2005) e in inverno-primavera da Duijvestijn et al. (2016); Ling et al. (2012) hanno attribuito anche un valore prognostico negativo alla stagionalità, con una maggiore mortalità nei casi manifestatisi in estate, imputabile a una maggior trasmissibilità del virus, mentre l'elevata incidenza in questo periodo può essere ascrivibile al ricorso a strutture in grado di ospitare gli animali nei mesi di vacanza. Dai risultati di Stann et al. (1984), Castro et al. (2007) e Miranda et al. (2015) non emerge invece una particolare stagionalità della casistica. Lo stato immunitario dell'animale è considerato, in quasi tutti gli studi (Godsall et al., 2010; Kalli et al., 2010), un fattore di rischio molto importante e la somministrazione di almeno una vaccinazione contribuirebbe a ridurre il rischio di contrarre la parvovirosi (Kalli et al., 2010), anche se il mancato completamento del ciclo di vaccinazioni sembra inficiarne pesantemente l'efficacia (Castro et al., 2007). Anche gli animali non adeguatamente trattati per elmintiasi intestinali appaiono maggiormente esposti a CPV (Kalli et al., 2010; Miranda et al., 2015). La provenienza dal canile, dall'allevamento o da situazioni di promiscuità con altri animali, potenzialmente aumentano il rischio generico associato a episodi di diarrea (Stavisky et al., 2011; Tupler et al., 2012; Grellet et al., 2014) legati sia all'esposizione ad agenti infettivi, sia al cambio di dieta o a fattori stressanti ed è stato proposto che, anche parte dell'associazione tra razza e sensibilità a CPV, sia dovuta a un bias connesso alle condizioni di allevamento dei cuccioli (Kalli et al., 2010).

1.3 Aspetti patogenetici e clinici

1.3.1 Patogenesi

L'ingresso naturale di CPV avviene per via orale e i siti di replicazione primaria sono le tonsille, i linfonodi retrofaringei e il timo, in cui è stata dimostrata la presenza intracellulare del virus a partire dal primo giorno post-infezione/inoculo (Meunier et al., 1985a). Uno studio in cui l'infezione sperimentale è stata effettuata a livello intragastrico ha mostrato un decorso più lieve della malattia, suggerendo come la replicazione primaria a livello nasofaringeo possa avere un ruolo importante nell'amplificazione virale (Potgieter et al., 1981). Dal secondo giorno, il virus è stato individuato anche nei linfonodi mesenterici, raggiunti presumibilmente per via linfatica e probabile sito di replicazione primaria, in quanto la viremia compare dal terzo giorno (Meunier et al., 1985a) e permette la diffusione del virus a tutti gli altri tessuti. Dal quarto giorno il virus è stato identificato nei linfonodi tracheobronchiali e prescapolari (Meunier et al., 1985a) e poi in diversi organi come midollo osseo, polmoni, milza, fegato, cuore, surrenali, duodeno, digiuno, ileo e colon, oltre a encefalo e cervelletto, reni e vescica, sebbene con titoli inferiori (Decaro et al., 2007c). L'infezione del midollo e dei tessuti linfoidei causa distruzione delle cellule progenitrici dei globuli bianchi e dei precursori linfoidei, con linfoctolisi a livello del timo, marcata leucopenia e conseguente predisposizione a infezioni secondarie (Goddard et al., 2008). CPV raggiunge, a seguito di viremia, il tessuto linfoide del duodeno e le placche di Peyer, da cui ha facile accesso all'epitelio intestinale e alle cripte. Dal quinto giorno post-infezione/inoculo è stata riscontrata l'infezione diffusa delle cripte, sia circostanti il tessuto linfoide sia più periferiche (Meunier et al., 1985a). L'infezione delle cripte, la distruzione dell'epitelio intestinale e la perdita della capacità replicativa causano diminuzione dell'assorbimento intestinale, alterazione della barriera intestinale con aumento della permeabilità, perdita di proteine (enteropatia proteino-disperdente) con diarrea spesso emorragica, acuta, grave e ingresso di patogeni o tossine, favoriti da proliferazione microbica e dismicrobismo (Greene and Decaro, 2012). Alla diarrea si associa il vomito acuto, dovuto a irritazione locale con conseguente stimolazione vagale e a stimolazione centrale ad opera di citochine ed endotossine in circolo (Mantione and Otto, 2005), contribuendo alla disidratazione del paziente. La grave disidratazione può portare a shock ipovolemico che, assieme alla traslocazione batterica e all'endotossiemia, contribuisce all'insufficienza multiorgano o all'insorgenza della sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), responsabili infine della morte dell'animale. Il periodo di incubazione del virus è di circa 5 giorni in infezioni sperimentali (Potgieter et al., 1981) e da 7 a 14 giorni per l'infezione naturale (Greene and Decaro, 2012), mentre lo *shedding* fecale è stato dimostrato dal sesto giorno post-infezione (Meunier et al., 1985a), ma a bassi titoli può cominciare anche in fase preclinica (Greene

and Decaro, 2012). La gravità della patologia e delle lesioni, il titolo virale nel siero e l'entità dell'infezione intestinale, possono dipendere dal titolo virale raggiunto nei siti primari e dalla capacità replicativa del virus, assieme alla rapidità della viremia e al tasso di replicazione secondaria (Meunier et al., 1985a). Un'infezione sperimentale condotta da Meunier et al. (1985b), ha verificato la comparsa di viremia e *shedding* più precocemente con l'inoculazione intravenosa del virus, piuttosto che orale, mentre ha evidenziato una forte correlazione positiva tra i titoli virali nel siero o nelle feci, la sintomatologia e il grado di danno epiteliale intestinale e del tessuto linfoide. Inoltre, lo sviluppo della patologia può essere correlato al grado di proliferazione linfocitaria, come dimostrato da uno studio in cui linfopenia e conseguente proliferazione linfocitaria a seguito della vaccinazione contro il cimurro, hanno predisposto a una forma più grave di parvovirosi (Appel, 1978). Il virus si può presentare sia cellulo-associato sia libero nel sangue, con concentrazioni nel siero molto superiori a quelle riscontrabili nel *buffy coat* (Pollock, 1982), mentre la componente cellulare infetta può penetrare nei tessuti e far sì che il virus sia presente anche in assenza di lesioni o replicazione tissutale (Carman and Povey, 1985).

L'aumento del titolo anticorpale riduce la viremia e il numero di tessuti in cui il virus viene riscontrato (Carman and Povey, 1985), nonostante una persistenza maggiore del virus nell'intestino e nel tessuto linfoide; il picco anticorpale blocca inoltre anche lo *shedding* virale e si protrae nel periodo di convalescenza, durante il quale può verificarsi una forma di leucocitosi o linfocitosi dovuta alla ripresa della proliferazione midollare (Potgieter et al., 1981).

La forma cardiaca invece può essere riprodotta con iniezione intrauterina nel feto (Lenghaus et al., 1980), o aver luogo a seguito di infezione nei primissimi giorni dopo la nascita (Meunier et al., 1984), dato che i cardiomiociti mantengono un'attività mitotica residuale fino a 15 giorni di età (Robinson et al., 1980a). La replicazione del virus nei cardiomiociti, la necrosi multifocale e l'infiammazione interstiziale che sostengono la miocardite, causano aritmie, insufficienza cardiaca e fibrosi in stadi più avanzati, che si riflettono in un'alterazione del circolo e conseguente insufficienza polmonare con esito fatale molto repentino (Robinson et al., 1980a). La morte improvvisa può essere imputabile anche alla localizzazione delle lesioni a livello del nodo atrioventricolare, con conseguente alterazione della conduzione dello stimolo elettrico (Lenghaus et al., 1980). Nel caso di miocardite subclinica e guarigione, l'esito fibrotico può portare a uno sviluppo tardivo di patologia cardiaca, rendendo difficile la ricostruzione eziologica, se non tramite indagini istologiche e immunoistochimiche di ricerca dell'antigene a livello tissutale (Ford et al., 2017).

In qualche raro caso, la presenza di CPV è stata evidenziata anche a livello del sistema nervoso centrale (Decaro et al., 2007c) suggerendone la responsabilità, come per FPV, di lesioni degenerative, alterazioni morfologiche (Johnson and Castro, 1984) e ipoplasia cerebellare congenita (Schatzberg et

al., 2003), ma altri studi hanno escluso la capacità di CPV di infettare le cellule nervose (Url and Schmidt, 2005).

1.3.2 Immunità

Lo stato immunitario al momento del contagio e la risposta conseguente all'infezione da parvovirus sono determinanti per l'esito della patologia. Attualmente, a seguito della grande diffusione di CPV e dell'ampia adozione di protocolli vaccinali, la popolazione adulta risulta generalmente immune nei confronti di CPV (Pollock and Coyne, 1993), spesso per lungo periodo o anche per tutta la vita, a seguito di infezione naturale.

L'immunocompetenza nelle femmine ha permesso di abbattere notevolmente l'incidenza della forma cardiaca dell'infezione, garantendo la copertura immunitaria del neonato e spostando la finestra temporale del rischio in corrispondenza del calo dell'immunità materna (Pollock and Coyne, 1993). Nel cane, il trasferimento dell'immunità passiva avviene in modo marginale per via transplacentare (endoteliochoriale, passaggio del 5-10% di IgG) e principalmente attraverso l'assunzione del colostro nei primissimi giorni di vita del cucciolo, con l'assorbimento intestinale degli anticorpi grazie a una temporanea permeabilità mucosale e a una ridotta capacità proteolitica (Chappuis, 1998). Una parte residuale di anticorpi materni può essere riscontrata anche nel latte e può contribuire a un'azione locale a livello intestinale (Decaro et al., 2004), come immunità lattogenica (Chappuis, 1998). Gli anticorpi materni (*maternally derived antibodies*, MDA) sono quindi la prima protezione per il neonato, hanno un'emivita di circa 9-10 giorni (Greene and Decaro, 2012) e passano nel colostro con un titolo proporzionale al titolo anticorpale della madre (Chappuis, 1998), con un rischio perciò più elevato per i cuccioli nati da madri sieronegative, non correttamente vaccinate o che non siano mai entrate in contatto con il virus. Gli MDA circolanti o presenti a livello intestinale agiscono direttamente nei confronti del virus, sequestrandolo e prevenendo l'instaurarsi della viremia (Decaro et al., 2005a), ma solo titoli adeguati risultano realmente protettivi: a seguito dei primi studi (Gooding and Robinson, 1982; Pollock and Carmichael, 1982) anche un titolo anticorpale minimo >1:80 era apparso sufficiente per la protezione del cucciolo, tuttavia approfondimenti successivi (Decaro et al., 2005a) hanno mostrato la necessità di titoli maggiori (>1:160). Titoli inferiori (<1:20), pur non conferendo sufficiente protezione, riescono comunque a interferire con la vaccinazione, fino al loro completo calo, anche a 6-15 settimane (Pollock and Coyne, 1993).

Il calo degli anticorpi materni è quindi seguito da un periodo di circa una settimana, detto "*immunity gap*" (Nandi et al., 2013), in cui il cucciolo è completamente vulnerabile all'infezione, ma ancora refrattario all'immunizzazione mediante la vaccinazione (Parrish, 2011). Quando si instaura l'infezione in animali immunocompetenti, la gravità delle manifestazioni può essere contenuta se la risposta immunitaria è in grado di limitare la viremia (Pollock and Coyne, 1993), esitando in infezioni

subcliniche, con sieroconversione, rialzo anticorpale e con *shedding* limitato (Decaro et al., 2005a). La risposta anticorpale limita lo *shedding* anche durante l'infezione di animali inizialmente sieronegativi, con la comparsa degli anticorpi intorno all'ottavo giorno (con picco all'undicesimo) post-infezione (Potgieter et al., 1981), generalmente poco dopo l'inizio dei sintomi (Pollock and Coyne, 1993). Globalmente, il titolo anticorpale in animali immunocompetenti correla con i livelli di protezione (Elia et al., 2005).

L'immunità locale non ha un ruolo preponderante, le IgA a livello intestinale non sembrano essenziali nel garantire la protezione (Pollock and Coyne, 1993). Tuttavia, a seguito di *challenge* sono stati identificati nell'intestino livelli di immunoglobuline (IgG, IgM, IgA) proporzionali ai titoli ematici (Nara et al., 1983), a indicare una certa attività secretoria e i titoli di coproanticorpi sono stati messi in correlazione con la riduzione dello *shedding* e la rapidità di guarigione (Rice et al., 1982).

L'immunità cellulo-mediata invece ha un ruolo minore nella difesa dell'animale infetto, poiché CPV causa neutropenia con calo dei neutrofili CD4+ e linfopenia con perdita di cellule T, compromettendone l'efficacia. La reazione infiammatoria al danno intestinale stimola la produzione e il rilascio di mediatori della risposta cellulare: la produzione di interleuchine IL-1 e IL-8 stimola la produzione e rilascio di neutrofili e di fattori chemiotattici verso le regioni danneggiate e il *Tumor Necrosis Factor* (TNF) promuove l'espressione endoteliale dei recettori per la marginazione cellulare (Yule et al., 1997).

1.3.3 Segni clinici

Nella manifestazione enterica, le prime fasi dell'infezione da CPV sono caratterizzate da febbre, abbattimento, depressione e letargia, che precedono l'insorgenza di diarrea acuta, giallastra con striature emorragiche, vomito, disidratazione e anoressia (Robinson et al., 1980b; O'Sullivan et al., 1984). All'esame clinico si possono rilevare pallore delle mucose, prolungamento del tempo di riempimento capillare, tachicardia, tachipnea, polso debole, ipertermia o ipotermia, dolore addominale (Kalli et al., 2010). La forma cardiaca si manifesta invece in modo inaspettato e fatale, con morte improvvisa dei cuccioli con età compresa tra 2 e 12 settimane (Bastianello, 1981), talvolta a seguito di una breve fase di dispnea (Robinson et al., 1980a). Alterazioni del ritmo sinusale sono state evidenziate sotto forma di extrasistoli ma, in un'infezione sperimentale, i tracciati ECG registrati sono risultati insufficienti nel rilevare anomalie utili a predire la malattia e la gravità (Lenghaus et al., 1980), a conferma del decorso talvolta iperacuto di aritmie e insufficienza cardiaca.

1.3.4 Alterazioni emato-biochimiche

La caratteristica peculiare dell'infezione da CPV è rappresentata dall'alterazione della conta leucocitaria, che si presenta con marcata linfopenia, per spiccato tropismo linfoide e linfolisi (Meunier

et al., 1985a), neutropenia (Potgieter et al., 1981) o, nei casi più gravi o negli animali più adulti, panleucopenia (Robinson et al., 1980b), probabilmente imputabile a un maggior numero di cellule target a livello midollare. Un'iniziale neutropenia può essere imputabile all'infezione delle cellule mieloidi, con calo della proliferazione e della maturazione cellulare e a un ulteriore sequestro tissutale a livello della lamina propria circostante le cripte intestinali infette (Carman and Povey, 1985). In corso di guarigione, possono presentarsi neutrofilia e linfocitosi compensatorie e transitorie, per la ripresa della funzionalità midollare (Potgieter et al., 1981), che può essere preannunciata già durante l'infezione dal rilascio di neutrofili banda. Gli animali colpiti possono presentare anemia, dovuta alle perdite gastroenteriche oppure anche all'emodiluizione da fluidoterapia (Schoeman et al., 2013). Il profilo coagulativo nella parvovirosi appare caratterizzato da uno stato protrombotico, con aumento del fibrinogeno e dei prodotti della degradazione della fibrina (FDP), prolungamento del tempo di tromboplastina attivata (aPTT), del tempo di protrombina (PT), riduzione dei livelli di antitrombina (AT) e calo delle piastrine (Otto et al., 2000). L'ipercoagulabilità è causata dall'effetto procoagulante di endotossine e citochine, assieme al consumo e alla perdita di antitrombina a livello intestinale (Otto et al., 2000).

Diarrea e vomito contribuiscono alla disidratazione e allo squilibrio elettrolitico che si riflettono in ipokalemia, iponatremia, ipocloremia, ipocalcemia, iperazotemia e ipercreatininemia (Schoeman et al., 2013). La disidratazione e lo shock endotossico possono causare anche alterazione degli enzimi epatici, ipocolesterolemia e aumento dei trigliceridi. Le perdite intestinali causano invece una diminuzione delle proteine plasmatiche aggravata dall'emodiluizione per la fluidoterapia, con grave ipoalbuminemia, ipogammaglobulinemia, marcata diminuzione delle α 1-globuline e aumento delle α 2-globuline (aptoglobina e proteina C reattiva), β 1 e β 2-globuline (plasminogeno, fibrinogeno e transferrina), frazioni nelle quali migrano le proteine di fase acuta, la cui produzione a livello epatico è stimolata dai mediatori dell'infiammazione (Van den Broek, 1990). Le proteine di fase acuta risultano infatti aumentate, con elevati livelli di proteina C reattiva, aptoglobina e ceruloplasmina (Kocaturk et al., 2010). La citrullina viene utilizzata come indicatore del trofismo intestinale e della numerosità degli enterociti e, in corso di parvovirosi, appare notevolmente diminuita (Dossin et al., 2011). Si osserva un marcato aumento del cortisolo imputabile allo stress e al processo infiammatorio, e un conseguente calo della tiroxina (Schoeman et al., 2007). Nelle fasi iniziali della malattia possono essere anche rilevati aumentati livelli di TNF ed endotossine nel sangue (Otto et al., 1997).

1.3.5 Fattori prognostici

Data la gravità e il decorso acuto dell'infezione, diversi autori hanno cercato di individuare i fattori correlati all'*outcome* della malattia, o comunque in grado di fornire delle indicazioni sulla gravità delle condizioni, per modulare di conseguenza l'intensità della terapia. Mentre elementi di segnalamento o

anamnestici come età, peso corporeo, sesso o razza non si sono dimostrati in grado di predire l'*outcome* del paziente (Kalli et al., 2010), alcuni sintomi, come depressione e vomito, si sono rivelati indubbiamente legati alla gravità della patologia e alla durata dell'ospedalizzazione (Kalli et al., 2010). L'esame ecografico non dà informazioni sull'eziologia, non essendo possibile identificare lesioni patognomiche, ma la gravità del pattern in corso di parvovirus, caratterizzato da atonia intestinale, contenuto fluido, assottigliamento della mucosa duodenale e digiunale con perdita della definizione degli strati mucosali, zone iperecogene multifocali nella mucosa, corrugamento duodenale e digiunale, rispecchia quella clinica del paziente e delle lesioni istopatologiche (Stander et al., 2010). Le alterazioni che vengono riassunte dalla condizione di SIRS, ovvero sindrome da risposta infiammatoria sistemica che comprende frequenza cardiaca >140 bpm, frequenza respiratoria >30 atti/minuto, temperatura >39.2°C or <37.8°C, conta leucocitaria >17,000 o <6,000 cellule/ μ L (Kalli et al., 2010), sono ritenute un fattore prognostico negativo (Mantione and Otto, 2005; Kalli et al., 2010). Sotto il profilo emato-biochimico, numerosi parametri possono dare indicazioni sull'esito della malattia o quantomeno allertare in merito alla gravità delle condizioni dell'animale. Una leucopenia marcata può sicuramente implicare un rischio maggiore di infezioni secondarie e di complicazioni e infatti, leucopenia grave (<4.5*10³/ μ L), neutropenia (3*10³/ μ L), linfopenia (<1*10³/ μ L), monocitopenia (<0.15*10³/ μ L), eosinopenia (<0.1*10³/ μ L) e assenza di *left shift* nelle prime 24 ore, sono considerati accurati indicatori di prognosi infausta (Goddard et al., 2008), anche se è stata evidenziata una discreta variabilità tra i diversi casi. I meccanismi alla base di queste alterazioni risiedono nell'infezione delle cellule progenitrici mieloidi e linfoidi, alla marginazione o alla perdita cellulare dovuta alla sepsi o alla permeabilità intestinale, al sequestro indotto dall'azione del cortisolo (Goddard et al., 2008). Un incremento della proteina C reattiva può essere utilizzato come altro fattore prognostico negativo (Kocaturk et al., 2010), con misurazioni ripetute a 12 e 24 ore dall'ammissione (McClure et al., 2013). Similmente l'ipocolesterolemia (Yilmaz and Senturk, 2007), l'ipercortisolemia e l'ipotiroxinemia (Schoeman et al., 2007), sono state associate alla gravità del quadro infiammatorio e all'eventuale capacità di ripresa sistemica. Anche valori elevati di TNF ed endotossine nel sangue sono stati correlati a un aumento della mortalità (Otto et al., 1997).

Tra gli approcci terapeutici, la nutrizione enterale precoce si è dimostrata efficace nell'accelerare il recupero funzionale dell'intestino, riducendo la permeabilità intestinale e la traslocazione batterica, con un conseguente miglioramento clinico più rapido, al contrario di quanto ottenuto con la sospensione dell'alimentazione oltre la cessazione del vomito (Mohr et al., 2003).

La parvovirus stessa invece funge da fattore predisponente ad alcune patologie enteriche, come intussuscezioni (Rallis et al., 2000), aumentando il rischio di decesso o di patologie croniche del tratto gastroenterico (Kilian et al., 2018), come diarrea osmotica da accorciamento dei villi, da allergia o intolleranza alimentare e patologie autoimmuni, che possono svilupparsi molto tempo dopo la

guarigione, a seguito della traslocazione batterica, della sensibilizzazione ad allergeni e all'utilizzo massivo di antibiotici, e del danno subito dall'epitelio intestinale.

1.3.6 Lesioni anatomo-istopatologiche

1.3.6.1 Reperti necroscopici

Gli animali deceduti per parvovirosi si presentano marcatamente disidratati, cachettici, con congestione delle sierose e petecchie dal duodeno alla giunzione ileo-cecale. L'intestino tenue appare disteso e atonico con contenuto fluido e giallastro, che può diventare più scuro verso l'ileo, mentre il colon generalmente è vuoto. Sulla superficie della mucosa possono essere presenti aggregati di fibrina. Il timo appare ipoplasico/atrofico (Robinson et al., 1980b). Nella forma cardiaca, può essere osservato un pallore generalizzato delle mucose, assieme a congestione polmonare ed epatica, edema polmonare, dilatazione ventricolare con striature biancastre del miocardio a tutto spessore (Robinson et al., 1980a).

1.3.6.2 Reperti microscopici

Tre giorni post-infezione, a livello linfonodale e tonsillare si può riscontrare necrosi dei centri germinali con deplezione cellulare nella zona paracorticale e nella corteccia del timo, con conseguente assottigliamento e cellule picnotiche. Da 4 a 6 giorni post-infezione si evidenziano progressive deplezione linfocitaria e necrosi epiteliale delle cripte intestinali sia circostanti il tessuto linfoide sia distanti. Il coinvolgimento delle placche di Peyer si manifesta con necrosi iniziale e successiva deplezione cellulare. Nel tratto di ileo e duodeno si può presentare il collasso dello strato mucosale adiacente ai noduli linfoidi, in corrispondenza delle aree di maggior dilatazione e picnosi delle cripte con accumulo di detriti epiteliali (Meunier et al., 1985a). Globalmente, le cripte possono risultare degenerate, dilatate e necrotiche per tutto il tratto gastroenterico, dal piloro al retto, con atrofia e fusione dei villi e corpi inclusi basofili nelle cellule epiteliali (Robinson et al., 1980b). I corpi inclusi nucleari si possono presentare come eosinofili negli stadi iniziali, per poi assumere una colorazione anfofilica e poi basofilica quando maturi (O'Sullivan et al., 1984). Nelle stesse regioni intestinali può essere evidenziato anche infiltrato eosinofilo. Sei giorni post-infezione, le lesioni a carico dei tessuti e organi linfoidi appaiono molto evidenti, con marcata deplezione cellulare dei centri germinali della milza e della zona paracorticale dei linfonodi e atrofia corticale del timo (Meunier et al., 1985a). Nei casi più gravi e nella fase più acuta dello sviluppo della malattia, duodeno e ileo presentano necrosi massiva e dilatazione delle cripte, con collasso della lamina propria e della mucosa, deplezione cellulare delle placche di Peyer, dilatazione ghiandolare e assottigliamento mucosale (Meunier et al., 1985a). A livello midollare può essere presente una deplezione delle cellule mieloidi ed eritroidi in maturazione (Robinson et al., 1980b), con iperplasia dei precursori dei

granulociti neutrofili, *left shift* con aumento della frazione mielocitica e progranulocitica, rari neutrofili banda e metamielociti (Potgieter et al., 1981). Durante la forma enterica, corpi inclusi basofili sono stati sporadicamente individuati in infezioni sperimentali anche a livello miocardico, in assenza di necrosi o infiltrato infiammatorio (Robinson et al., 1980b).

Nella forma cardiaca, si può riscontrare infiammazione focale e fibrosi interstiziale a livello subepicardico e miocardico, con degenerazione, necrosi e corpi inclusi basofili intranucleari a carico dei cardiomiociti ed edema interstiziale (Meunier et al., 1984). In alcuni casi è stato evidenziato infiltrato infiammatorio linfocitario e plasmacellulare (Meunier et al., 1984).

1.4 Gestione della parvovirosi

1.4.1 Diagnosi e cross-reazione

La natura acuta e grave della parvovirosi, la sua presentazione ben definita per la categoria di animali coinvolti e la sintomatologia influenzano anche l'approccio diagnostico, che consiste spesso in una rapida conferma a livello ambulatoriale, prima di concentrarsi sugli interventi terapeutici. La diagnosi è quindi spesso solo qualitativa, relegando gli aspetti di caratterizzazione e di approfondimento eziologico agli ambiti della ricerca. La diagnosi ambulatoriale è però un ausilio rapido e fondamentale all'attività del clinico ed è consentita grazie a kit ELISA per la ricerca dell'antigene nelle feci. Questi kit garantiscono una rapida esecuzione e hanno un'elevata specificità per i parvovirus (Kantere et al., 2015), ciononostante possono avere una scarsa sensibilità e non sono in grado di distinguere le varianti antigeniche, pur essendo in grado di identificarle con la medesima efficienza (Decaro et al., 2010b). I kit *in-house* sono inoltre incapaci di distinguere tra CPV e FPV e ciò, sebbene risulti vantaggioso perché permette la diagnosi di parvovirosi felina (Esfandiari and Klingeborn, 2000; Neuerer et al., 2008), non consente di determinare con sicurezza l'agente eziologico, contribuendo alla sottostima del ruolo di CPV nel gatto.

Un altro metodo rapido e ormai diffuso per l'identificazione di CPV è basato sulla PCR, che può permettere anche la caratterizzazione del ceppo e la distinzione delle varianti, a seconda che il metodo preveda l'uso di sonde specifiche o il sequenziamento. Sono stati validati numerosi metodi differenti, generalmente con il gene della proteina VP1/VP2 come target, in modo da sfruttare la maggior variabilità come discriminante. Le metodiche di biologia molecolare sono caratterizzate da una sensibilità elevata, superiore ai metodi di virologia classica (Desario et al., 2005) e permettono di monitorare il decorso del paziente, la viremia e lo *shedding* anche dopo la guarigione. Oltre ai protocolli di PCR classica per l'amplificazione dell'intero genoma (Pérez et al., 2014) o di tratti più ridotti (Pereira et al., 2000; Buonavoglia et al., 2001) in grado di distinguere le varianti, sono stati utilizzati dei protocolli di *nested*-PCR (Hirasawa et al., 1994), per ottenere una sensibilità maggiore, oppure protocolli di real time PCR, basati sull'uso di sonde (Decaro et al., 2005d) o agenti intercalanti del DNA (Kumar and Nandi, 2010b), che hanno consentito anche la quantificazione virale oltre alla caratterizzazione (Kaur et al., 2016). Progressivamente, con la comparsa della variante 2c e la reversione a Val del residuo 555 delle varianti 2a, alcuni di questi metodi non sono più stati in grado di discriminare correttamente le varianti (Buonavoglia et al., 2001; Pereira et al., 2000; Demeter et al., 2010), rendendo necessario e più affidabile il ricorso al sequenziamento del gene della proteina VP2 o dei suoi tratti più informativi.

Sono state validate anche una serie di metodiche di real time PCR che prevedono l'uso di sonde *Minor Groove Binder* (MGB) disegnate per il riconoscimento di *single nucleotide polymorphism* (SNP),

permettendo la distinzione delle varianti dal virus originale (Decaro et al., 2006a), dei ceppi vaccinali dai ceppi di campo (Decaro et al., 2006c) e delle tre varianti attualmente in circolazione (Decaro et al., 2005c). Nonostante l'efficacia, l'elevata sensibilità e specificità di queste metodiche, la variabilità di CPV e la presenza di numerose mutazioni rendono necessario un monitoraggio accurato dal punto di vista genetico, per arginare il rischio di mancare l'identificazione di nuove varianti con metodi obsoleti e di ottenere dei falsi negativi (Decaro and Buonavoglia, 2012).

È il caso però di sottolineare l'importanza di strumenti in grado di differenziare la presenza del vaccino piuttosto che del ceppo di campo nell'animale. Dato che l'eliminazione del vaccino può persistere fino a 28 giorni dopo la somministrazione (Freisl et al., 2017) e la reversione a virulenza dei vaccini è considerata una possibilità abbastanza remota, un'errata diagnosi di parvovirosi in concomitanza con un'altra patologia potrebbe complicare la scelta e l'esito terapeutico (Decaro et al., 2007b).

Altri approcci alla diagnosi diretta di CPV includono la microscopia elettronica, con la quale fin dal principio CPV è stato identificato e messo in relazione agli altri parvovirus (Burtonboy et al., 1979), l'isolamento virale (Appel et al., 1979b) nonostante CPV non formi placche (Heldt et al., 2006) e l'effetto citopatico non sia sempre evidente (Decaro and Buonavoglia, 2012), l'emoagglutinazione su eritrociti di maiale o di scimmia, anche se non tutti i ceppi presentano capacità emoagglutinanti (Parrish et al., 1988b; Cavalli et al., 2001) e la caratterizzazione mediante anticorpi monoclonali (Nakamura et al., 2003), utilizzata per discriminare le varianti di CPV e gli altri parvovirus. Sfortunatamente questi metodi sono dispendiosi sia dal punto di vista gestionale sia economico. Infine, in sede di analisi *post mortem*, sono impiegate come utili strumenti per la conferma diagnostica l'immunoistochimica o l'ibridazione *in situ* che riconoscono, rispettivamente con anticorpi o sonde marcate, l'antigene o l'acido nucleico del patogeno a livello tissutale (Decaro and Buonavoglia, 2012).

La diagnosi sierologica di parvovirosi sfrutta generalmente test ELISA indiretti oppure l'inibizione dell'emoagglutinazione, ma è poco utilizzata (Greene and Decaro, 2012), se non come esame collaterale in corso di screening di popolazione (Santos et al., 2009; Yang et al., 2010; Castanheira et al., 2014), poiché la sieroprevalenza per CPV è molto elevata. La diffusione di CPV offre numerose occasioni di contatto senza necessariamente sviluppare la malattia, se non nelle fasce di età più a rischio e, inoltre, l'ampio utilizzo della vaccinazione ha determinato una considerevole immunità di popolazione, rendendo difficilmente interpretabili i risultati della sierologia.

1.4.2 Prevenzione

La prevenzione e il controllo della parvovirosi sono quasi totalmente affidati alla vaccinazione. La popolazione canina ha delle caratteristiche particolari per le quali gli individui possono vivere in

gruppi, ad esempio nei canili o nei rifugi, o essere isolati come i cani di proprietà, che però a loro volta sono esposti ad ambienti potenzialmente contaminati. È infatti spesso consigliato ai proprietari dei cuccioli di non far uscire il proprio animale, o almeno di non portarlo nelle zone più frequentate da altri animali, come parchi o aree riservate ai cani, per i primi mesi o fino alle prime vaccinazioni (Sykes, 2013).

L'elevata e prolungata resistenza ambientale di CPV rende complicate le procedure di disinfezione, dato che la contaminazione degli ambienti può avvenire anche ad opera dell'uomo e non necessariamente solo dell'animale infetto. Nelle strutture che ospitano molti cani deve essere eseguita anche una meticolosa disinfestazione da roditori e insetti, che possono agire come vettori nella disseminazione del virus (Sykes, 2013). La disinfezione deve essere effettuata accuratamente, con prodotti e tempi di azione adeguati: l'ipoclorito di sodio (in diluizione 1:32), ad esempio, può essere utilizzato sulle superfici, sulle calzature o sugli indumenti e dev'essere lasciato agire a lungo (Goddard and Leisewitz, 2010).

In genere nei canili e negli ospedali devono essere previste delle zone di quarantena e di isolamento, in cui ospitare gli animali in ingresso per un periodo di osservazione o in caso di patologia conclamata (Crawford and Sellon, 2010). La strategia di prevenzione più efficace resta comunque la vaccinazione, che può difendere il singolo individuo, limitare lo *shedding* e quindi la contaminazione ambientale, riducendo il rischio di esposizione al virus per gli altri animali.

1.4.3 Vaccinazione

La vaccinazione nei confronti di CPV è apparsa immediatamente prioritaria e, per arginare l'epidemia, si è fatto inizialmente ricorso ai vaccini inattivati per la panleucopenia felina già disponibili. I vaccini per FPV sono stati utilizzati nell'attesa di vaccini specifici per CPV, ma non si sono dimostrati totalmente efficaci, promuovendo una risposta anticorpale non duratura e solo a livello sistemico, senza la produzione di coproanticorpi (Rice et al., 1982).

Successivamente sono stati sviluppati diversi vaccini, sia inattivati, sia attenuati, adatti quindi rispettivamente all'immunizzazione durante la gestazione e del cucciolo (Johnson et al., 1983). Generalmente i vaccini attenuati sono più utilizzati, poiché garantiscono una durata dell'immunità (*duration of immunity*, DOI) superiore a quella promossa dai vaccini inattivati (Carmicheal, 1999), data la prolungata memoria delle cellule B (Schultz, 2006). I vaccini più diffusi sono basati sulla variante originale CPV-2 e sulla variante 2b (Decaro and Buonavoglia, 2012). L'eterogeneità del virus in circolazione e le regioni epitopiche chiave in cui questa si concretizza, hanno sollevato il problema di una scarsa cross-protezione tra la variante antigenica presente nel vaccino e il ceppo *wild-type* responsabile dell'infezione, alla base dei frequenti insuccessi vaccinali riscontrati (Truyen, 2006; Miranda and Thompson, 2016b). Sono stati effettuati numerosi studi per valutare la cross-protezione

tra i vaccini più utilizzati e le diverse varianti anticorpali (Yule et al., 1997; Larson and Schultz, 2008; Spibey et al., 2008; Wilson et al., 2014; Hernández-Blanco and Catala-López, 2015), con risultati rincuoranti sia per quanto riguarda la protezione garantita dal virus originale CPV-2 nei confronti delle nuove varianti 2a, 2b e 2c, sia per la protezione fornita dalla variante 2b nei confronti delle altre, inclusa la variante 2c, ritenuta parzialmente più virulenta o in grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite. Attraverso infezioni sperimentali sono state evidenziate solamente delle differenze nel titolo anticorpale stimolato, con un titolo omologo maggiore rispetto a quello promosso nei confronti di una variante eterologa (Pratelli et al., 2001), ottenendo comunque un livello proteggente (Wilson et al., 2014).

La variabilità di CPV non permette di escludere la possibilità che in futuro emergano varianti in grado di eludere la risposta immunitaria, ma finora la scelta del ceppo utilizzato nei vaccini non appare associata a una protezione insufficiente. La ragione degli insuccessi vaccinali è da ricercare piuttosto nelle modalità e nel *timing* della somministrazione, infatti età dell'animale e interferenza dell'immunità materna sono i fattori più importanti da considerare (Altman et al., 2017). La prolungata persistenza degli MDA rende complessa la valutazione della finestra temporale più adeguata per la vaccinazione. Anche titoli molto bassi di anticorpi materni sono in grado di complessare l'antigene vaccinale, impedendo la sierconversione nel cucciolo (Gooding and Robinson, 1982) ed esponendolo comunque al rischio di infezione (De Cramer et al., 2011).

Sono state prese in considerazione alcune opzioni per ovviare alla problematica degli anticorpi materni, come ad esempio l'utilizzo di vaccini con titoli virali molto elevati in somministrazioni precoci in grado di prevalere sugli MDA e stimolare la sierconversione (De Cramer et al., 2011), oppure la somministrazione intranasale (Martella et al., 2005a), senza però risolvere completamente il problema (Buonavoglia et al., 1994). Le linee guida proposte dalla World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) (Day et al., 2016) prevedono l'inserimento della vaccinazione contro CPV tra le vaccinazioni "*core*", ovvero basilari e indispensabili poiché le infezioni da cui proteggono sono molto gravi, con un potenziale zoonotico o un'elevata prevalenza e capacità di trasmissione (Gaskell et al., 2006), mentre le vaccinazioni "*non-core*" sono suggerite sulla base della realtà epidemiologica locale o sullo stile di vita dell'animale e del proprietario (Day et al., 2016). La vaccinazione contro la parvovirosi deve essere quindi effettuata nel cucciolo con vaccini attenuati a partire da 8-9 settimane di età, con richiami ogni 3-4 settimane, fino a 14-16 settimane e una somministrazione successiva a 1 anno, mentre nell'adulto possono essere sufficienti due somministrazioni effettuate a distanza di 3-4 settimane (Day et al., 2016). La vaccinazione produce un rialzo anticorpale negli animali già sieropositivi, previene lo *shedding* (Yule et al., 1997), la comparsa dei sintomi e la viremia. Inoltre, qualora la sierconversione avvenga adeguatamente, l'immunità permane fino a tre anni, sia in condizioni sperimentali (Carmichael et al., 1983; Gore et al., 2005), sia in animali di proprietà (Larson

and Schultz, 2007), rendendo così superfluo il richiamo annuale e permettendo la somministrazione più oculata dei vaccini dopo un monitoraggio e solo in corrispondenza di un reale calo anticorpale.

1.4.4 Terapia

In caso di parvovirosi non è prevista un'azione mirata nei confronti del virus, ma si procede generalmente con una tempestiva e aggressiva terapia di supporto (Prittie, 2004). A seconda della gravità del caso, il paziente può essere trattato a casa dal proprietario, oppure ospedalizzato, scelta più indicata per gli animali in condizioni critiche.

In caso di vomito, diarrea e shock ipovolemico, è necessario iniziare la somministrazione di fluidi, con un corretto bilanciamento elettrolitico e osmotico (es. Ringer lattato®), preferibilmente per via endovenosa o intraossea, in caso di pazienti molto piccoli o in grave stato di ipoperfusione (Goddard and Leisewitz, 2010). Il trattamento a domicilio con la somministrazione sottocutanea di fluidi può rallentare la ripresa del paziente e predisporlo a infezioni secondarie (Prittie, 2004). Una volta ristabilita la volemia, è necessario monitorare il bilancio elettrolitico e osmotico del paziente, per bilanciare la fluidoterapia in caso di ipokalemia, dovuta a vomito e diarrea, o ipoglicemia, per il digiuno o la cachessia in casi gravi, oppure per aggiungere i colloidali, per riequilibrare il consumo e le perdite enteriche di proteine.

Il ricorso a trasfusioni è raro in corso di parvovirosi, se non in casi gravi di anemia da diarrea emorragica, mentre talvolta si fa ricorso al plasma, come fonte di albumina, immunoglobuline e fattori della coagulazione (Goddard and Leisewitz, 2010). La grave alterazione della mucosa intestinale predispone alla traslocazione batterica e al passaggio di endotossine nel sangue, perciò in molti casi si procede direttamente alla somministrazione di antibiotici, senza tenere però in considerazione l'alterazione della flora intestinale che deriva dal trattamento antibiotico, con possibili dismicrobismo e clostridiosi. Il trattamento antibiotico dovrebbe essere limitato ai casi che strettamente lo richiedono, con la somministrazione combinata di antibiotici β -lattamici e aminoglicosidi, o fluorochinoloni, per controllare gram negativi e batteri anaerobi, modulando però la posologia, tenendo in considerazione gli effetti nefrotossici o sullo sviluppo cartilagineo (Li and Humm, 2015). Per il trattamento sintomatico possono essere somministrati al paziente antiemetici centrali come metoclopramide e maropitant, o sia centrali sia periferici come ondansetron (Prittie, 2004). In caso di alterazione della motilità intestinale non sono indicati farmaci procinetici che potrebbero favorire l'insorgenza di patologie chirurgiche, come intussuscezioni.

L'incidenza di ulcere a seguito di parvovirosi non è elevata, ma nel trattamento della nausea e delle affezioni gastroenteriche sono comunemente utilizzati gli inibitori dei recettori H₂ come famotidina e ranitidina e gli inibitori di pompa protonica, come omeprazolo e pantoprazolo (Li and Humm, 2015). Altre sostanze meno utilizzate per motivi economici, sono l'interferone felino, che possiede

un'elevata attività antivirale e il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF, filgrastim), utilizzato in caso di neutropenia grave per aumentare il rilascio di neutrofili, ridurre il tempo di maturazione e stimolarne la produzione (Goddard and Leisewitz, 2010). Generalmente in corso di parvovirus si preferisce tenere a digiuno il paziente e non lasciare acqua a disposizione durante la fluidoterapia, data la manifestazione frequente del vomito tra i sintomi principali, al quale si possono aggiungere problematiche come polmoniti da aspirazione. Alcuni studi hanno però suggerito come l'alimentazione precoce tramite sondino nasoesofageo possa aiutare il recupero funzionale dell'intestino e clinico del paziente (Mohr et al., 2003).

1.5 Metodi bioinformatici

1.5.1 Filogenesi

La definizione delle relazioni di discendenza fra specie e organismi ha, da lungo tempo, ricoperto un ruolo di primaria importanza nelle scienze biologiche. L'utilizzo di caratteri fenotipici (morfologia, comportamento, ecc.) ha dominato questo campo fino alla scoperta del codice genetico, una svolta considerevole che ha permesso di includere tale informazione nella ricostruzione delle relazioni fra individui e taxa. Il genoma è particolarmente indicato a tale scopo, in quanto è l'elemento che più direttamente codifica l'informazione trasmessa fra le generazioni. A questo vantaggio teorico, che fornisce una giustificazione "biologica" al suo utilizzo, se ne aggiungono altri di natura eminentemente pratica. In primo luogo, il numero di caratteri presi in esame è molto limitato (le 4 basi azotate di DNA e RNA) e facilita la codifica e trattazione dal punto di vista matematico e statistico, molto più di quanto non avvenga per la molteplicità e variabilità degli altri caratteri fenotipici. Inoltre, permette l'analisi di organismi con caratteri di tipo morfologico difficilmente osservabili e valutabili, microrganismi *in primis*. Infine, l'avanzamento delle tecnologie e dei metodi nel corso del tempo ha reso relativamente rapida e poco costosa l'acquisizione di queste nozioni (Olvera et al., 2010).

Non desta quindi stupore come, nell'ambito virologico affrontato in questa tesi, lo studio del genoma virale (o di parte di esso) rappresenti la strategia più valida per confrontare stipti diversi, studiarne le relazioni e valutarne l'evoluzione.

Sebbene vari approcci metodologici siano stati proposti per lo studio di questi fenomeni, la costruzione di alberi filogenetici è probabilmente il più comune, sia per la quantità di informazione che apporta, sia per la facilità di interpretazione e il robusto background statistico sviluppato nel corso del tempo. L'elemento alla base di ogni albero filogenetico è, in termini generali, il confronto fra sequenze omologhe, ossia originate da un antenato comune. Dopodiché, le possibilità di analisi e la complessità del modello utilizzato possono variare enormemente.

L'approccio più semplice consiste nell'utilizzo della *p-distance*, ossia della percentuale di differenza fra sequenze di DNA allineate. Il maggior limite di questa misura è rappresentato dal rilievo delle sole sostituzioni nucleotidiche osservate, tralasciando tutti i precedenti eventi di sostituzione multipla avvenuti nel medesimo sito (Strimmer and von Haeseler, 2009). Tale misura tende quindi a rappresentare la relazione attuale fra diversi organismi, piuttosto che a ricostruirne i rapporti di discendenza e l'evoluzione.

È stato inoltre dimostrato come non tutte le sostituzioni avvengano con la stessa frequenza. Possono infatti sussistere differenze nel tasso di sostituzioni fra transizioni, trasversioni e anche fra singole coppie di basi. Diversi siti nel genoma possono dimostrare una diversa tendenza al cambiamento

come, nel caso dei virus, regioni codificanti epitopi sottoposti a pressione immunitaria rispetto a regioni codificanti per siti attivi enzimatici. Altro esempio calzante è rappresentato dalle diverse posizioni nei codoni, che presentano un tasso di sostituzione differenziale, spesso di gran lunga superiore per il nucleotide in terza posizione rispetto a quello in prima, e ancor più in seconda posizione, incidendo sulla natura della sostituzione (Strimmer and von Haeseler, 2009).

Tutti questi parametri possono esser inclusi nella stima delle relazioni fra ceppi, potenzialmente aumentandone l'accuratezza. È però necessario sottolineare come il numero e la tipologia di parametri inclusi nel modello debba tener conto della complessità del database (i.e. allineamento di sequenze) con cui si lavora. In effetti, l'inclusione di parametri addizionali porta, per definizione, a un miglioramento della capacità del modello di interpretare i dati, in quanto viene fornita una maggiore "plasticità" di adattamento ai valori osservati. Tuttavia, il rischio associato è di modellare il rumore di fondo, l'errore random, legato alla variabilità individuale di ciascun virus, piuttosto che il sottostante fenomeno biologico (Posada, 2009). Utilizzare un numero eccessivo di parametri per allineamenti relativamente semplici potrebbe, in altre parole, comportare un *overfitting* del modello stesso.

Al fine di selezionare il modello di sostituzione più adeguato è possibile ricorrere a degli indici statistici quali *Akaike Information Criterion* (AIC) (Akaike, 1974) o *Bayesian Information Criterion* (BIC) (Schwarz, 1978). Questi, a lato di alcune differenze nel calcolo matematico, tengono conto della capacità del modello di "fittare" i dati, penalizzandolo però nel contempo per il numero di parametri e selezionando in questo modo il modello più parsimonioso, in grado di migliorare significativamente l'interpretazione del dataset, rispetto a modelli più semplici (Posada, 2008, 2009).

Il modello evolutivo selezionato può quindi essere utilizzato per il calcolo di distanze genetiche corrette che, a loro volta, possono direttamente essere impiegate per la ricostruzione di alberi filogenetici. Ad esempio, metodi come il *Neighbor-Joining* (NJ), che associa sequenze geneticamente simili o l'*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means* (UPGMA), che assume un tasso evolutivo costante lungo l'albero, sfruttano la distanza genetica come criterio per la ricostruzione delle relazioni fra sequenze (Hall, 2011).

Sebbene questi approcci siano molto rapidi, di facile interpretazione e spesso relativamente accurati, è innegabile che comportino una grande perdita di informazione. Tutta l'informazione contenuta nella sequenza viene infatti riassunta in un unico indice sintetico.

Altri metodi, come quello di *Maximum Likelihood* (ML), costruiscono un modello probabilistico che permette di utilizzare l'informazione presente in ciascuna posizione dell'allineamento. In estrema sintesi, la logica di questo approccio è la selezione dell'albero che, dato un certo modello evolutivo, meglio spieghi l'allineamento osservato (Schmidt and von Haeseler, 2009).

Uno dei limiti intrinseci di questi metodi è la necessità di interpretare e risolvere le relazioni fra sequenze, in termini di ramificazione di un albero (relazioni dicotomiche o limitate multicotomie), che

rappresentino la miglior spiegazione “consenso” dell'allineamento. Un primo problema è rappresentato dal fatto che alcune sequenze possono essere raggruppate semplicemente perché, fra le tante combinazioni, viene scelta quella migliore, senza che però vi sia un adeguato segnale che supporti il loro *clustering*.

Tradizionalmente, per valutare la robustezza delle *clade* e quindi la forza del segnale filogenetico a supporto di un particolare *cluster*, si ricorre a metodi di *bootstrap* (Efron et al., 1996). Questi consistono nel campionare con reinserimento le colonne dell'allineamento originale fino a costituire un nuovo dataset della stessa dimensione dell'originale, utilizzato per la ricostruzione di un albero filogenetico. In questo modo, alcune posizioni verranno incluse più volte nel nuovo allineamento, altre escluse. Tale processo viene generalmente ripetuto centinaia o migliaia di volte e viene infine valutata la concordanza fra le *clade* definite nell'albero originale con quelle ottenute tramite *bootstrap*.

Qualora il segnale filogenetico sia forte, diverse posizioni nell'allineamento contribuiscono nel determinare il *clustering* e, conseguentemente, le *clade* ottenute saranno le medesime indipendentemente dal campionamento (esitando in un alto valore del supporto di *bootstrap*). In caso contrario, il raggruppamento sarà molto eterogeneo fra i diversi dataset, in quanto determinato dalla casuale campionamento di specifiche posizioni (portando a un basso supporto di *bootstrap*). Sfortunatamente, queste metodiche risultano molto dispendiose in termini computazionali, ostacolandone l'applicazione a grandi allineamenti.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati degli approcci alternativi, significativamente più rapidi, quali l'*approximate Likelihood-Ratio Test* (aLRT) (Anisimova et al., 2011), che consente di stimare il supporto di branca comparando la probabilità del modello, che prevede il raggruppamento effettivamente osservato nell'albero, con l'ipotesi nulla di assenza di *clustering*.

La rappresentazione delle relazioni fra organismi fornita dagli alberi filogenetici, rappresenta sicuramente una semplificazione della realtà, in quanto non tiene conto dei fenomeni di trasferimento laterale dell'informazione genetica. In effetti, sempre con maggior vigore, si sta affermando l'idea di *network of life*, in contrapposizione a quella di *tree of life* (Merhej and Raoult, 2012).

Nel caso dei virus, questo si manifesta essenzialmente attraverso eventi di riassortimento e ricombinazione. La presenza di sequenze ricombinanti in un allineamento può significativamente alterare la stima dei vari parametri del modello e portare a un'errata ricostruzione della filogenesi (Pond et al., 2006). La soluzione più comunemente adottata risiede nella rimozione delle sequenze ricombinanti o nell'analisi limitata ai tratti del genoma non interessati da questo fenomeno. Al fine di identificare i ceppi ricombinanti, gli stipiti parentali e i *breakpoint* di ricombinazione, sono stati proposti diversi metodi, spesso usati in combinazione per aumentare l'accuratezza. Senza spingersi in

tecnicismi, la maggior parte di questi si basa sull'analisi e sul confronto di diverse partizioni dell'allineamento, in modo da evidenziare incongruenze (in termini di distanza genetica, *clustering*, ecc.) fra queste (Martin et al., 2015).

Un approccio alternativo, più rispondente alla reticolazione che caratterizza le relazioni fra organismi, è l'uso di *network* filogenetici (Huson and Bryant, 2006). Sfortunatamente, la difficoltà nell'interpretazione di questi grafici e nella trattazione statistica ne ha fortemente limitato l'utilizzo. Tuttavia, nella molteplicità dei possibili approcci, alcuni possono risultare estremamente utili per rappresentare contestualmente le relazioni fra ceppi e i loro caratteri. Fra questi gli *haplotype network* sono particolarmente esemplificativi: permettono di aggregare diverse sequenze identiche (o con una soglia di identità definita) in aplotipi, le cui relazioni vengono rappresentate tramite un *network* costruito generalmente tramite un metodo di *Median Joining* (MJ), che combina algoritmi *minimum spanning tree*, che collegano direttamente le sequenze senza reticolazioni, con i principi della *Maximum Parsimony* (MP), ovvero la ricerca del percorso evolutivo più "breve" che prevede il minor numero di passaggi dall'antenato al discendente (Bandelt et al., 1999). Agli aplotipi così analizzati è possibile attribuire delle etichette, quali caratteri fenotipici, luogo o anno di campionamento, ecc., in modo da rappresentare graficamente l'associazione fra questi tratti e le caratteristiche genetiche.

1.5.2 Filodinamica

Come le relazioni fra ceppi nell'albero filogenetico sono determinate dalle caratteristiche genetiche/genomiche degli stessi, è altrettanto vero che diverse forze possono agire "modellando", più o meno direttamente, la variabilità del genoma virale.

Il campo della filodinamica virale si occupa essenzialmente dello studio di come fattori di tipo epidemiologico, immunologico e evolutivo agiscano nel determinare la filogenesi virale (Grenfell et al., 2004). Cambiando prospettiva, è quindi possibile utilizzare la topologia dell'albero, al fine di valutare il ruolo di queste componenti nell'evoluzione virale.

Una delle principali svolte in questo campo è stata l'applicazione della teoria della coalescenza (Kingman, 1982), la quale fornisce un legame, formalizzato statisticamente, fra parametri di popolazione e genealogia (codificata come albero filogenetico). In particolare, nella sua prima formulazione, tale teoria definiva i tempi in cui i diversi *lineage* mostravano un antenato comune in funzione della dimensione della popolazione (assumendone la panmissia) in esame.

Nel corso del tempo, sono state fatte molteplici estensioni alla teoria iniziale, permettendo una sempre maggiore aderenza alla realtà dei fenomeni biologici sottostanti. Per quanto concerne le popolazioni virali, una delle maggiori innovazioni è stata quella di poter introdurre nel modello sequenze eterocrone, ossia provenienti da organismi campionati in momenti temporalmente distinti

(Drummond et al., 2003). Tale punto è particolarmente rilevante per i virus a rapida evoluzione, per i quali l'accumularsi di mutazioni è osservabile "in tempo reale" (i.e. anni, mesi o addirittura giorni). Se anni di distanza nel campionamento rappresentano un intervallo di tempo del tutto trascurabile per gli organismi superiori, lo stesso non può dirsi per questi patogeni. Conseguentemente, localizzare con maggior precisione nel tempo l'origine delle sequenze permette una maggior accuratezza nella stima dell'origine degli antenati (*time to the Most Recent Common Ancestor*; TMRCA) e degli altri parametri di popolazione (Drummond et al., 2003). Il tasso di evoluzione viene sovente espresso in termini di sostituzioni*sito⁻¹*anno⁻¹.

Tale rappresentazione di fatto implica un progressivo accumulo delle mutazioni nel tempo, ipotesi che prende il nome di orologio molecolare (*molecular clock*). Inizialmente, i modelli presenti assumevano che il tasso evolutivo rimanesse costante nel tempo (*strict molecular clock*), presupposto difficilmente rispettato in molti scenari data la variabilità delle pressioni evolutive al mutare delle condizioni ambientali, ecologiche e della popolazione. Sono stati quindi proposti modelli che hanno "rilassato" questa ipotesi (*relaxed molecular clock*), ammettendo una variazione del tasso evolutivo nel corso del tempo (Drummond et al., 2006). Infatti, l'evoluzione degli organismi è condizionata da due grandi forze, il *genetic drift* (fluttuazioni stocastiche nella frequenza di mutazioni dovute a forme di campionamento casuale delle varianti generazione dopo generazione) e la selezione naturale (definibile come una forza deterministica che porta al maggior successo riproduttivo di individui più adattati a un particolare ambiente). In genere, si ritiene che la selezione naturale domini quando il prodotto fra *Effective population size* (N_e) (ovvero la dimensione della popolazione corrispondente a quella di una popolazione teorica di Fisher-Wright che guadagna o perde diversità genetica con il medesimo tasso della popolazione censo) e coefficiente di selezione (s) risulti molto maggiore di 1 ($N_e*s \gg 1$). Al contrario, in presenza di popolazioni di ridotte dimensioni, il *genetic drift* avrebbe un ruolo prioritario (Hartl and Clark, 1989). Durante il proprio ciclo replicativo, o almeno in parte di esso, i virus sono in grado di costituire popolazioni di enormi dimensioni, nelle quali è quindi facile prevedere una consistente azione della selezione naturale (Holmes, 2009). Sebbene queste forze agiscano essenzialmente sul fenotipo, la loro azione lascia un'impronta nel genoma che può essere studiata. In virtù della degenerazione del codice genetico, le mutazioni possono essere infatti distinte in due categorie, sinonimo e non-sinonimo. Nel primo caso, le mutazioni a livello genomico non esitano in un cambiamento a livello della sequenza proteica e sono conseguentemente considerate prive di effetto in termini di *fitness* (selezione neutrale). In verità, diversi studi hanno evidenziato come anche queste mutazioni possano avere un effetto sul successo dell'organismo, condizionando la presenza di strutture secondarie nel genoma/RNA, alterando il *codon bias*, influenzando l'efficienza di regioni promotrici e regolatorie (Holmes, 2009). Nonostante queste obiezioni, la semplificazione prima riportata viene spesso accettata perché facilita enormemente la trattazione matematica dello

studio delle pressioni selettive e, anche dal punto di vista biologico, appare sostanzialmente ragionevole.

Al contrario, le mutazioni non-sinonimo causano una variazione del profilo proteico che, in funzione degli aminoacidi e della regione coinvolta, possono avere un effetto positivo, negativo o neutrale sulla *fitness* virale. Se vantaggiose, queste mutazioni tenderanno a propagarsi ed essere fissate nella popolazione (selezione positiva, diversificante verso vari fenotipi o direzionale verso uno specifico aminoacido, frequente ad esempio nei siti epitopici), altrimenti verranno eliminate dalla selezione naturale (selezione negativa o purificante, tipica di regioni con importanti ruoli funzionali) (Murrell et al., 2012). Nello studio delle popolazioni, a livello genomico, questo si ripercuoterà, rispettivamente, in un eccesso di sostituzioni non-sinonimo o sinonimo rispetto a quelle attese sotto l'ipotesi di una selezione neutrale. Ciò giustifica l'ampio utilizzo dei metodi basati sull'analisi di queste sostituzioni (dN/dS) nello studio dell'azione, localizzazione e forza delle pressioni selettive (Tajima, 1989; Fay and Wu, 2000; Pond et al., 2005).

Un ulteriore assunto, scarsamente realistico, della formulazione iniziale della teoria della coalescenza, era rappresentato dall'imposizione di una popolazione costante nel tempo (Chikhi et al., 2010; Ho and Shapiro, 2011). Già scarsamente plausibile per gli organismi superiori, ciò risulta particolarmente fuorviante nel caso delle popolazioni virali, il cui andamento è stato dimostrato spesso altalenante e condizionato da molteplici fattori. Inizialmente si è cercato di ovviare a questo limite implementando delle funzioni parametriche (costante, esponenziale, logistica, ecc.), tuttavia, anche in questo caso l'assunto di partenza risulta particolarmente forte e spesso inadeguato. È evidente come l'imposizione di un modello inesatto comporti un bias rilevante nella stima di tutti gli altri parametri di interesse. Una svolta significativa si è avuta con lo sviluppo di vari modelli non-parametrici, facenti parte della famiglia degli *skyline plot* che, essendo privi di assunti *a priori*, sono in grado di stimare l'andamento e le oscillazioni della popolazione nel corso del tempo sulla base della topologia dell'albero filogenetico e, quindi, sulla base delle sequenze geniche (Drummond et al., 2005; Ho and Shapiro, 2011).

Appare a questo punto doverosa una precisazione, indispensabile per una corretta interpretazione dei risultati. Nei modelli attualmente utilizzati, la dimensione della popolazione (N_e) non può essere stimata indipendentemente ma solo come parametro composito, risultato del prodotto di N_e e intervallo fra le generazioni (t) (Rodrigo, 2009). Nel caso dei virus, l'intervallo fra generazioni è particolarmente difficile da definire e variabile nel tempo, pertanto il prodotto $N_e \cdot t$ può essere condizionato sia dalla prevalenza sia dall'incidenza della malattia (Frost and Volz, 2010). Sebbene $N_e \cdot t$ non possa quindi essere utilizzato per inferire direttamente la prevalenza dell'infezione, ne sono state più volte dimostrate l'adeguatezza e accuratezza nella ricostruzione delle dinamiche e dei trend della popolazione virale nel tempo (Ho and Shapiro, 2011).

Come forse si può intuire da questa breve trattazione, un'analisi sfaccettata dei dati richiede la stima di un ragguardevole numero di parametri, sia legati alla ricostruzione filogenetica sia ai parametri di popolazione. A ciascuna di queste stime è inevitabilmente associata una quota di errore che, data la dipendenza fra i parametri, può ripercuotersi negativamente sui risultati. Particolarmente grave in tal senso è l'incertezza filogenetica, ossia l'impossibilità di determinare con accuratezza le reali relazioni fra ceppi. Dato il ruolo fondante della genealogia nell'analisi, è facile intuire come errori in questa fase possano pregiudicare l'*outcome* finale. Dal punto di vista metodologico, questi problemi sono affrontati tramite un approccio basato sulla statistica bayesiana e sull'utilizzo di simulazioni *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC). L'inferenza bayesiana permette di definire la probabilità a posteriori dei vari componenti del modello (albero filogenetico, tMRCA, dimensioni della popolazione, tasso evolutivo, ecc.), a partire dal prodotto della probabilità a priori (che può quindi essere fornita dal ricercatore per "guidare" l'analisi qualora vi siano informazioni adeguate) per la *likelihood* (ossia la probabilità di ottenere l'allineamento in esame, dato un modello). In altri termini, la probabilità a posteriori viene definita da una combinazione di conoscenza a priori e dall'informazione contenuta dal dataset a disposizione (Drummond and Rambaut, 2009; Ronquist et al., 2009).

Dal punto di vista pratico, è improponibile analizzare la distribuzione di tutti i parametri in esame risolvendo il corrispondente integrale in termini matematici. Conseguentemente, si ricorre a una simulazione MCMC, lunga milioni di generazioni, nella quale i parametri di interesse vengono lievemente modificati e la probabilità a posteriori calcolata di volta in volta. Qualora la probabilità sia maggiore rispetto alla generazione precedente, i parametri vengono accettati e utilizzati come base di partenza per una nuova modifica; in caso contrario la nuova variazione avverrà a partire dai valori della generazione precedente. Tale algoritmo porta la simulazione a convergere verso i valori caratterizzati da una maggior probabilità, dato l'allineamento in esame. Questi valori, campionati a definiti intervalli di generazioni per evitare fenomeni di autocorrelazione, andranno a delineare la distribuzione a posteriori di un dato parametro (e.g. tasso evolutivo, dimensioni della popolazione, ecc.), che potrà poi essere rappresentato dal valore medio, mediano e dal 95% *Highest Posterior Density* (95HPD).

Probabilmente, il maggior vantaggio insito in questa strategia risiede nel fatto che la probabilità di ciascun parametro viene stimata in combinazione con l'intero *range* di variabilità degli altri parametri; si parla infatti di marginalizzazione della probabilità a posteriori (Ronquist et al., 2009). Ciò impone che nessun valore delle variabili incluse nell'analisi, filogenesi compresa, se considerato singolarmente, abbia un peso rilevante sul valore del parametro di interesse: è solo l'insieme di tutti i valori assunti dai diversi parametri lungo tutta la simulazione a condizionarne l'esito. In questo modo è possibile ridurre l'impatto dell'errore di stima dei parametri e dell'incertezza filogenetica (Sanmartín et al., 2008). Dopo aver escluso una prima fase di *burn-in*, in cui ancora sussiste una dipendenza dai

valori di partenza, l'adeguatezza della simulazione viene tipicamente valutata sulla base della convergenza dei valori, del loro *mixing* e dell'*Effective Sample Size* (ESS) (la dimensione campionaria dopo rimozione dei valori autocorrelati).

Per quanto concerne la ricostruzione degli alberi filogenetici, nel caso dell'inferenza bayesiana associata a MCMC, l'*output* consiste in migliaia di alberi stimati nel corso dell'analisi. Questi vengono aggregati generalmente mediante un approccio di *Maximum clade credibility*, che comporta la valutazione di tutti gli alberi e, sulla base di quante volte ogni *clade* è stata identificata nell'analisi, ne attribuisce un valore di probabilità a posteriori. L'albero filogenetico che massimizza la probabilità a posteriori complessiva viene quindi ricostruito.

Infine, una considerevole espansione delle potenzialità di questi metodi è rappresentata dall'integrazione della filogeografia nel *framework* Bayesiano sopra descritto (Lemey et al., 2009). Questo sviluppo permette di ricostruire la migrazione virale nel corso del tempo, valutandola e integrandola nella stima dei restanti parametri di popolazione, con tutti i vantaggi prima citati. Inoltre, l'utilizzo di approcci statistici avanzati, quali la *Bayesian Stochastic Search Variable Selection* (BSSVS) permette di testare statisticamente, tramite il calcolo del *Bayesian Factor* (BF), quali siano le vie di migrazione e *spreading* virale statisticamente significative fra tutte le combinazioni potenziali, permettendo di inferire i più rilevanti link epidemiologici fra stati (Lemey et al., 2009; Faria et al., 2011; Lo Presti et al., 2012).

2. Parte sperimentale

2.1 Scopo della tesi

L'interesse nei confronti di CPV è rimasto quasi immutato dalla sua comparsa fino ad oggi, come testimoniano le innumerevoli pubblicazioni in merito. Parte di quest'attenzione è sicuramente stimolata dalle modalità con cui i singoli casi sono gestiti e dall'effetto di crescente gravità e numerosità degli episodi clinici riportati, raramente circostanziati da dati di prevalenza e incidenza ottenute in modo sistematico.

L'elevata identità a livello genetico ha dirottato l'attenzione verso le differenze più evidenti tra i virus in circolazione, rappresentate fenotipicamente dai marker aminoacidici, trascurando gli aspetti genetici che invece possono racchiudere molte più informazioni riguardanti la variabilità del virus, le relazioni tra i virus circolanti e i percorsi che ne determinano il quadro epidemiologico, l'evoluzione e le dinamiche di popolazione.

Nello studio di un patogeno la cui storia è caratterizzata da una comparsa esplosiva e da un rapido ampliamento dello spettro d'ospite, l'approfondimento dell'epidemiologia molecolare e le considerazioni a essa collaterali sono strumenti fondamentali per il monitoraggio di CPV, per studiarne i pattern di circolazione in relazione alle connessioni globali e per prevedere la comparsa o la diffusione di virus con potenziali nuove caratteristiche di patogenicità.



Research paper

Molecular insight into Italian canine parvovirus heterogeneity and comparison with the worldwide scenario



Claudia Maria Tucciarone^{a,*}, Giovanni Franzo^a, Eva Mazzetto^a, Matteo Legnardi^a, Marco Caldin^b, Tommaso Furlanello^c, Mattia Cecchinato^a, Michele Drigo^a

^a Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), University of Padua, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, PD, Italy

^b "San Marco" Private Veterinary Clinic, Via dell'Industria 3, 35030 Veggiano, PD, Italy

^c "San Marco" Private Veterinary Laboratory, Via dell'Industria 3, 35030 Veggiano, PD, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Canine parvovirus
Italy
Molecular epidemiology
Haplotypes

ABSTRACT

Canine parvovirus is one of the most frequent pathogens of young dogs, causing severe clinical manifestations. Its phenotypic variability led to an antigenic-based classification into different variants, which have been reported worldwide. To update the Italian distribution of CPV, a molecular survey was performed on 100 geographically-annotated samples collected from 2008 to 2015 by full VP2 sequencing. All three antigenic variants (CPV-2a, 2b, 2c) were detected during the studied period, being CPV-2a the most prevalent (60%). Locally, CPV appeared widely distributed, without any regional or temporal clustering, demonstrating an outstanding and uncontrolled within-country viral spreading. The Italian sequences were also contextualized in the International scenario. The analysis of CPV worldwide molecular epidemiology highlighted the remarkable genetic heterogeneity of the circulating strains and their broad distribution. In fact, a frequent viral exchange among Countries, was proven both over short and long distances, involving haplotypes persisting through time. The reported information on viral dissemination patterns appears crucial for understanding the introduction routes of new variants or strains, which could complicate the epidemiological scenario, affect the disease patterns, show possible differential virulence and clinical relevance of emerging strains especially, and impair the vaccine efficacy.

1. Introduction

Canine parvovirus (CPV) appearance in the late 1970s can be considered somehow recent but, since then, the common encounter with this virus has heavily influenced both clinicians and researchers' activity. CPV is a small ssDNA virus responsible for an acute enteric disease targeting poorly immunized puppies and, less frequently, for a fatal myocarditis in new-borns (Goddard and Leisewitz, 2010). The viral genome possesses two open reading frames (ORF) coding for two non-structural (NS1–2) and two structural (VP1–2) proteins (Reed et al., 1988), which encode replication-associated and capsid proteins, respectively. Accordingly to the recently updated taxonomy, the *Parvoviridae* family is divided into *Densovirinae* and *Parvovirinae* subfamilies, with the latter encompassing seven genera including the *Protoparvovirus* one (Cotmore et al., 2014). This genus comprises the *Carnivore protoparvovirus 1* species (Cotmore et al., 2014) (replacing the old unique *Feline panleukopenia virus* species) (Decaro and Buonavoglia, 2012), which includes the viruses or virus variants *Mink enteritis virus*

(MEV), *Raccoon parvovirus* (RaPV), *Feline parvovirus* (FPV) and *Canine parvovirus* (CPV). The further classification of CPV is still based on the old nomenclature and its phenotypic features, acknowledging three antigenic variants, which replaced the original CPV-2 since 1981 (Parrish et al., 1991) and differ in the amino acid residue 426 (2a Asn, 2b Asp, 2c Glu) (Decaro and Buonavoglia, 2012). For clarity reasons, in this manuscript the commonly adopted nomenclature (CPV-2, 2a, 2b, 2c) will be used only when referring to the different antigenic variants. Nowadays, the sporadic detection of original CPV-2 could be imputable to the adoption of vaccines still based on this strain (Altman et al., 2017). The rapid emergence and diffusion of CPV and its variants raised major questions about the protection levels granted by the available vaccines and the accuracy of antibody-based diagnostic tests (Decaro and Buonavoglia, 2012). Differences in strain virulence were also suggested, nevertheless a significant association between viral heterogeneity and clinical impact has not consistently been proven (Markovich et al., 2012; Miranda and Thompson, 2016). Since the genetic distance within CPV is low (Parrish, 1995; Truyen et al., 1995)

* Corresponding author.

E-mail address: claudiamaria.tucciarone@phd.unipd.it (C.M. Tucciarone).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.021>

Received 27 June 2018; Received in revised form 27 August 2018; Accepted 19 September 2018

Available online 23 September 2018

1567-1348/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

and, despite some attempts (Li et al., 2017), does not allow the reliable definition of genotypes overlapping or replacing the antigenic classification, the sequencing of VP gene has been mainly used to indirectly investigate the protein sequence and amino acid variations, particularly in correspondence with major epitopes (Miranda and Thompson, 2016; Strassheim et al., 1994) or important regions for virus-host interactions (Ikeda et al., 2000). On the other hand, the genome encloses much more information on the viral history and evolution, as demonstrated by CPV codon bias evaluation (Franzo et al., 2017b), which revealed high host and tissue adaptation depending on the viral tropism and also an intermediate codon usage among CPV strains collected from wild hosts, supporting a wild species-mediated host jump from the cat to the dog. Moreover, CPV phylogeny can help retracing viral spreading patterns and strain relationships, linking the subsequent emergence of similar strains or variants in different parts of the world, such as at the beginning of CPV epidemic (Miranda and Thompson, 2016). As proven for other pathogens (Decaro et al., 2007a), the dispersal routes can be the direct consequences of local and international connections and their knowledge/understanding can aid both the retrospective interpretation of the current epidemiological scenario and, to a certain extent, the prediction of future virus emergence. For example, Italy has been crucial for CPV-related discoveries, with the first detection of variant 2c in 2000 (Cavalli et al., 2001), which has been then backdated to 1996 in Germany (Decaro et al., 2007b), and the detection of strains directly imported from other countries, such as Thailand (Mira et al., 2018), demonstrating the importance of a careful epidemiologic monitoring, together with a global comparison of the circulating strains and their evolutionary relationships. Unfortunately, data are scarce, discontinuous and poorly detailed. The Italian scenario is illustrative: despite being one of the countries with the highest number of published sequences, little information is available about the collection region, thus preventing the precise understanding of CPV intra-country epidemiological dynamics. To this purpose, an extended molecular survey was planned, exploring CPV epidemiological scenario over almost all Italian regions from 2008 to 2015 and further analyzing the relationship among Italian and foreign sequences and spreading patterns of this ubiquitous pathogen.

2. Materials and methods

2.1. Italian samples

CPV-positive samples from Italian owned dogs were sourced from the Laboratory of San Marco Clinic (Padua, Italy). Samples were delivered to the lab by other clinics for diagnostic purposes and tested by a semi-quantitative Real-time PCR in use at the clinic laboratory. Already extracted DNA samples, for which date and place of sampling were annotated, were selected from the archive of San Marco Clinic Lab aiming to achieve a broader coverage of time and territory.

2.2. Amplification and sequencing protocols

A PCR protocol for complete VP2 amplification was validated on serial ten-fold dilutions of Nobivac Puppy C. P. (strain C154, 10^7 TCID) (MSD Animal Health, Italy), as described by Pérez et al. (2014) with minor modifications. The assay was performed with Thermo Scientific™ Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase kit (Life Technologies Inc., Carlsbad, California) on TGradient Thermal Cycler (Biometra, Analytik Jena AG, Jena, Germany). Specificity and band intensity were assessed by 2% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified by enzymatic method using Applied Biosystems™ CleanSweep™ PCR Purification Reagent kit (Life Technologies Inc., Carlsbad, California) following the manufacturer's instructions. Sanger sequencing was performed at MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands). The full VP2 sequencing was performed using 4 different primers (VP1 Seq R2 5'-AAACTTTAGTGGTGGCTGAG-3' antisense;

VP1 Seq F2 5'-GGATTCTACGGGTACTTTC-3' sense; VP1 Seq F3 5'-AGGTGATGAATTTGCTACAGG-3' sense; VP1 Seq F4 5'-GCTACCAA CAGATCCAATTG-3' sense), specifically designed to obtain 4 overlapping sequences encompassing the whole VP2 region. Chromatogram quality was evaluated using FinchTV (<http://www.geospiza.com>) and consensus sequences were assembled with ChromasPro (ChromasPro Version 2.0.0, Technelysium Pty Ltd). Achieved sequences were aligned to a CPV VP2 reference sequence (Accession number FJ197826) in MEGA6 and trimmed to preserve only the 1755 bp long VP2 coding region.

2.3. International sequences and database creation

Full-VP2 available sequences obtained from dogs (*Canis lupus familiaris*) were downloaded from Genbank if host, date and place of sampling were recorded. These sequences were merged with the Italian ones and relative metadata were organized in a comprehensive database. All sequences were aligned at amino acid level and then back-translated to the original nucleotide sequence using TranslatorX (Abascal et al., 2010). Sequences with poor alignment, frameshift mutations and premature stop codons were removed from the alignment. The obtained dataset was scanned for recombination strain removal using RDP4 (Martin et al., 2015) and GARD (Kosakovsky Pond et al., 2006). RDP4 methods settings were adjusted according to the program manual. Only potential recombination events detected by > 2 methods with a significance value lower than 0.01 ($p < 0.01$) with Bonferroni correction were accepted. A separated sequence set including only Italian sequences was also created. Amino acid position 426 was used to classify the strains into the different antigenic variants.

2.4. Phylogenetic analysis

The relationships among considered strains were investigated by phylogenetic analysis. Particularly, a Maximum Likelihood phylogenetic tree was reconstructed using PhyML (Guindon et al., 2010), selecting as substitution model the one with the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) calculated using JmodelTest (Darriba et al., 2012). The clade monophyly robustness of the taxa subsets was estimated with the fast non-parametric version of the aLRT (Shimodaira-Hasegawa [SH]-aLRT), developed and implemented in PhyML 3.0 (Anisimova et al., 2006). A similar approach was applied to Italian sequences separately. A Median Joining phylogenetic network was reconstructed using Network 5.0.0.3 (Fluxus Technology Ltd) to graphically evaluate the geographic distribution patterns. For clarity reasons, sequences with < 5 nucleotide differences were collapsed into a single haplotype.

3. Results

3.1. Italian samples

Three hundred thirty seven CPV positive samples were present in the Clinic database covering a period from 2008 to 2015. One hundred samples were selected and sequenced to guarantee a fair number of sequences per year and also an adequate geographical coverage. Thirteen samples were collected in 2008, 14 in 2009 and 2011, 13 in 2010, 12 in 2012, 15 in 2013, 12 in 2014 and 7 in 2015 (Table 1). Almost all Italian regions were included in the study and the geographical distribution of the samples is reported in Table 1. Molise, Basilicata, Calabria and Aosta Valley were not represented, since no samples were received from these regions. The variant classification of the strains based on residue 426 revealed 60 2a-sequences, 29 2b and 11 2c, and their spatial and geographical distribution is reported in Table 1. The sequences obtained in this study were uploaded in Genbank with accession numbers MH491849-MH491948.

Table 1

Distribution over regions and time of sampling and classification of the strains obtained in this study. The three original CPV-2 strains are marked with an asterisk.

Regions	Year	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
		426 Residue								
Abruzzo	N (2a)			1						1
	D (2b)				1				1	2
Apulia	N (2a)				2		1			3
	D (2b)						1	1		2
Campania	D (2b)				1					1
Emilia Romagna	N (2a)		1	4		1	1			7
	D (2b)		1	1	1			1	1	5
Friuli-Venezia Giulia	E (2c)	1								1
	N (2a)	2		2		1				5
	E (2c)				1					1
Lazio	N (2a)	1				1				2
	D (2b)	1					1	2	1	5
Liguria	N (2a)				1					1
	87 M (2) ^a	1								1
Lombardy	N (2a)	3	1	1			2	1	2	10
	D (2b)		1	1						2
	E (2c)						1			1
	87 M (2) ^a	1					1			2
Marche	N (2a)						1			1
	E (2c)					1				1
Piedmont	D (2b)					1				1
	E (2c)		1							1
San Marino	N (2a)					1				1
	D (2b)				1					1
Sardinia	N (2a)					1				1
	D (2b)							1		1
Sicily	N (2a)					1		1		2
Tuscany	N (2a)	2			1					4
	D (2b)		3							3
	E (2c)				1					1
	N (2a)					1				1
Trentino-South Tyrol	N (2a)					1				1
Umbria	N (2a)			2	1					3
	D (2b)						1			1
Veneto	N (2a)	1	4	1	1	2	2	4		15
	D (2b)		1			1	1	1	1	5
	E (2c)		1		2		2			5
Total		13	14	13	14	12	15	12	7	100

^a Original CPV-2 strains.

3.2. International database

Seven-hundred twenty-seven previously published sequences were enrolled in the study, originating from 20 countries and covering a time-window between 1979 and 2015. These sequences were merged to the ones obtained in the present study, leading to a final database including 827 sequences. A summary of analysed sequences is reported in Supplementary Table S1.

3.3. Phylogenetic analysis

The phylogenetic tree (Supplementary Fig. S1) largely confirmed the separate clustering of original CPV-2 and CPV-2c antigenic variants. On the contrary, CPV-2a and 2b appeared intermingled. A certain geographical clustering was visible, in particular with an Asian clade with mainly 2a sequences from 2008 to 2015. The temporal structure, although present, was less clear since closely related sequences were detected in consecutive years. The sequences collected from Italy during this study appeared scattered along the tree, regardless of their 426 residue-based classification. One noteworthy exception was constituted by several Italian sequences classified as variant 2b and collected from 2008 to 2015, which were strictly grouped in one small clade.

The relationship among sequences was evaluated at local and worldwide levels by haplotype reconstruction and classification based on different features, such as geographical origin, year of sampling and antigenic variant. The Italian sequences were grouped into four major

haplotypes (Fig. 1a), including strains collected both from close and distant regions. Haplotype 1 (H1) gathered sequences from Abruzzo, Veneto, Emilia Romagna, Lazio, Tuscany and Sardinia; haplotype 2 (H2) from Veneto, Emilia Romagna, Lombardy, Friuli-Venezia Giulia, Liguria and Sicily; haplotype 3 (H3) from Emilia Romagna, Lombardy, Lazio, Umbria, Veneto, Tuscany and Sardinia; haplotype 4 (H4) from Veneto, Emilia Romagna, Lombardy, Friuli-Venezia Giulia, Tuscany, Marche and Piedmont. Smaller haplotypes were mainly constituted by sequences from only one region (Veneto, Trentino-South Tyrol, Lombardy, Liguria, Umbria, Tuscany, Emilia Romagna and San Marino Republic). The few original CPV-2 sequences were collected only from Liguria (2008) and Lombardy (2008, 2013) (Fig. 1 b-c), whereas CPV-2a was the most common variant with the wider distribution and variability (Fig. 1b).

More specifically, CPV-2a displayed the broader heterogeneity (average p-distance = 0.003, range = 0–0.009), with the two major haplotypes (H2 and H3) being part of secondary networks, which were detected in several geographic regions for the whole study duration (Fig. 1a-b-c). CPV-2b (average p-distance = 0.002, range = 0–0.007), although slightly less variable than CPV-2a, showed fair distribution and persistence, with different haplotypes (including H1) detected in different regions and time points (Fig. 1a-b-c). Finally, Italian CPV-2c strains were highly homogeneous and mainly part of a single big haplotype (H4) covering different regions and years from 2008 to 2013. Two additional smaller CPV-2c haplotypes of sequences collected from Veneto in 2011, likely descended from the major haplotype (Fig. 1a-b-c).

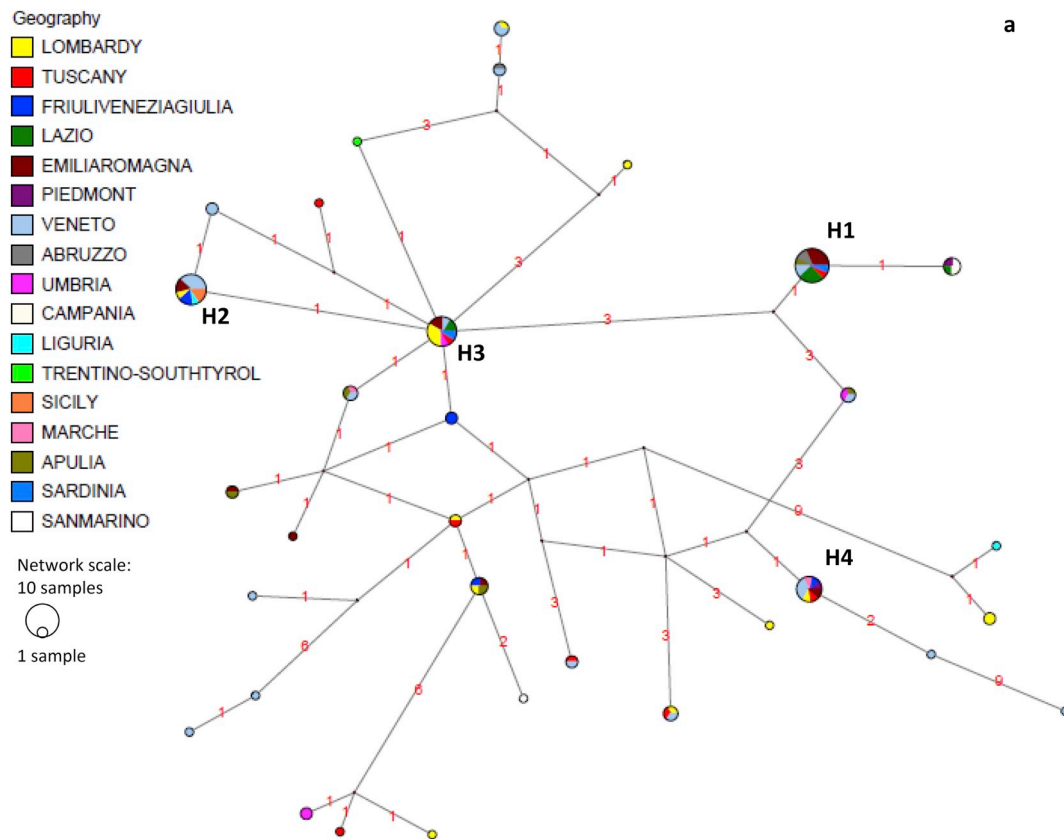


Fig. 1. Haplotype network of Italian CPV sequences obtained in this study. Median-joining (MJ) network was built using the Network 5.0.0.3 program. The circumference size is proportional to the sequence number, while the mutation number between haplotypes is reported along the branches. Geographical distribution, antigenic variant classification and year of sampling are represented in the different parts (a, b, c) of the figure. Sequences with < 5 nucleotide differences were collapsed into a single haplotype.

The worldwide scenario evidenced a partial separation of Western and Eastern strains, with major haplotypes including European (Italy, Croatia, Portugal, Spain, Germany, Hungary, Greece), American countries (USA, Uruguay) and Australia on one side (H1), and Asian countries (China, Thailand, India) on the other (H2) (Fig. 2a). Most of the Asian haplotypes seemed to originate from the Western ones and diverge on local bases. Remarkably, some smaller haplotypes were detected in really distant countries, like China and Uruguay (H3), Italy and China, or USA and China. Original CPV-2 sequences formed four small and separated haplotypes and were collected from Italy, China and USA before 1990 and then after 2000. CPV-2a resulted the most variable variant (average p-distance = 0.005, range = 0–0.023), with major Chinese haplotypes detected especially since 2010 and many minor and complexly linked ones in the Western part since 2000. In general, 2a and 2b variant haplotypes are interspersed, with the latter mainly represented by Italian and Chinese sequences (Fig. 2a, b, c). CPV-2c appeared the least genetic variable (average p-distance = 0.003, range = 0–0.015) but most geographically spread variant, with a large haplotype and closely-related minor ones circulating in many different Western countries.

4. Discussion

CPV Italian situation could be interpreted as a smaller-scale portrait of the global viral distribution and evolutionary relationship. In fact, CPV-2a appeared to be the predominant variant, stating its prevalence over the others during the studied period, both at local (Fig. 1b) and global level (Fig. 2b), followed by variant 2b. Despite the initial and sudden peak of detections (especially in Italy) (Cavalli et al., 2001), CPV-2c was the least frequently sequenced variant over the years. The

few recovered original CPV-2 strains appeared genetically distant from the other variants, but similar among themselves. Other original-CPV-2 detections are reported from different parts of the world (Europe, USA and Asia) (Fig. 2a-b) and periods (Fig. 2c), possibly reflecting the worldwide use of original CPV-2 strain-based vaccines. Other studies have reported a quite different scenario. For example, Purpari et al. (2018), reported a high CPV-2c prevalence (79.56%) in Sicily in absence of CPV-2b. On the other hand, a dominant presence of CPV-2b (64%) followed by CPV-2a and CPV-2c (Dei Giudici et al., 2017) was attested among sequences collected from Sardinia. These remarkable differences on local bases suggest either a certain within-country geographical clustering or other uncontrolled sources of bias in the sampling. The present study, dealing with samples collected from all over the country, should represent a more robust depiction of the Italian CPV-2 epidemiology. From a phylogenetic point of view, the phenotypic separation among the variants was not reflected in the tree topology. In fact, Italian 2a and 2b variants did not appear monophyletic (Fig. 1b), but interspersed with each other, as previously noted in other studies (Clegg et al., 2011), whereas only CPV-2c resulted in an independent clade.

Although extremely suggestive, the present results cannot be directly translated in a prevalence measure, because of the constraints of the sequence selection and conceivable bias due to the variable sequencing activity in different areas and over time. Additionally, because of the CPV-associated acute and severe manifestations and absence of routine monitoring activity, it can be expected that both Italian and worldwide sequences are mainly representative of separate clinical episodes. Therefore, it remains to be established whether the varying proportions of the antigenic variants are actually due to certain differences in prevalence or virulence.

Antigenic Variant

- CPV-2
- CPV-2A
- CPV-2B
- CPV-2C

Network scale:
10 samples



1 sample

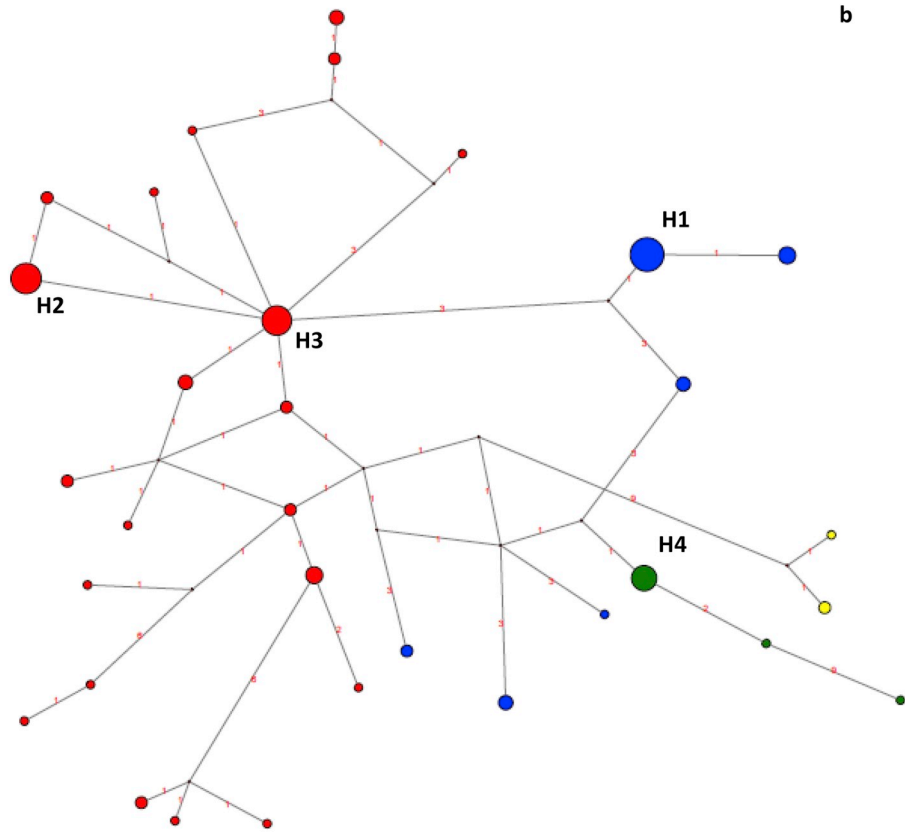


Fig. 1. (continued)

Year

- 2008
- 2009
- 2010
- 2013
- 2011
- 2012
- 2014
- 2015

Network scale:
10 samples



1 sample

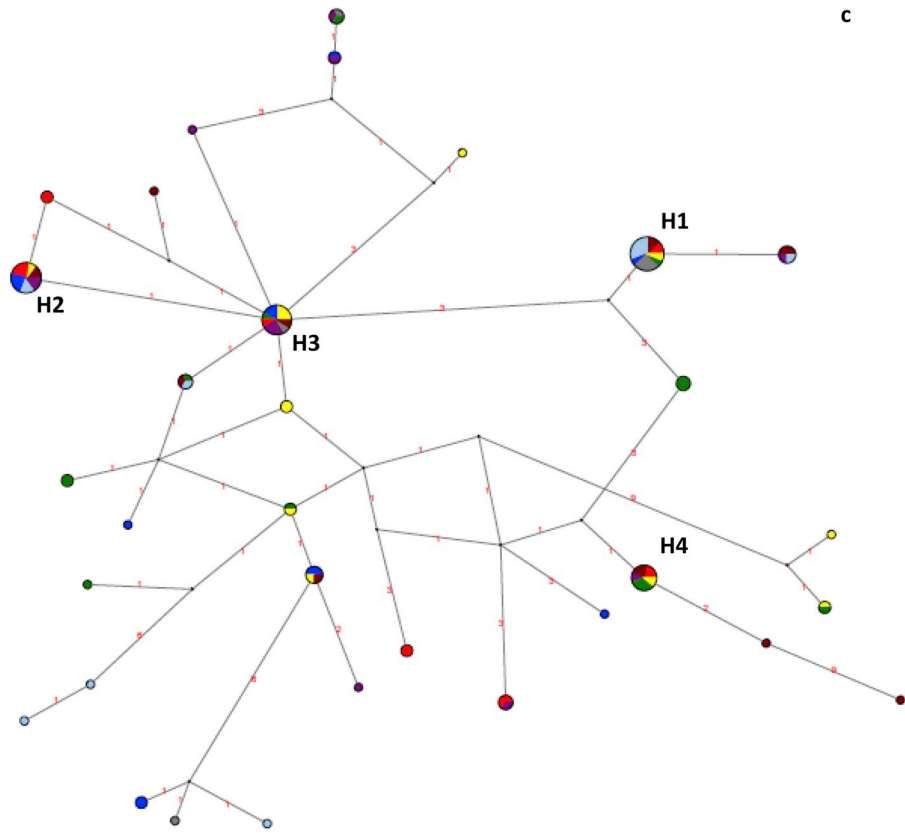


Fig. 1. (continued)

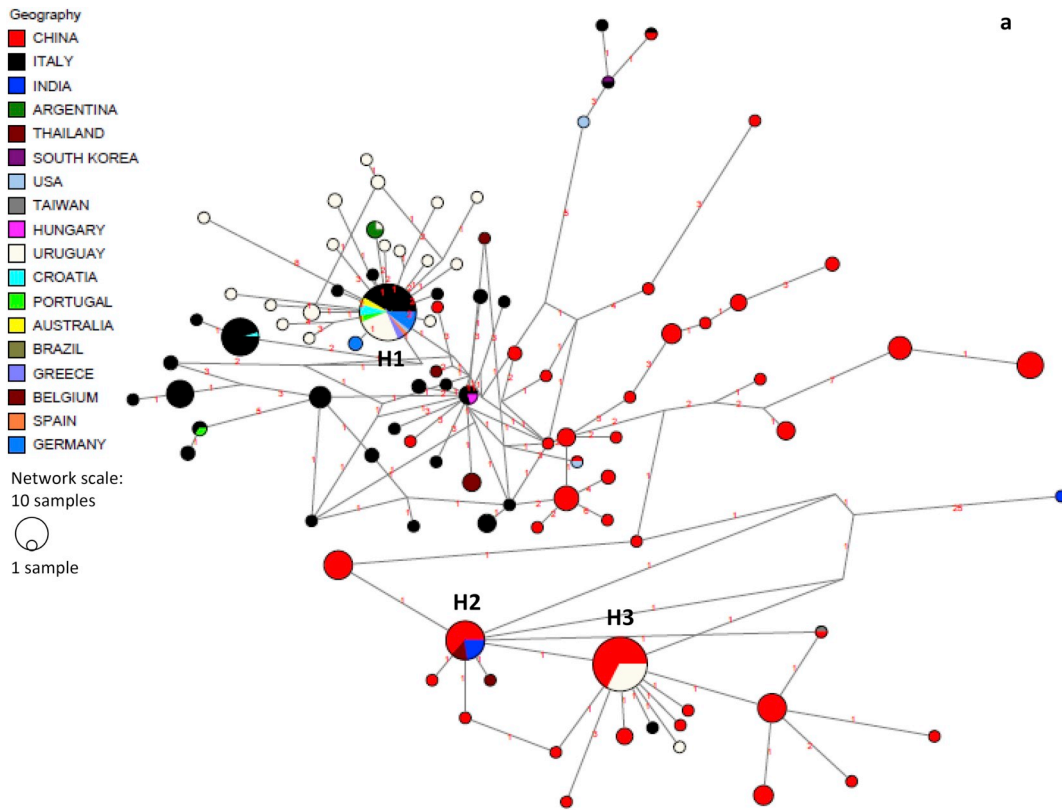


Fig. 2. Haplotype network of International CPV sequences enrolled in this study. Median-joining (MJ) network was built using the Network 5.0.0.3 program. The circumference size is proportional to the sequence number, while the mutation number between haplotypes is reported along the branches. Geographical distribution, antigenic variant classification and year of sampling are represented in the different parts (a, b, c) of the figure. Sequences with < 5 nucleotide differences were collapsed into a single haplotype.

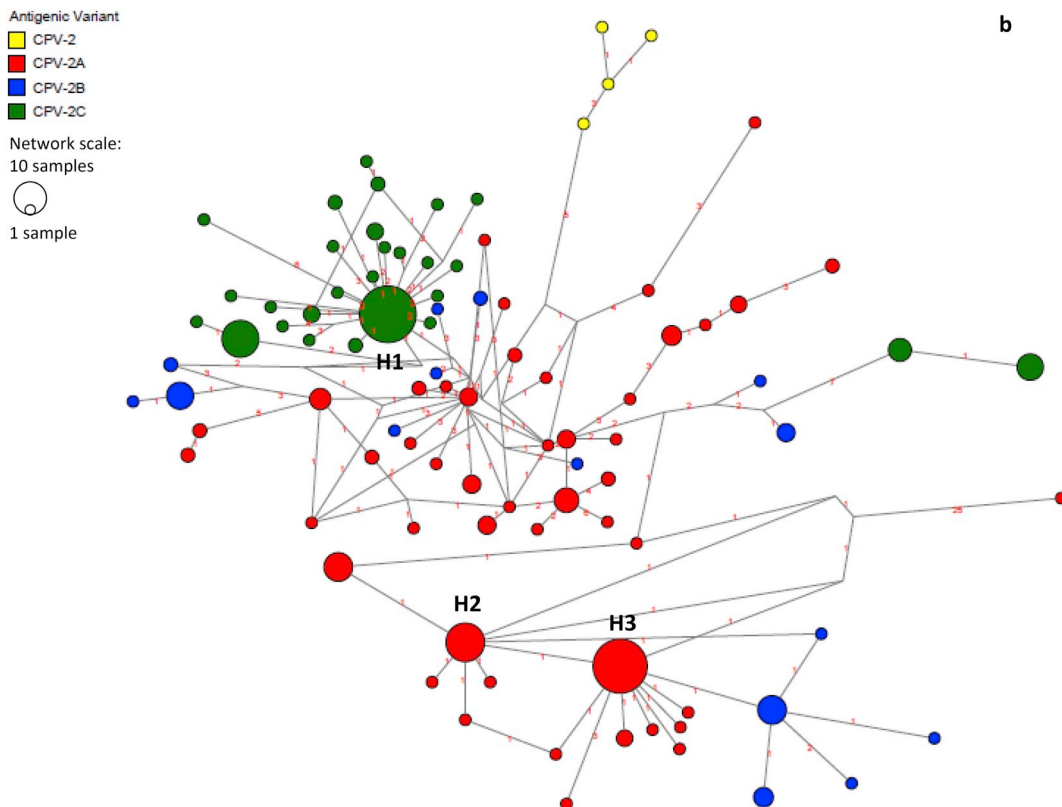


Fig. 2. (continued)

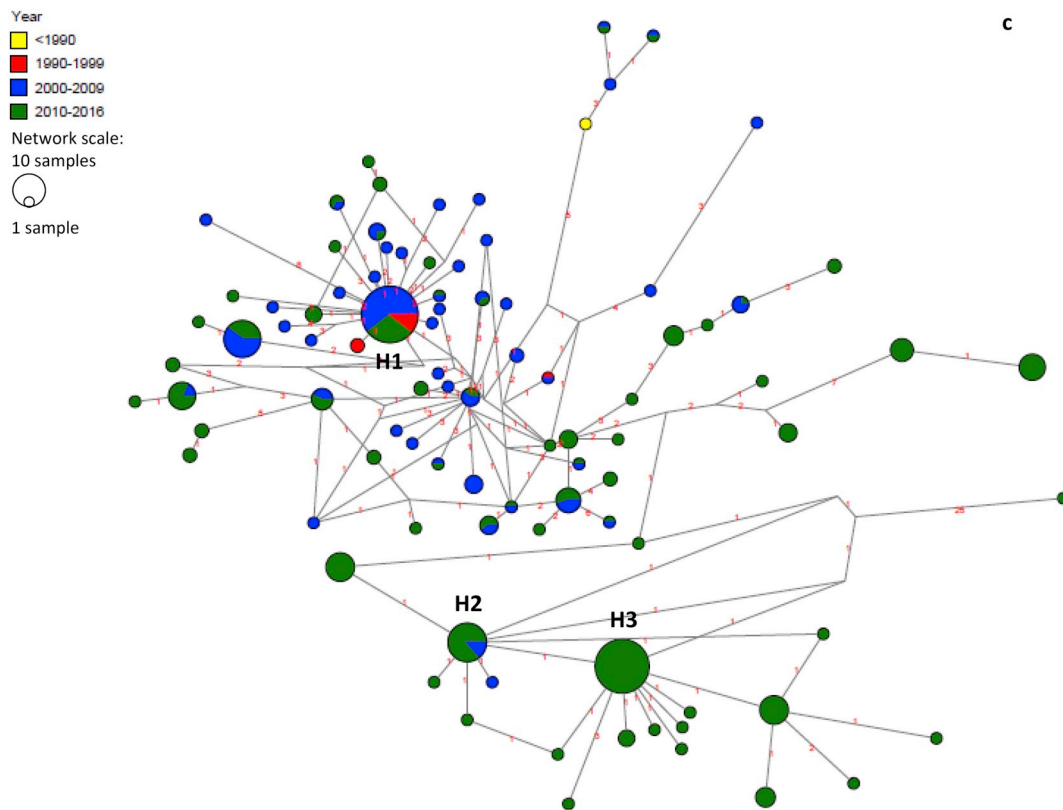


Fig. 2. (continued)

Apart from these unavoidable limitations, the acquisition of an unprecedented number of CPV sequences from Italy (Cavalli et al. (2001), Decaro et al. (2009) and the present study) provided a detailed picture of viral distribution and dispersal patterns in this country, which can be reasonably assumed as a model for broader epidemiological dynamics. Interestingly, the haplotype analysis demonstrated the presence of the same haplotype in different regions (Fig. 1a), suggesting that the Italian epidemiology is characterized by the remarkable circulation of CPV strains. The phylogenetic analysis showed the clustering of sequences collected during this study with previously-deposited Italian sequences (collected approximately between 1995 and 2013) (Cavalli et al., 2001; Decaro et al., 2009). The viral diffusion, coupled with the long lasting persistence of several haplotypes (Fig. 1c), sustains the different haplotype coexistence in the same region. This heterogeneity testifies an uncontrolled circulation of CPV within Italian borders, which could be the direct consequence of viral spread mediated by local connections.

Nowadays, a consistent movement of people, animals and fomites characterizes the global scenario, thus countries cannot be considered as non-communicating environments. Consequently, our study was not limited to Italy but aimed at the understanding of more general CPV spreading patterns. Surprisingly, a comparable situation can be observed on a global scale, with several haplotypes detected in multiple countries and the same country hosting several haplotypes, even belonging to diverse antigenic variants.

Frequent transmission events can be hypothesized between nearby countries, especially within Europe and, to a lesser extent, Asia. In fact, the same or closely related haplotypes were detected in several European countries. The lack of clear geographical patterns suggests the absence of effective barriers to viral spreading. The free circulation of people and companion animals within the European Union (EU) can likely increase the viral dispersal and mixing. Similar dynamics were observed in other continents, where closely related sequences have been identified in neighbouring States, like Argentina and Uruguay

(Calderón et al., 2011, 2015; Maya et al., 2013). In the US, a massive within-state dog flow for breeding reasons has already been correlated to other pathogens, such as *Brucella canis* (Brower et al., 2007). Additionally, illegal (and thus uncontrolled) dog trade is a well-known phenomenon, especially in Italy, where puppies arrive mainly from Eastern European countries (Martella et al., 2006). This could severely impact on pet population welfare and health, as demonstrated also during Italian outbreaks caused by Hungarian strains of canine adenovirus type 1 (CAV-1) (Decaro et al., 2007a, b). China appears to harbour high local variability as well (Fig. 2a), playing the leading role in CPV dissemination towards Southeast-Asian Countries (Fig. 2a, haplotype H2), and this phenomenon could be imputed to people, pet and stray dog circulation, dog trade and proximity with even more freely circulating wild carnivores.

As a matter of fact, the transmission between neighbouring countries, as well as within-country, could be mediated by wild species. These pathways can offer another puzzle-piece of the pathogen dispersal, since wild carnivores and dogs often share the same habitat and CPV is highly contagious, but especially because of its environmental persistence (Knobel et al., 2014) and the possibility for animals to act as vectors/carriers (Greene and Decaro, 2012), reaching more susceptible individuals.

Despite the fact that local contacts appear pivotal, relevant long distance transmission events were proven by the presence of strictly related sequences in different countries (Fig. 2a), likely reflecting the intercontinental connections among wealthier countries and trading, which had led rapidly to a panmictic viral population. Overall, CPV epidemiology could be featured by many introduction events mediated by global connections, travels and trading, then followed by local rooting and evolution, as reported for other livestock (*porcine circovirus 2*, PCV-2; *infectious bronchitis virus*, IBV) (Franzo et al., 2015, 2017a) and companion animal diseases (*canine adenovirus type 1*, CAV-1) (Decaro et al., 2007). As a matter of fact, more focused studies already allowed the source reconstruction of a new CPV strain introduction in

Italy (Mira et al., 2018). The importance of local evolution appears remarkable in different scenarios, such as in New Zealand, where one single introduction event seems the source of the entire viral population. In fact, Ohneiser et al. (2015) discovered a monophyletic group of locally evolving CPV-2a variants, without evidences of ongoing viral exchange with other countries. The monophyletic nature of New Zealand CPV-2a conflicts with what is observed for this variant in this and other studies (Clark et al., 2018; Grecco et al., 2018).

However, the actual evolutionary and clinical consequences of the coexistence of both imported and locally evolving viruses, remain to be elucidated. While clearly alarming, the evidences of the viral local and global evolution and dispersal demonstrate the effectiveness of accurate and updated molecular epidemiology studies to monitor CPV (and other viruses) distribution, in order to adopt adequate countermeasures. Unfortunately, it is undeniable that the limitations from the availability of Italian and international sequences could have introduced some biases. The lack of information from many countries, due to the absence of published or correctly annotated sequences or VP2 incomplete sequencing, which prevented the analytical comparison among not equivalent data, could have disguised some intermediate dissemination steps and the over-representation of the states involved in the study could have partially influenced the dispersal route picture. On the other hand, the higher sampling density achieved in some countries like Italy, China and Uruguay could have led to the detection of potentially low fitness strains (representing evolutionary and epidemiological dead-ends), causing an overestimation of viral genetic diversity compared to other countries. Nevertheless, the circulation of the same haplotype in different locations tends to confute the hypothesis of a low fitness. Similarly, the repeated detection through time of strains belonging even to minor haplotypes goes in the same direction. In particular, although a short period was covered by the Italian study, smaller haplotypes were identified in subsequent years, again confirming the prolonged presence of certain strains.

As a final note, the discrepancy between phenotypic (i.e. amino acids in specific sites) and phylogenetic classification could be due to a convergent evolution, instead of the common ancestry of the strains, in presence of comparable environmental conditions and selective pressures (e.g. dog population features, adopted control strategies, etc.). However, dedicated studies will be mandatory to properly elucidate the impact of different selective pressures on CPV evolution. Moreover, further attention should be paid to CPV molecular epidemiology in less investigated areas, where similar viral diffusion and variability are expected, filling the missing tiles in the pathogen dispersal picture.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.021>.

Funding

This work was supported by Department of Animal Medicine Production and Health (MAPS) (MAPS) (SID 2016 Project - Cecchinato, prot. BIRD169259), University of Padua.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M.J., 2010. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38, 7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>.
- Altman, K.D., Kelman, M., Ward, M.P., 2017. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Vet. Microbiol.* 210, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.019>.
- Anisimova, M., Gascuel, O., Sullivan, J., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>.
- Brower, A., Okwumabua, O., Massengill, C., Muenks, Q., Vanderloop, P., Duster, M., Homb, K., Kurth, K., 2007. Investigation of the spread of *Brucella canis* via the U.S. interstate dog trade. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 454–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.12.009>.
- Calderón, M.G., Romanutti, C., D'Antuono, A., Keller, L., Mattion, N., La Torre, J., 2011. 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. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.015>.
- Calderón, M.G., Romanutti, C., Wilda, M., D'Antuono, A., Keller, L., Giacomodonato, M.N., Mattion, N., La Torre, J., 2015. Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *J. Virol. Methods* 222, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.06.012>.
- Cavalli, A., Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, D., Pratelli, A., Decaro, N., Buonavoglia, C., Carmichael, L., Bozzo, G., Tempesta, M., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>.
- Clark, N.J., Seddon, J.M., Kyaw-Tanner, M., Al-Alawneh, J., Harper, G., McDonagh, P., Meers, J., 2018. Emergence of canine parvovirus subtype 2b (CPV-2b) infections in Australian dogs. *Infect. Genet. Evol.* 58, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.013>.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Parker, J., Dawson, S., Godsall, S.A., Pinchbeck, G., Cripps, P.J., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2011. Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic. *J. Virol.* 85, 7892–7899. <https://doi.org/10.1128/JVI.01576-10>.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Arch. Virol.* 159, 1239–1247. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>.
- Decaro, N., Campolo, M., Elia, G., Buonavoglia, D., Colaianni, M.L., Lorusso, A., Mari, V., Buonavoglia, C., 2007a. Infectious canine hepatitis: an “old” disease reemerging in Italy. *Res. Vet. Sci.* 83 (2), 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.009>.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007b. The study molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe. Emerg. Infect. Dis.* 13, 1222–1224. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070505>.
- Decaro, N., Desario, C., Parisi, A., Martella, V., Lorusso, A., Miccolupo, A., Mari, V., Colaianni, M.L., Cavalli, A., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology* 385, 5–10. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2008.12.016>.
- Dei Giudici, S., Cubeddu, T., Giagu, A., Sanna, G., Rocca, S., Oggiano, A., 2017. First molecular characterization of canine parvovirus strains in Sardinia, Italy. *Arch. Virol.* 162, 3481–3486. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3457-3>.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., Drigo, M., 2015. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect. Genet. Evol.* 32, 409–415.
- Franzo, G., Massi, P., Tucciarone, C.M., Barbieri, I., Tosi, G., Fiorentini, L., Ciccozzi, M., Lavazza, A., Cecchinato, M., Moreno, A., 2017a. Think globally, act locally: Phylogenetic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLoS One* 12, e0184401.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2017b. Canine parvovirus type 2 (CPV-2) and Feline panleukopenia virus (FPV) codon bias analysis reveals a progressive adaptation to the new niche after the host jump. *Mol. Phylogenet. Evol.* 114, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.05.019>.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine Parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>.
- Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A., Alfieri, A., Gallo Calderón, M., da Silva, A.P., Name, D., Aldaz, J., Calleros, L., Marandino, A., Tomás, G., Maya, L., Francia, L., Panzera, Y., Pérez, R., 2018. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol.* 4. <https://doi.org/10.1093/ve/vey011>.
- Greene, C.E., Decaro, N., 2012. Canine viral enteritis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Elsevier/Saunders, pp. 67–80.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Ikeida, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., Takahashi, E., 2000. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278, 13–19. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0653>.
- Knobel, D.L., Butler, J.R., Lembo, T., Critchlow, R., Gompper, M.E., 2014. *Dogs, Disease, and Wildlife*. In: *Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation*. Oxford University Press Oxford.
- Kosakovsky Pond, S.L., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096–3098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl474> pii).
- Li, G., Ji, S., Zhai, X., Zhang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhou, J., Su, S., 2017. Evolutionary and genetic analysis of the VP2 gene of canine parvovirus. *BMC Genomics* 18 (534). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3935-8>.
- Markovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 66–72. <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>.
- Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Blixenkron-Møller, M., Carmichael, L.E.,

- Buonavoglia, C., 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116, 301–309. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2006.04.019>.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>.
- Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., Sosa, K., Pérez, R., 2013. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158, 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1591-5>.
- Mira, F., Purpari, G., Lorusso, E., Di Bella, S., Gucciardi, F., Desario, C., Macaluso, G., Decaro, N., Guercio, A., 2018. Introduction of Asian canine parvovirus in Europe through dog importation. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 16–21. <https://doi.org/10.1111/tbed.12747>.
- Miranda, C., Thompson, G., 2016. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 97, 2043–2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>.
- Ohneiser, S.A., Hills, S.F., Cave, N.J., Passmore, D., Dunowska, M., 2015. Canine parvoviruses in New Zealand form a monophyletic group distinct from the viruses circulating in other parts of the world. *Vet. Microbiol.* 178, 190–200. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.05.017>.
- Parrish, C.R., 1995. Molecular epidemiology of parvoviruses. *Semin. Virol.* 6 (6) (Acad. Press, 1995).
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–6552.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N., Carrau, L., Hernández, M., Francia, L., Sosa, K., Tomás, G., Panzera, Y., 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One* 9, e111779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111779>.
- Purpari, G., Mira, F., Di Bella, S., Di Pietro, S., Giudice, E., Guercio, A., 2018. Investigation on canine parvovirus circulation in dogs from Sicily (Italy) by biomolecular assay. *Acta Vet. (Beograd)* 68 (1), 80–94.
- Reed, A.P., Jones, E.V., Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62, 266–276.
- Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198, 175–184. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1020>.
- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S.F., Obermaier, B., Veijalainen, P., Parrish, C.R., 1995. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69, 4702–4710.

2.3 Dinamica di popolazione

2.3.1 Materiali e metodi

2.3.1.1 Database mondiale

Per l'analisi della dinamica di popolazione è stato sfruttato il database di sequenze complete della proteina VP2 utilizzato per lo studio dell'epidemiologia molecolare di CPV in Italia, presentato nella precedente sezione. Il database era composto da sequenze mondiali, per le quali fossero correttamente annotati data, luogo di campionamento e ospite. Le sequenze sono state controllate qualitativamente, allineate e ispezionate per possibili eventi di ricombinazione, come descritto nel suddetto articolo.

2.3.1.2 Analisi con BEAST

Tramite i metodi basati sulla teoria della coalescenza implementati in BEAST 1.8.2 (Drummond et al., 2012) sono stati stimati il *time to the Most Recent Common Ancestor* (TMRCA), il tasso di sostituzione, la dinamica di popolazione e la filogeografia del virus. Per minimizzare i bias introdotti dalla differente disponibilità di sequenze e per valutare la robustezza del metodo, sono stati predisposti 10 dataset indipendenti costituiti da massimo 5 sequenze selezionate casualmente per ogni combinazione anno/stato. I modelli di sostituzione nucleotidica e orologio molecolare sono stati selezionati rispettivamente sulla base dei valori di *Bayesian Information Criterion* (BIC) calcolato con JmodelTest (Darriba et al., 2012) e del fattore bayesiano (BF), stimando la verosimiglianza marginale dei due metodi utilizzando *path sampling* (PS) e *stepping stones* (SS) (Baele et al., 2012). Per la ricostruzione della storia di popolazione è stato scelto il metodo Bayesian SkyGrid (Gill et al., 2013), che permette di stimare un valore composito ($Ne \cdot t$) rappresentativo del prodotto tra la dimensione effettiva della popolazione (Ne) e il tempo di generazione (t) (Ho and Shapiro, 2011). I pattern di dispersione virale nel tempo sono stati ricostruiti con un approccio filogeografico, che ha considerato ogni paese di provenienza delle sequenze come un carattere discreto (Lemey et al., 2009). Nello specifico è stato scelto un metodo di sostituzione asimmetrica con *Bayesian Stochastic Search Variable Selection* (BSSVS) (Lemey et al., 2009), che ha permesso di testare la significatività statistica dei pattern di migrazione con il calcolo del BF.

Sono stati estrapolati i parametri e l'albero ogni 10000 simulazioni *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) applicata 100 milioni di volte a ogni dataset indipendente. Il software Tracer1.6 (Rambaut and Drummond, 2013) è stato utilizzato per valutare convergenza, *mixing* ed *Estimated Sample Size* (ESS). La stima dei parametri è stata riassunta in media, mediana e 95% *Highest Posterior Density* (95HPD) dopo l'esclusione di un *burn-in* del 20% della fase iniziale della run. È stato ricostruito un

albero basato sul metodo *Maximum clade credibility* con il software Treeannotator (Drummond et al., 2012), mentre i pattern di migrazione e il grado di supporto sono stati calcolati con Spread3D (Bielejec et al., 2016).

2.3.2 Risultati

I tassi di sostituzione e le stime del TMRCA ottenuti dalle analisi con BEAST sui 10 subset sono risultati omogenei. Il tasso di sostituzione medio risulta di $3.19 \cdot 10^{-4} \text{ s} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{y}^{-1}$ (95HPD $2.50 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-4} \text{ s} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{y}^{-1}$), mentre l'origine di CPV è stata stimata nel 1970 (media 1970.89; 95HPD: 1962.00-1976.76) (Fig. 1).

Il trend della popolazione virale è stato delineato in modo sovrapponibile da tutte le 10 run effettuate, rappresentando una popolazione costante fino alla prima metà degli anni '70, in corrispondenza della scoperta di CPV e dei primi focolai (Fig. 2). Una prima espansione della popolazione può essere identificata fino al 1984, a cui fa seguito un periodo stazionario, prima di un secondo picco dagli anni '90 fino al 2000. Da allora si evidenziano delle fluttuazioni più rapide e meno marcate.

L'analisi del tasso di migrazione ha mostrato diversi percorsi di disseminazione (Fig. 3), supportati da quasi tutte le 10 run, con l'eccezione di alcune connessioni identificate da un numero minore di run: dall'Uruguay a Grecia (5 run), Belgio (3 run) e India (1 run); dalla Cina all'Uruguay (4 run); dall'Italia a Croazia (4 run) e Uruguay (4 run); dalla Corea del Sud all'Italia (3 run); dalla Thailandia all'Italia (1 run); dall'India al Portogallo (1 run); dal Portogallo a Croazia (1 run) e Australia (1 run).

A livello globale, questi risultati propongono quattro nuclei principali di scambio virale (Fig. 4), localizzati in quattro continenti, Europa, Asia, Nord e Sud America. Il flusso virale sembra partire dalla Cina verso stati vicini come India, Corea del Sud, Thailandia e Taiwan, ma percorre rotte più lunghe verso l'Europa e in particolare verso l'Italia. Dal nostro paese originano sia flussi diretti verso altri paesi europei (Portogallo, Germania, Croazia e Ungheria) con una disseminazione circoscritta, sia rotte più lunghe, verso il continente americano (USA, Argentina e Uruguay). Una tratta minore sembra originare dalla Cina verso il Sud America, in particolare verso l'Uruguay, mentre quella tra USA e Cina è fortemente supportata. Altre connessioni individuate dalle analisi collegano Argentina e Uruguay, Uruguay e stati europei come Grecia, Belgio e Spagna.

Figura 1: stima del *time to the Most Recent Common Ancestor* (TMRCA) e del tasso evolutivo di CPV.

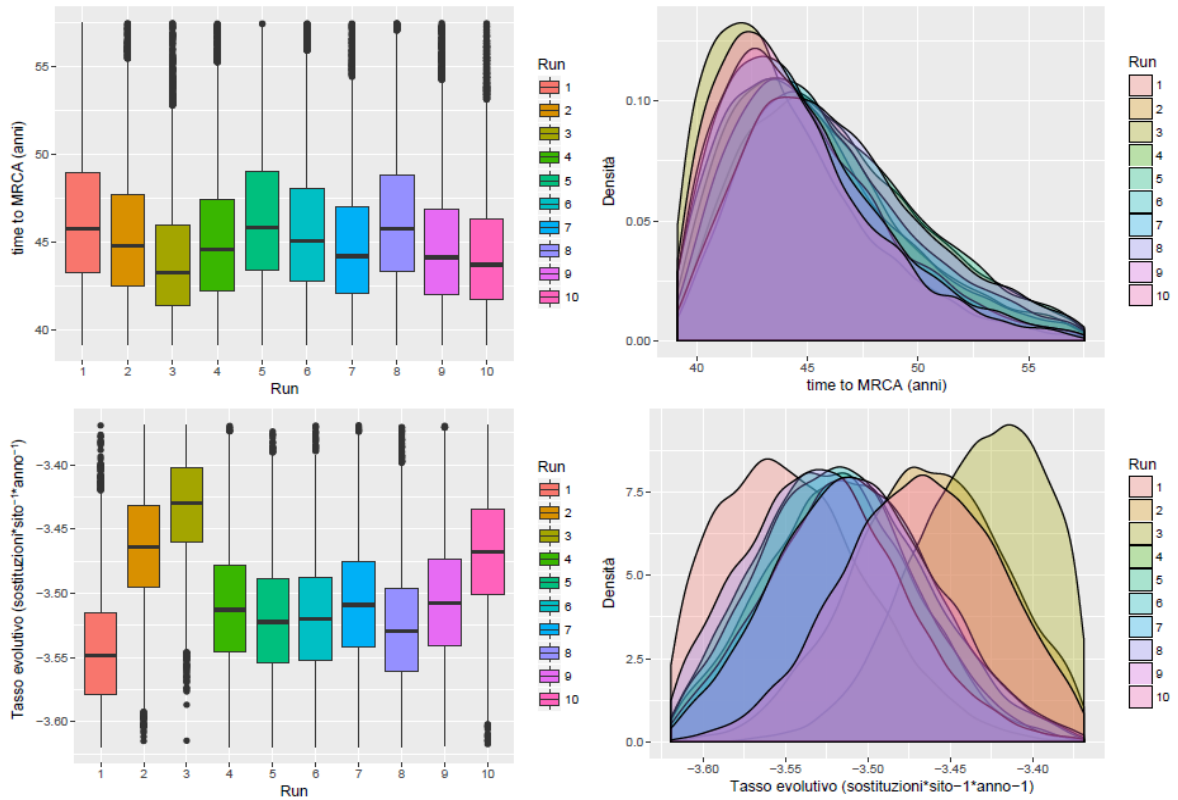


Figura 2: dinamica di popolazione di CPV.

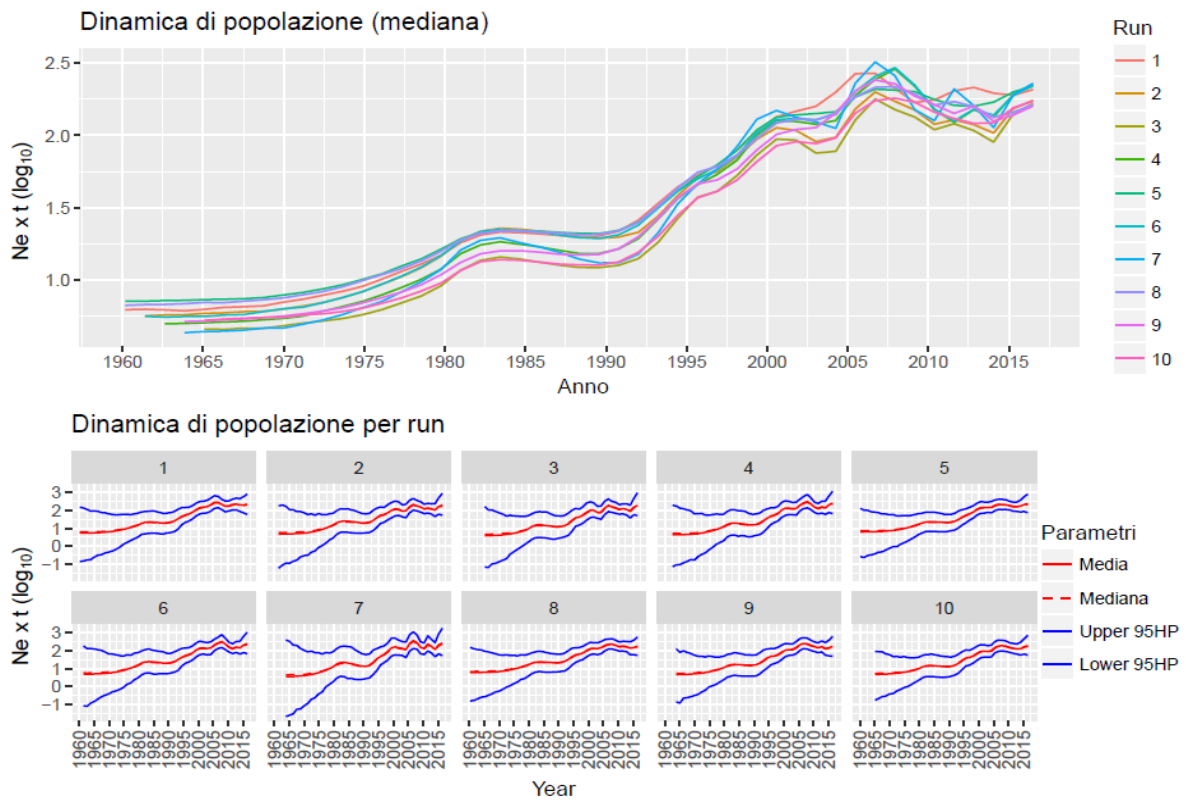


Figura 3: *network* dei flussi di migrazione di CPV con adeguato supporto statistico; i risultati delle diverse run sono rappresentati con i diversi colori.

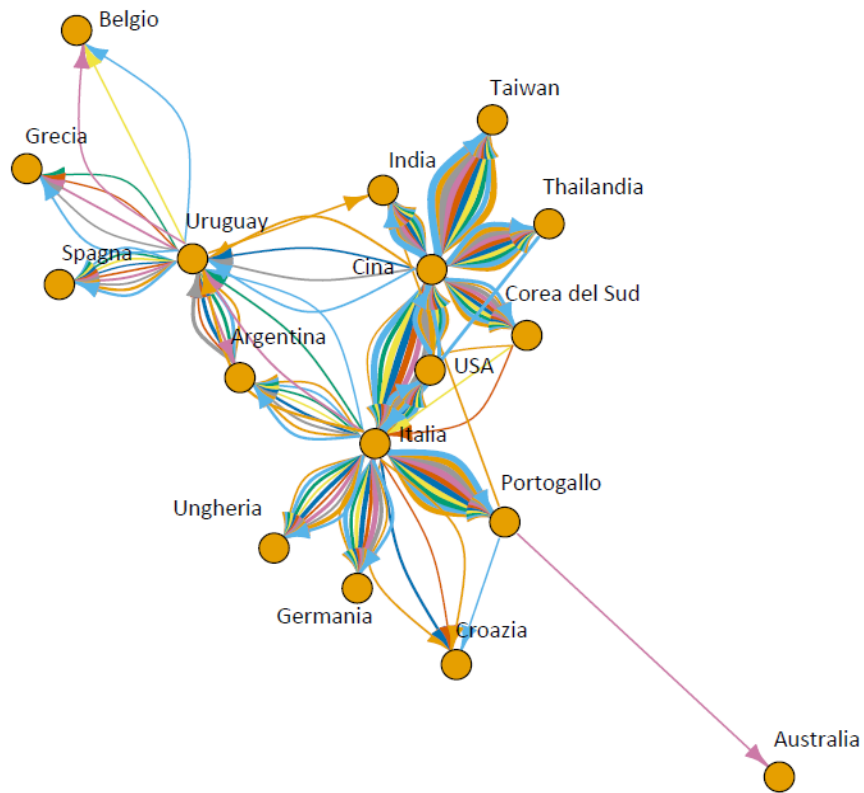
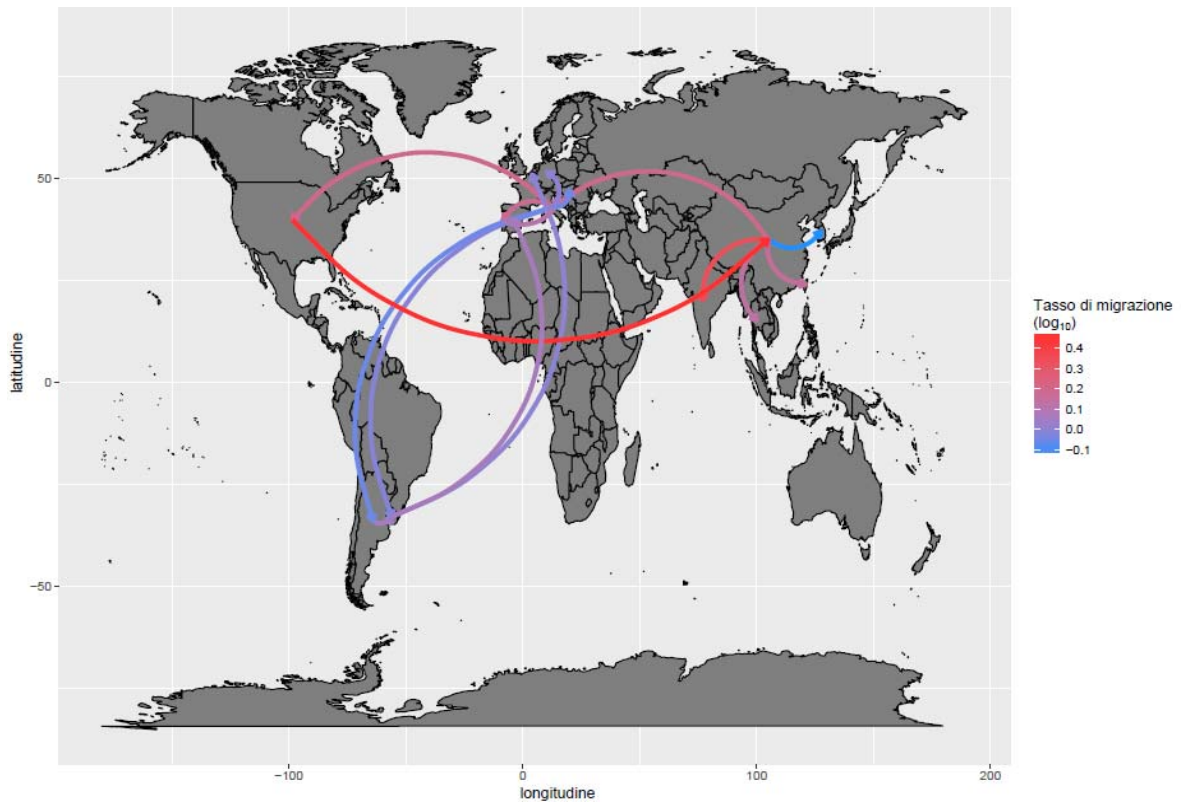


Figura 4: mappa dei flussi virali di CPV a livello globale.



2.3.3 Discussione

CPV è stato isolato per la prima volta nel 1978 (Appel et al., 1979a) ed è stato riconosciuto responsabile in breve tempo di una pandemia che ha colpito il cane, con elevate morbilità e mortalità, fino alla parziale tregua ottenuta grazie ai primi vaccini realmente efficaci.

L'origine di CPV è stata stimata nel 1970 (Fig. 1), qualche anno prima delle prime evidenze molecolari e sierologiche (Koptopoulos et al., 1986; Truyen et al., 1994b). Quel periodo sembra essere caratterizzato da una stabilità della popolazione virale, possibile riflesso del salto d'ospite, anche se per completare la fase di adattamento sarebbe stato più prevedibile osservare un tasso mutazionale maggiore per accelerare il processo (Hoelzer and Parrish, 2008). La *timeline* di CPV appare sovrapponibile all'andamento della dinamica di popolazione e la prima fase di espansione (Fig. 2) corrisponde alla comparsa e alla diffusione di CPV (Parrish et al., 1988c), rincarata dalla comparsa delle due varianti 2a e 2b tra il 1979 e 1984 (Parrish et al., 1991). Le due varianti si sono rapidamente diffuse e in breve tempo sono state identificate in tutto il mondo (Miranda and Thompson, 2016a), probabilmente anche grazie all'ampliamento dello spettro d'ospite con la ritrovata capacità di replicare nel gatto, garantita dalle mutazioni aminoacidiche che differenziano le varianti dal ceppo originale e sono implicate nelle interazioni virus-ospite. La dimensione della popolazione appare costante nella breve fase seguente (Fig. 2), come probabile effetto di un potenziale bilancio tra *fitness* virale e immunizzazione crescente della popolazione canina, per l'infezione naturale (Carmichael, 2005) e la vaccinazione introdotta nel 1979 (Hoelzer and Parrish, 2010), ipotesi confermata dal calo dei casi clinici riportato in letteratura (Carmichael, 2005). L'apparente quiescenza è seguita da un picco dell'espansione virale durante gli anni '90 (Fig. 2), che può essere considerata prodromica della variabilità rappresentata dalla variante 2c, riscontrata con grande frequenza dal 2000, anche in virtù di una possibile maggiore *fitness* di questa variante. Un recente studio (Grecco et al., 2018) della filodinamica di CPV descrive un andamento meno omogeneo, con due picchi molto marcati intorno al 1990 e al 2000, il primo da imputare alla comparsa di CPV-2c e il secondo alla sua introduzione e diffusione in Sud America. Lo scenario sudamericano è particolare in quanto sono state chiaramente rilevate delle variazioni nella frequenza delle diverse varianti, con l'ingresso di CPV-2c dall'Europa (Calderón et al., 2011; Aldaz et al., 2013) e identificato inizialmente in Argentina nel 2003 (Calderón et al., 2011), diventato via via il prevalente anche in Brasile (Streck et al., 2009), Ecuador (Aldaz et al., 2013) e Uruguay (Maya et al., 2013). In Uruguay però è stata evidenziata una successiva diffusione della variante 2a, di origine asiatica (Maya et al., 2013). Ciò testimonia la complessità delle relazioni fra ceppi, l'eterogeneità degli eventi introduttivi e della circolazione virale a livello locale, caratterizzata da un'interazione fra l'introduzione di virus derivanti da paesi limitrofi (Argentina) e lontani (Asia, Europa) e una parallela evoluzione locale di alcuni ceppi (Streck et al., 2009; Aldaz et al., 2013).

Grecco et al. (2018) esplorano le dinamiche di popolazione di CPV con particolare riguardo nei confronti della realtà sudamericana, estremamente influenzata dagli scambi intercontinentali, ma al contempo arricchita da una propria variabilità locale. L'importanza dello scenario sudamericano emerge infatti dai risultati dello studio, che sfrutta però un database ristretto, nel quale alcuni stati europei e sudamericani potrebbero essere sovrarappresentati, con un bias nella descrizione della variabilità del virus e un focus maggiore su particolari eventi introduttivi.

Il presente studio si avvale invece di un database più ampio e di una maggior rappresentatività della variabilità virale che, cumulativamente, può risentire meno di fasi di espansione o riduzione locale ed essere controbilanciata dalla crescita virale in altre regioni, restituendo un trend di graduale espansione globale. Ciononostante, i risultati dei due studi non appaiono in contraddizione, possono anzi essere considerati complessivamente concordi nel rilevare le principali fluttuazioni (1990-2005), che devono essere comunque interpretate all'interno degli intervalli di credibilità (95HPD).

In bibliografia è riportata l'identificazione di numerosi virus "mutanti", caratterizzati da differenze fenotipiche a livello di altri residui aminoacidici (Miranda and Thompson, 2016a), ma nessuno con persistenza simile alle varianti 2a, 2b e 2c. La compresenza di nuovi virus potrebbe spiegare le fluttuazioni che caratterizzano l'ultimo periodo del presente studio, dal 2000 al 2015, in cui la popolazione virale rimane entro gli stessi range (Fig. 2). Questa fase potrebbe inoltre essere stata modulata da diversi fattori che agiscono sulla popolazione virale, come l'utilizzo di vaccini analoghi a livello globale (Steinel et al., 1998), l'instaurarsi di un'immunità di popolazione omogenea, l'evoluzione locale, la selezione di ceppi con una particolare *fitness* e l'introduzione di nuovi virus (Mira et al., 2018b) in ambienti diversi, ad opera della circolazione di persone, animali e merci. Come è stato evidenziato per influenza A virus (Lemey et al., 2014) e altri patogeni (Cohen, 2000), la disseminazione virale può essere veicolata dal trasporto aereo e ciò permettere di spiegare i collegamenti a lungo raggio tra i quattro nuclei principali localizzati nei diversi continenti (Fig. 4). Sfortunatamente, molti passaggi intermedi nella disseminazione virale non sono ricostruibili, data la mancanza di sequenze campionate in un gran numero di paesi nei quali, per motivi economici o per l'approccio diagnostico, la conferma e la caratterizzazione di CPV avviene solo dal punto di vista qualitativo (Schmitz et al., 2009), oppure tramite MGB real time PCR (Decaro et al., 2006a, 2006b) o *short-sequencing* (Buonavoglia et al., 2001; Desario et al., 2005), non fornendo quindi l'informazione dell'intero gene necessaria per queste analisi. Ciononostante, è stato possibile ricostruire parzialmente i pattern di disseminazione a livello locale per Europa e Asia (Fig. 3). In Europa la sorgente di disseminazione virale sembra essere l'Italia, da dove partono numerosi flussi verso stati vicini, come Croazia e Germania e più distanti, come Ungheria e Portogallo. Curiosamente, altri stati come Spagna e Grecia sembrano ricevere flussi dal Sud America, dove CPV sembra essere giunto proprio dall'Italia. Questo quadro potrebbe essere influenzato da un bias dovuto alla

sovrarappresentazione di alcuni stati e al sottodimensionamento di altri ma, parallelamente, i legami tra i vari paesi potrebbero rispecchiare relazioni economiche e culturali preferenziali (Hoelzer et al., 2008b). Alcune di queste rotte di disseminazione virale sono state confermate anche in altri studi su CPV, in cui sono stati individuati pattern di disseminazione dagli USA alla Cina, dal Sud Europa e dall'Asia al Sud America (Grecco et al., 2018), tra USA ed Europa e a livello locale tra Cina e Sud-Est asiatico (Hoelzer et al., 2008b).

Il raggio di tali spostamenti non deve stupire, in quanto CPV è un virus estremamente resistente nell'ambiente, viene eliminato ad alti titoli e può essere trasportato per lunghe distanze da persone, animali, oggetti o su superfici, che agiscono da vettori (Hoelzer and Parrish, 2010; Wilkes et al., 2015). In uno scenario di globalizzazione, anche paesi molto distanti sono in stretto contatto, poiché probabilmente "avvicinati" mediante passaggi intermedi in lunghe tratte di disseminazione. Ad esempio, la Cina risulta la principale fonte di dispersione virale verso il Sud Est asiatico (Fig. 3), mediata dalla circolazione di animali domestici o selvatici, di persone e di merci, ma sono state individuate anche delle rotte di lunga distanza verso il Sud America (Maya et al., 2013), o verso l'Italia, come è stato svelato da Mira et al. (2018), in un caso clinico di un cucciolo importato dalla Thailandia. Sfortunatamente, come già accennato, non è stato possibile esplorare nel dettaglio tutte le regioni, infatti sono state incluse nello studio solo poche sequenze provenienti dall'Oceania, mancando al momento delle analisi altre sequenze complete di VP2. Gli studi provenienti da questa regione mettono in luce delle peculiarità nello scenario epidemiologico, probabilmente legate alle caratteristiche geografiche e culturali di questi due paesi, in parte più isolati e in grado di ospitare una popolazione virale protetta e con un'evoluzione propria. Ad esempio, in Australia, la variante 2b risulta caratterizzata da un tasso di mutazioni maggiore rispetto a CPV-2a e sembra avvantaggiata in un fenomeno di *replacement* simile a quanto visto inizialmente ad opera della variante 2a stessa (Clark et al., 2018). La popolazione neozelandese invece, appare isolata e monofiletica, originata da un solo evento introduttivo della variante 2a (Ohneiser et al., 2015).

Queste evidenze sottolineano come le dinamiche spazio-temporali dei patogeni siano strumenti indispensabili nello studio dell'evoluzione virale e dell'emergenza di nuovi virus. Ciò è particolarmente rilevante nel caso di CPV, data la comparsa e la diffusione in breve tempo di numerose varianti e, anche senza evidenti differenze, non possono essere escluse future conseguenze sulla clinica, sulla specificità dei test diagnostici o sulla tenuta dell'immunità vaccinale, dovute alla variabilità del virus. Al momento non ci sono evidenze di una mancata cross-protezione tra le varianti, i vaccini più usati sono ancora basati sul ceppo originale CPV-2 o sulla variante 2b (Decaro and Buonavoglia, 2012) e l'efficacia delle misure di profilassi è influenzata primariamente da altri fattori, come la presenza di anticorpi materni e il *timing* della vaccinazione. Per questo motivo, la semplice distinzione in varianti antigeniche basata sul solo residuo 426 potrebbe essere riduttiva e dovrebbero essere riposti

maggiori sforzi nel sequenziamento e nella diffusione delle informazioni sulla VP2, che permetterebbero di monitorare direttamente a livello globale le pressioni selettive e immunitarie, l'adattamento agli ospiti, la conquista di nuove nicchie biologiche come effetto della variabilità e delle dinamiche della popolazione virale.

3. Conclusioni

Questa tesi raccoglie due parti di uno studio nato dall'esigenza di un aggiornamento dello scenario epidemiologico italiano, storicamente fonte di novità nell'ambito della ricerca su CPV, sfociato poi in un imprescindibile confronto con il panorama internazionale. Le connessioni sempre più profonde e assidue tra le nazioni non si riflettono solo nella circolazione di persone e merci, con la parallela disseminazione dei patogeni, ma implicano anche un cambiamento nello stile di vita globale che tende a minimizzare le differenze, fornendo condizioni omogenee e superando le attese barriere epidemiologiche.

Il panorama italiano, con la propria eterogeneità, risulta quindi in grado di ospitare e promuovere l'evoluzione virale, rispecchiando le dinamiche che caratterizzano CPV anche su larga scala. Al contempo, risente però dell'epidemiologia globale, delle introduzioni di nuovi ceppi dall'estero e agisce da fonte di variabilità verso altre regioni. I pattern di disseminazione appaiono seguire chiaramente flussi socio-economici preferenziali, come è stato dimostrato anche per altri patogeni, fornendo un modello facilmente studiabile, con cui analizzare problematiche future.

Per quanto concerne CPV, l'attenzione della ricerca si è rivolta per molto tempo agli aspetti fenotipici del virus per interpretare l'andamento della patologia clinica, trascurando la variabilità racchiusa a livello genetico. Le segnalazioni di nuovi *outbreak*, di casi di maggior virulenza o di sospetti insuccessi vaccinali, sono state ascritte alla comparsa di nuove varianti, caratterizzate da aminoacidi diversi in residui chiave per l'interazione virus-ospite o per l'*immune-escape*. Queste associazioni, suggerite empiricamente, non sono state però confermate sperimentalmente, mettendo in luce la molteplicità di elementi che può concorrere alla determinazione di un certo *outcome* (manifestazione clinica, resistenza o sensibilità dell'ospite) della patologia.

Lo studio della dinamica di popolazione permette invece di valutare la variabilità complessiva di CPV e di visualizzarne l'andamento nel tempo, evidenziando il nesso tra le fasi di espansione della popolazione e la percezione clinica del problema. Le tappe nella storia di CPV, la comparsa delle varianti e la circolazione del virus, si sovrappongono infatti efficacemente allo *skyline plot* ricostruito sull'informazione genetica, rimarcando ulteriormente la natura indispensabile di questi dati. I picchi e le fluttuazioni della dimensione della popolazione si localizzano in corrispondenza temporale della comparsa nell'ospite cane, dell'identificazione delle varianti e della diffusione globale, a indicare come l'acquisizione di nuove caratteristiche fenotipiche sia la diretta conseguenza della più ampia variabilità genetica sottostante e delle sue ragguardevoli implicazioni pratiche ed epidemiologiche, indotte dai processi evolutivi propri di CPV.

Questo studio vuole quindi porre l'accento sul valore dell'informazione genetica completa per la ricostruzione della storia e dell'epidemiologia dei patogeni, in aggiunta alla sola valutazione delle caratteristiche fenotipiche, approccio altrimenti parziale. Le sostituzioni aminoacidiche più comuni sono risultate infatti presenti anche in molti ceppi geograficamente e filogeneticamente distanti, esito quindi di un'evoluzione convergente promossa da pressioni selettive omogenee, ma non necessariamente riflesso delle relazioni di discendenza tra virus con caratteristiche simili. Per approfondire la conoscenza di CPV è indispensabile promuovere una diversa modalità di diagnosi e caratterizzazione, non più limitata all'identificazione della sola variante antigenica, ma volta ad arricchire la conoscenza del patogeno dal punto di vista genetico.

4. Bibliografia

- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Carstens, E.B., 2014. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Arch. Virol.* 159, 2831–2841.
- Addie, D.D., Toth, S., Thompson, H., Greenwood, N.M., Jarrett, J. O., 1998. Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens. *Vet. Rec.* 142(14), 353.
- Aeffner, F., Ulrich, R., Schulze-Rückamp, L., Beineke, A., 2006. Cerebellar hypoplasia in three sibling cats after intrauterine or early postnatal parvovirus infection. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 113, 403–406.
- Agbandje-McKenna, M., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 1995. The structure of parvoviruses. *Semin. Virol.* 6, 299–309.
- Ahmed, A.F., Odeisho, S.M., Karim, Z.A., 2012. Detection of Canine Parvovirus in Baghdad city by PCR technique. *Iraqi J. Vet. Med.* 36, 95–98.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19, 716–723.
- Aldaz, J., García-Díaz, J., Calleros, L., Sosa, K., Iraola, G., Marandino, A., Hernández, M., Panzera, Y., Pérez, R., 2013. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador. *Vet. Microbiol.* 166, 214–219.
- Alexander, K.A., Kat, P.W., Wayne, R.K., Fuller, T.K., 1994. Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. *J. Wildl. Dis.* 30, 486–491.
- Allison, A.B., Harbison, C.E., Pagan, I., Stucker, K.M., Kaelber, J.T., Brown, J.D., Ruder, M.G., Keel, M.K., Dubovi, E.J., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2012. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. *J. Virol.* 86, 865–872.
- Allison, A.B., Kohler, D.J., Fox, K.A., Brown, J.D., Gerhold, R.W., Shearn-Bochsler, V.I., Dubovi, E.J., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2013. Frequent cross-species transmission of parvoviruses among diverse carnivore hosts. *J. Virol.* 87, 2342–2347.
- Allison, A.B., Kohler, D.J., Ortega, A., Hoover, E.A., Grove, D.M., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2014. Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLoS Pathog.* 10(11), e1004475.
- Altman, K.D., Kelman, M., Ward, M.P., 2017. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Vet. Microbiol.* 210, 8–16.
- Amrani, N., Desario, C., Kadiri, A., Cavalli, A., Berrada, J., Zro, K., Sebbar, G., Colaianni, M.L., Parisi, A., Elia, G., Buonavoglia, C., Malik, J., Decaro, N., 2016. Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco. *Infect. Genet. Evol.* 41, 201–206.
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.F., Dessimoz, C., Gascuel, O., 2011. Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes. *Syst. Biol.* 60, 685–699.
- Appel, M.J., 1978. Reversion to Virulence of Attenuated Canine Distemper Virus In Vivo and In Vitro. *J. Gen. Virol.* 41, 385–393.
- Appel, M.J., Cooper, B.J., Greisen, H., Scott, F., Carmichael, L.E., 1979a. Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet.* 69, 123–33.
- Appel, M.J., Scott, F.W., Carmichael, L.E., 1979b. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156–159.
- Baele, G., Lemey, P., Bedford, T., Rambaut, A., Suchard, M.A., Alekseyenko, A.V., 2012. Improving the Accuracy of Demographic and Molecular Clock Model Comparison While Accommodating Phylogenetic Uncertainty. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2157–2167.
- Bagshaw, C., Isdell, A.E., Thiruvaiyaru, D.S., Brisbin, I.L., Sanchez, S., 2014. Molecular detection of canine parvovirus in flies (Diptera) at open and closed canine facilities in the eastern United States. *Prev. Vet.*

Med. 114, 276–284.

- Balboni, A., Bassi, F., De Arcangeli, S., Zobba, R., Dedola, C., Alberti, A., Battilani, M., 2018. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. *BMC Vet. Res.* 14, 41.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Barbis, D.P., Chang, S.F., Parrish, C.R., 1992. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* 191, 301–308.
- Bastianello, S.S., 1981. Canine parvovirus myocarditis: clinical signs and pathological lesions encountered in natural cases. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 52, 105–108.
- Battilani, M., Ciulli, S., Tisato, E., Prosperi, S., 2002. Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. *Virus Res.* 83, 149–157.
- Battilani, M., Bassani, M., Forti, D., Morganti, L., 2006a. Analysis of the Evolution of Feline Parvovirus (FPV). *Vet. Res. Commun.* 30, 223–226.
- Battilani, M., Scagliarini, A., Ciulli, S., Morganti, L., Prosperi, S., 2006b. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology* 352, 22–26.
- Battilani, M., Gallina, L., Vaccari, F., Morganti, L., 2007. Co-Infection with Multiple Variants of Canine Parvovirus Type 2 (CPV-2) infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2). *Vet. Res. Commun.* 209–212.
- Battilani, M., Balboni, A., Ustulin, M., Giunti, M., Scagliarini, A., Prosperi, S., 2011. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. *Vet. Res.* 42, 43.
- Battilani, M., Balboni, A., De Arcangeli, S., Mira, F., Purpari, G., Di Bella, S., Guercio, A., 2016. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 (CPV-2) in Italy during 1994-2013: the return of variant 2B, in: XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Pacengo Di Lazise (VR), Italia, 28-30 Settembre 2016. Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDiLV), 164–165.
- Berns, K.I., Parrish, C.R., 2013. Parvoviridae, in: *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, 6th Ed., 1768–1791.
- Bielejec, F., Baele, G., Vrancken, B., Suchard, M.A., Rambaut, A., Lemey, P., 2016. Spread3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2167–2169.
- Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., Kajima, M., 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.* 1, 503–508.
- Brun, A., Chappuis, G., Précausta, P., Terré, J., 1979. Immunisation against panleukopenia: early development of immunity. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1, 335–339.
- Buonavoglia, C., Cavalli, A., Gravino, E., Voigt, V., Buonavoglia, D., Caprariis, D., 1994. Intranasal Vaccination of Pups with Maternally Derived Antibodies with a Modified Live Canine Parvovirus. *J. Vet. Med. Ser. B* 41, 3–8.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L.E., 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–3025.
- Burtonboy, G., Coignoul, F., Delferriere, N., Pastoret, P.P., 1979. Canine hemorrhagic enteritis: Detection of viral particles by electron microscopy. *Arch. Virol.* 61, 1–11.
- Calderón, M., Romanutti, C., D’Antuono, A., Keller, L., Mattion, N., La Torre, J., 2011. 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.
- Calderón, M., Romanutti, C., Wilda, M., D’Antuono, A., Keller, L., Giacomodonato, M.N., Mattion, N., La Torre, J., 2015. Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *J. Virol. Methods* 222, 145–149.
- Carman, P.S., Povey, R.C., 1980. Experimental challenge of dogs with canine parvovirus-2. *Vet. Rec.* 107, 447.

- Carman, P.S., Povey, R.C., 1985. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. *Res. Vet. Sci.* 38, 134–140.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1980. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.* 41, 784–791.
- Carmichael, L.E., Binn, L.N., 1981. New enteric viruses in the dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1983. A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response. *Cornell Vet.* 73, 13–29.
- Carmichael, L.E., Schlafer, D.H., Hashimoto, A., 1991. Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus. *Cornell Vet.* 81, 151–171.
- Carmichael, L.E., 1999. Canine Viral Vaccines at a Turning Point - A Personal Perspective. *Adv. Vet. Med.* 41, 289-307.
- Carmichael, L.E., 2005. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. *J. Vet. Med. Ser. B* 52, 303–311.
- Castanheira, P., Duarte, A., Gil, S., Cartaxeiro, C., Malta, M., Vieira, S., Tavares, L., 2014. Molecular and serological surveillance of canine enteric viruses in stray dogs from Vila do Maio, Cape Verde. *BMC Vet. Res.* 10, 91.
- Castro, T.X., Miranda, C., Labarthe, N.V., Silva, L.E., Cubel Garcia, R.C.N., 2007. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995 - 2004. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 59, 333–339.
- Castro, T.X., Costa, E., Leite, J.P.G., Labarthe, N.V., Cubel Garcia, R.C.N., 2010. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. *Brazilian J. Microbiol.* 41, 1093–1098.
- Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D., 2001. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* 24, 239–242.
- Cavalli, A., Martella, V., Desario, C., Camero, M., Bellacicco, A.L., De Palo, P., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C., 2008. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 534–539.
- Cavalli, A., Desario, C., Kusi, I., Mari, V., Lorusso, E., Cirone, F., Kumbe, I., Colaianni, M.L., Buonavoglia, D., Decaro, N., 2014. Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 26, 563–566.
- Chang, S.F., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J. Virol.* 66, 6858–6867.
- Chappuis, G., 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 16, 1468–1472.
- Chiang, S.Y., Wu, H.Y., Chiou, M.T., Chang, M.C., Lin, C.N., 2016. Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Virol. J.* 13, 160.
- Chikhi, L., Sousa, V.C., Luisi, P., Goossens, B., Beaumont, M.A., 2010. The confounding effects of population structure, genetic diversity and the sampling scheme on the detection and quantification of population size changes. *Genetics* 186, 983–995.
- Chinchkar, S.R., Mohana Subramanian, B., Hanumantha Rao, N., Rangarajan, P.N., Thiagarajan, D., Srinivasan, V.A., 2006. Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India. *Arch. Virol.* 151, 1881–1887.
- Chou, S.J., Lin, H.T., Wu, J.T., Yang, W.C., Chan, K.W., 2013. Genotyping of canine parvovirus type 2 VP2 gene in southern Taiwan in 2011. *Taiwan Vet. J.* 39, 81–92.
- Clark, N.J., Seddon, J.M., Kyaw-Tanner, M., Al-Alawneh, J., Harper, G., McDonagh, P., Meers, J., 2018. Emergence of canine parvovirus subtype 2b (CPV-2b) infections in Australian dogs. *Infect. Genet. Evol.* 58, 50–55.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Parker, J.S.L., Dawson, S., Godsall, S.A., Pinchbeck, G., Cripps, P.J., Gaskell, R.M., Radford,

- A.D., 2011. Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic. *J. Virol.* 85, 7892–7899.
- Clegg, S.R., Coyne, K.P., Dawson, S., Spibey, N., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2012. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. *Vet. Microbiol.* 157, 78–85.
- Clifford, D.L., Mazet, J.A.K., Dubovi, E.J., Garcelon, D.K., Coonan, T.J., Conrad, P.A., Munson, L., 2006. Pathogen exposure in endangered island fox (*Urocyon littoralis*) populations: Implications for conservation management. *Biol. Conserv.* 131, 230–243.
- Cohen, M.L., 2000. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406, 762–767.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33, 91–174.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1989. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* 63, 3902–11.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2006a. A rolling hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses, in: Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., Parrish, C.R. (Eds.), *Parvoviruses. Section C Viral Life Cycles: Molecular Interactions between Virus and Host Cell.* Edward Arnold Ltd, 171–188.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2006b. Structure and organization of the viral genome, in: Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., Parrish, C.R. (Eds.), *Parvoviruses. Section B The Rugged Virion.* Edward Arnold Ltd, 73–94.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2007. Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms. *Adv. Virus Res.* 70, 183–232.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Arch. Virol.* 159, 1239–1247.
- Crawford, P.C., Sellon, R.K., 2010. Canine viral diseases, in: Ettinger SJ, Feldan EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* Elsevier, 7th Ed., 958–960.
- Csághola, A., Varga, S., Lőrincz, M., Tuboly, T., 2014. Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary. *Arch. Virol.* 159, 2441–2444.
- Csiza, C.K., De Lahunta, A., Scott, F.W., Gillespie, J.H., 1971. Pathogenesis of feline panleukopenia virus in susceptible newborn kittens II. Pathology and immunofluorescence. *Infect. Immun.* 3, 838–846.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- Davidson, W.R., Appel, M.J., Doster, G.L., Baker, O.E., Brown, J.F., 1992. Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *J. Wildl. Dis.* 28, 581–589.
- Dawson, S., Willoughby, K., Gaskell, R.M., Wood, G., Chalmers, W.S.K., 2001. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleukopenia virus in 6-week-old kittens. *J. Feline Med. Surg.* 3, 17–22.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A., 2016. WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 57, E1–E45.
- Day, M.J., 2017. Small animal vaccination: a practical guide for vets in the UK. *In Pract.* 39, 110–118.
- De Cramer, K.G.M., Stylianides, E., van Vuuren, M., 2011. Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 149, 126–132.
- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Cavalli, A., Ricci, D., Martella, V., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2004. Evaluation of lactogenic immunity to canine parvovirus in pups. *New Microbiol.* 27, 375–379.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005a. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33, 261–267.
- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005b. Clinical

- and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 17, 133–138.
- Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Buonavoglia, C., 2005c. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J. Vet. Med. Ser. B* 52, 316–319.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005d. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19–28.
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006a. 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.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C., 2006b. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods* 133, 92–99.
- Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Buonavoglia, D., Bellacicco, A.L., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2006c. 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.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007a. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1222–1224.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007b. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161–1166.
- Decaro, N., Martella, V., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Lorusso, A., Buonavoglia, C., 2007c. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microbiol.* 121, 39–44.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia, C., 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125–130.
- Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C., 2009. Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet. Rec.* 164, 593–595.
- Decaro, N., Buonavoglia, D., Desario, C., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Parisi, A., Terio, V., Elia, G., Lucente, M.S., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C., 2010a. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. *Res. Vet. Sci.* 89, 275–278.
- Decaro, N., Desario, C., Beall, M.J., Cavalli, A., Campolo, M., DiMarco, A.A., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Buonavoglia, C., 2010b. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet. J.* 184, 373–375.
- Decaro, N., Desario, C., Billi, M., Mari, V., Elia, G., Cavalli, A., Martella, V., Buonavoglia, C., 2011. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet. J.* 187, 195–199.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., Ryser-Degiorgis, M.P., Gortázar, C., 2012. Parvovirus infections, in: *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. 181–190.
- Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Losurdo, M., Elia, G., Parisi, A., Ventrella, G., Martella, V., Buonavoglia, C., 2013. Detection of a canine parvovirus type 2c with a non-coding mutation and its implications for molecular characterisation. *Vet. J.* 196, 555–557.
- Dei Giudici, S., Cubeddu, T., Giagu, A., Sanna, G., Rocca, S., Oggiano, A., 2017. First molecular characterization of canine parvovirus strains in Sardinia, Italy. *Arch. Virol.* 162, 3481–3486.

- Demeter, Z., Palade, E.A., Soós, T., Farsang, A., Jakab, C., Rusvai, M., 2010. Misleading results of the MbolI-based identification of type 2a canine parvovirus strains from Hungary reacting as type 2c strains. *Virus Genes* 41, 37–42.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* 126, 179–185.
- Dogonyaro, B.B., Bosman, A.M., Sibeko, K.P., Venter, E.H., van Vuuren, M., 2013. Genetic analysis of the VP2-encoding gene of canine parvovirus strains from Africa. *Vet. Microbiol.* 165, 460–465.
- Doki, M., Fujita, K., Miura, R., Yoneda, M., Ishikawa, Y., Taneno, A., Kai, C., 2006. Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolated from domestic dogs in Japan in 1999 and 2000. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 199–206.
- Dossin, O., Rupassara, S.I., Weng, H.Y., Williams, D.A., Garlick, P.J., Schoeman, J.P., 2011. Effect of parvoviral enteritis on plasma citrulline concentration in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 215–221.
- Drummond, A.J., Pybus, O.G., Rambaut, A., Forsberg, R., Rodrigo, A.G., 2003. Measurably evolving populations. *Trends Ecol. Evol.* 18, 481–488.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185–1192.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4, e88.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2009. Bayesian evolutionary analysis by sampling trees, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 564–591.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Duarte, M.D., Henriques, A.M., Barros, S.C., Fagulha, T., Mendonça, P., Carvalho, P., Monteiro, M., Fevereiro, M., Basto, M.P., Rosalino, L.M., Barros, T., Bandeira, V., Fonseca, C., Cunha, M.V., 2013. Snapshot of viral infections in wild carnivores reveals ubiquity of parvovirus and susceptibility of Egyptian mongoose to feline panleukopenia virus. *PLoS One* 8, e59399.
- Duijvestijn, M., Mughini-Gras, L., Schuurman, N., Schijf, W., Wagenaar, J.A., Egberink, H., 2016. Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-)occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet. Microbiol.* 195, 115–122.
- Duque-García, Y., Echeverri-Zuluaga, M., Trejos-Suarez, J., Ruiz-Saenz, J., 2017. Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Vet. Microbiol.* 201, 56–61.
- Efron, B., Halloran, E., Holmes, S., 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(23), 13429–13434.
- Elia, G., Cavalli, A., Cirone, F., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, D., Tempesta, M., 2005. Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J. Vet. Med. Ser. B* 52, 320–322.
- Esfandiari, J., Klingeborn, B., 2000. 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. Ser. B* 47, 145–153.
- Evermann, J.F., Foreyt, W.J., Maag-Miller, L., Leathers, C.W., McKeirnan, A.J., LeaMaster, B., 1980. Acute hemorrhagic enteritis associated with canine coronavirus and parvovirus infections in a captive coyote population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177, 784–786.
- Faria, N.R., Suchard, M.A., Rambaut, A., Lemey, P., 2011. Toward a quantitative understanding of viral phylogeography. *Curr. Opin. Virol.* 1, 423–429.
- Fay, J.C., Wu, C.I., 2000. Hitchhiking Under Positive Darwinian Selection. *Genetics*, 155(3), 1405–1413.
- Filipov, C., Desario, C., Amorisco, F., Sciarretta, R., Buonavoglia, C., 2011. Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 23, 152–154.

- Filipov, C., Desario, C., Patouchas, O., Eftimov, P., Gruichev, G., Manov, V., Filipov, G., Buonavoglia, C., Decaro, N., 2016. A ten-year molecular survey on parvoviruses infecting carnivores in Bulgaria. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 460–464.
- Firoozjahi, H.A., Shoorijeh, S.J., Mohammadi, A., Tamadon, A., 2011. Characterization of Iranian isolates of canine parvovirus in fecal samples using polymerase chain reaction assay. *Iran. J. Biotechnol.* 9, 63–68.
- Ford, J., McEndaffer, L., Renshaw, R., Molesan, A., Kelly, K., 2017. Parvovirus infection is associated with myocarditis and myocardial fibrosis in young dogs. *Vet. Pathol.* 54, 964–971.
- Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M., 2017. Canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV) codon bias analysis reveals a progressive adaptation to the new niche after the host jump. *Mol. Phylogenet. Evol.* 114, 82–92.
- Freisl, M., Speck, S., Truyen, U., Reese, S., Proksch, A.-L., Hartmann, K., 2017. Faecal shedding of canine parvovirus after modified-live vaccination in healthy adult dogs. *Vet. J.* 219, 15–21.
- Frölich, K., Streich, W.J., Fickel, J., Jung, S., Truyen, U., Hentschke, J., Dedek, J., Prager, D., Latz, N., 2005. Epizootiologic investigations of parvovirus infections in free-ranging carnivores from Germany. *J. Wildl. Dis.* 41, 231–235.
- Frost, S.D., Volz, E.M., 2010. Viral phylodynamics and the search for an “effective number of infections”. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1879–1890.
- Gabriel, M.W., Wengert, G.M., Matthews, S.M., Higley, J.M., Foley, J.E., Blades, A., Sullivan, M., Brown, R.N., 2010. Effectiveness of rapid diagnostic tests to assess pathogens of fishers (*Martes pennanti*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *J. Wildl. Dis.* 46, 966–970.
- Gamoh, K., Shimazaki, Y., Makie, H., Senda, M., Itoh, O., Inoue, Y., 2003. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1027–1029.
- Gaskell, R.M., Dawson, S., Radford, A.D., 2006. Duration of immunity (DOI)—The regulatory issues. *Vet. Microbiol.* 117, 80–85.
- Gaskell, R.M., Dawson, S., Radford, A.D., 2010. Other Feline viral diseases, in: Ettinger, S.J. (Ed.), *Textbook of Veterinary Medicine*. WB Saunders, Philadelphia, 949–950.
- Geng, Y., Guo, D., Li, C., Wang, E., Wei, S., Wang, Z., Yao, S., Zhao, X., Su, M., Wang, X., Wang, J., Wu, R., Feng, L., Sun, D., 2015. Co-circulation of the rare CPV-2c with unique Gln370Arg substitution, new CPV-2b with unique Thr440Ala substitution, and new CPV-2a with high prevalence and variation in Heilongjiang province, Northeast China. *PLoS One* 10, e0137288.
- Gill, M.S., Lemey, P., Faria, N.R., Rambaut, A., Shapiro, B., Suchard, M.A., 2013. Improving bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. *Mol. Biol. Evol.* 30, 713–724.
- Glickman, L.T., Domanski, L.M., Patronek, G.J., Visintainer, F., 1985. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187, 589–94.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., Christopher, M.M., Duncan, N.M., Becker, P.J., 2008. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 309–316.
- Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2010. Canine Parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 1041–1053.
- Godsall, S.A., Clegg, S.R., Stavisky, J.H., Radford, A.D., Pinchbeck, G., 2010. Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals. *Vet. Rec.* 167, 196–201.
- Goller, K.V., Fyumagwa, R.D., Nikolin, V., East, M.L., Kilewo, M., Speck, S., Müller, T., Matzke, M., Wibbelt, G., 2010. Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Vet. Microbiol.* 146, 245–252.
- Gooding, G.E., Robinson, W.F., 1982. Maternal antibody, vaccination and reproductive failure in dogs with parvovirus infection. *Aust. Vet. J.* 59, 170–174.
- Gore, T.C., Lakshmanan, N., Duncan, K.L., Coyne, M.J., Lum, M.A., Sterner, F.J., 2005. Three-year duration of immunity in dogs following vaccination against canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and canine distemper virus. *Vet. Ther.* 6, 5–14.

- Goto, H., Hirano, T., Uchida, E., Watanabe, K., Shinagawa, M., Ichijo, S., Shimizu, K., 1984a. Comparative studies of physicochemical and biological properties between canine parvovirus and feline panleukopenia virus. *Nihon Juigaku Zasshi*. 46, 519–526.
- Goto, H., Uchida, E., Ichijo, S., Shimizu, K., Morohoshi, Y., Nakano, K., 1984b. Experimental infection of canine parvovirus in specific pathogen-free cats. *Nihon Juigaku Zasshi*. 46, 729–731.
- Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A.A., Calderón, M., da Silva, A.P., Name, D., Aldaz, J., Calleros, L., Marandino, A., Tomás, G., Maya, L., Francia, L., Panzera, Y., Pérez, R., 2018. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol.* 4(1), vey011.
- Greene, C.E., 2012. Feline enteric viral infections, in: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Greene, C.E. (Ed.), Elsevier Health Sciences, 4th Ed., 80–88.
- Greene, C.E., Decaro, N., 2012. Canine viral enteritis, in: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Greene, C.E. (Ed.), Elsevier Health Sciences, 4th Ed., 67–80.
- Grellet, A., Chastant-Maillard, S., Robin, C., Feugier, A., Boogaerts, C., Boucraut-Baralon, C., Grandjean, D., Polack, B., 2014. Risk factors of weaning diarrhea in puppies housed in breeding kennels. *Prev. Vet. Med.* 117, 260–265.
- Grenfell, B.T., Pybus, O.G., Gog, J.R., Wood, J.L.N., Daly, J.M., Mumford, J.A., Holmes, E.C., 2004. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303, 327–32.
- Hall, B.G., 2011. *Phylogenetic trees made easy: How to manual*. Sinauer Associates, 68–89.
- Harbison, C.E., Chiorini, J.A., Parrish, C.R., 2008. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* 16, 208–214.
- Harrison, L.R., Styer, E.L., Pursell, A.R., Carmichael, L.E., Nietfeld, J.C., 1992. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 4, 19–22.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 1989. *Principles of population genetics*. Princ. Popul. Genet.
- Heldt, C.L., Hernandez, R., Mudiganti, U., Gurgel, P.V., Brown, D.T., Carbonell, R.G., 2006. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J. Virol. Methods* 135, 56–65.
- Hernández-Blanco, B., Catala-López, F., 2015. Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies? A systematic review of controlled clinical trials. *Vet. Microbiol.* 180, 1–9.
- Hirasawa, T., Kaneshige, T., Mikazuki, K., 1994. Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 41, 135–145.
- Ho, S.Y.W., Shapiro, B., 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 423–434.
- Hoelzer, K., Parrish, C.R., 2008. Evolution and Variation of the Parvoviruses, in: *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press, 393–416.
- Hoelzer, K., Parrish, C.R., 2010. The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.* 41, 39.
- Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2008a. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. *J. Virol.* 82, 11096–11105.
- Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2008b. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2280–2289.
- Holmes, E.C., 2009. *The evolution and emergence of RNA viruses*. Oxford University Press.
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, J.T., 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 535–539.
- Houston, D.M., Ribble, C.S., Head, L.L., 1996. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 542–546.
- Hueffer, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Parrish, C.R., 2003a. Combinations of two capsid regions

- controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *J. Virol.* 77, 10099–10105.
- Hueffer, K., Parker, J.S.L., Weichert, W.S., Geisel, R.E., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 2003b. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77, 1718–1726.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Ikeda, Y., Mochizuki, M., Naito, R., Nakamura, K., Miyazawa, T., Mikami, T., Takahashi, E., 2000. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* 278, 13–19.
- Jacoboni, I., Scagliarini, A., Prosperi, S., Turilli, C., Battilani, M., Tisato, E., Casadio, R., 2001. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 1555–1560.
- Jakel, V., Cussler, K., Hanschmann, K.M., Truyen, U., König, M., Kamphuis, E., Duchow, K., 2012. Vaccination against Feline Panleukopenia: implications from a field study in kittens. *BMC Vet. Res.* 8, 62.
- Jeoung, S.Y., Ahn, S.J., Kim, D., 2008. Genetic analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 719–722.
- Johnson, B.J., Castro, A.E., 1984. Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 1398–1399.
- Johnson, R.H., Spradbrow, P.B., 1979. Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleukopaemia virus. *Aust. Vet. J.* 55, 151–152.
- Johnson, R.H., Mc Candlish, I.A.P., Wilson, J.H.G., 1983. The present status of canine parvovirus. *Vet. Q.* 5, 86–88.
- Ju, C., Cheng, Y., Ji, Y., Wang, Y., Sun, L., Huang, J., 2012. Genome sequence of canine parvovirus strain SC02/2011, isolated from a puppy with severe diarrhea in south China. *J. Virol.* 86, 13805.
- Kalli, I., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koutinas, A.F., 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res. Vet. Sci.* 89, 174–178.
- Kang, B.K., Song, D.S., Lee, C.S., Jung, K.I., Park, S.J., Kim, E.M., Park, B.K., 2008. Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes* 36, 127–133.
- Kantere, M.C., Athanasiou, L.V., Spyrou, V., Kyriakis, C.S., Kontos, V., Chatzopoulos, D.C., Tsokana, C.N., Billinis, C., 2015. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status. *J. Virol. Methods* 215, 52–55.
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston, L., Campbell, G., Johnson, B.J., 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45, 4044–4047.
- Kaur, G., Chandra, M., Dwivedi, P.N., Narang, D., 2016. Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types. *J. Virol. Methods* 233, 1–5.
- Kilian, E., Suchodolski, J.S., Hartmann, K., Mueller, R.S., Wess, G., Unterer, S., 2018. Long-term effects of canine parvovirus infection in dogs. *PLoS One* 13, e0192198.
- Kingman, J.F.C., 1982. The coalescent. *Stoch. Process. their Appl.* 13, 235–248.
- Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., Yilmaz, Z., 2010. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *J. Small Anim. Pract.* 51, 478–483.
- Koptopoulos, G., Papadopoulos, O., Papanastasopoulou, M., Cornwell, H.J., 1986. Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. *Vet. Rec.* 118, 332–333.
- Kruse, B.D., Unterer, S., Horlacher, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2010. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1271–1276.
- Kumar, M., Nandi, S., 2010a. Molecular typing of canine parvovirus variants by polymerase chain reaction and

- restriction enzyme analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 458–463.
- Kumar, M., Nandi, S., 2010b. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J. Virol. Methods* 169, 198–201.
- Langeveld, J.P., Casal, J.I., Osterhaus, A.D., Cortés, E., de Swart, R., Vela, C., Dalsgaard, K., Puijk, W.C., Schaaper, W.M., Meulen, R.H., 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 68, 4506–4513.
- Larson, L.J., Schultz, R.D., 2007. Three-year serologic immunity against canine parvovirus type 2 and canine adenovirus type 2 in dogs vaccinated with a canine combination vaccine. *Vet. Ther.* 8, 305–310.
- Larson, L.J., Schultz, R.D., 2008. Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? *Vet. Ther.* 9, 94–101.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J., Suchard, M.A., 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000520.
- Lemey, P., Rambaut, A., Bedford, T., Faria, N.R., Bielejec, F., Baele, G., Russell, C.A., Smith, D.J., Pybus, O.G., Brockmann, D., Suchard, M.A., 2014. Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2. *PLoS Pathog.* 10, e1003932.
- Lenghaus, C., Studdert, M.J., Finnie, J.W., 1980. Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following intrauterine inoculation. *Aust. Vet. J.* 56, 465–468.
- Lenghaus, C., Studdert, M.J., 1984. Acute and chronic viral myocarditis. Acute diffuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine parvovirus. *Am. J. Pathol.* 115, 316–319.
- Li, R., Humm, K.R., 2015. Canine parvovirus infection, in: *Small Animal Critical Care Medicine*. 2nd Ed., 509–513.
- Lin, C.N., Chien, C.H., Chiou, M.T., Chueh, L.L., Hung, M.Y., Hsu, H.S., 2014. Genetic characterization of type 2a canine parvoviruses from Taiwan reveals the emergence of an Ile324 mutation in VP2. *Virol. J.* 11, 39.
- Lin, Y.C., Chiang, S.Y., Wu, H.Y., Lin, J.H., Chiou, M.T., Liu, H.F., Lin, C.N., Lin, Y.C., Chiang, S.Y., Wu, H.Y., Lin, J.H., Chiou, M.T., Liu, H.F., Lin, C.N., 2017. Phylodynamic and genetic diversity of canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2703.
- Ling, M., Norris, J.M., Kelman, M., Ward, M.P., 2012. Risk factors for death from canine parvovirus-related disease in Australia. *Vet. Microbiol.* 158, 280–290.
- Litster, A., Benjanirut, C., 2014. Case series of feline panleukopenia virus in an animal shelter. *J. Feline Med. Surg.* 16, 346–353.
- Lo Presti, A., Ciccozzi, M., Cella, E., Lai, A., Simonetti, F.R., Galli, M., Zehender, G., Rezza, G., 2012. Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect. Genet. Evol.* 12, 392–398.
- Löffling, J., Lyi, S.M., Parrish, C.R., Varki, A., 2013. Canine and feline parvoviruses preferentially recognize the non-human cell surface sialic acid N-glycolylneuraminic acid. *Virology* 440, 89–96.
- López-Bueno, A., Rubio, M.P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J. Virol.* 80, 1563–73.
- Macartney, L., Parrish, C.R., Binn, L.N., Carmichael, L.E., 1988. Characterization of minute virus of canines (MVC) and its pathogenicity for pups. *Cornell Vet.* 78, 131–45.
- Mainka, S.A., Xianmeng, Q., Tingmei, H., Appel, M.J., 1994. Serologic survey of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong reserve, China. *J. Wildl. Dis.* 30, 86–89.
- Majer-Dziedzic, B., Jakubczak, A., Zietek, J., 2011. Phylogenetic analysis of canine parvovirus CPV-2 strains and its variants isolated in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 14, 379–384.
- Mantione, N.L., Otto, C.M., 2005. Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1787–1793.
- Markovich, J.E., Stucker, K.M., Carr, A.H., Harbison, C.E., Scarlett, J.M., Parrish, C.R., 2012. Effects of canine

- parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 66–72.
- Marsilio, F., Tiscar, P.G., Gentile, L., Roth, H.U., Boscagli, G., Tempesta, M., Gatti, A., 1997. Serologic survey for selected viral pathogens in brown bears from Italy. *J. Wildl. Dis.* 33, 304–307.
- Martella, V., Cavalli, A., Pratelli, A., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Narcisi, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1333–1336.
- Martella, V., Cavalli, A., Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Bozzo, G., Tarsitano, E., Buonavoglia, C., 2005a. Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1243–5.
- Martella, V., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C., 2005b. Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. Ser. B* 52, 312–315.
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and Implicance for Antigenic/Genetic Characterization. *Virus Genes* 33, 11–13.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1(1).
- Martinello, F., Galuppo, F., Ostanello, F., Guberti, V., Prospero, S., 1997. Detection of canine parvovirus in wolves from Italy. *J. Wildl. Dis.* 33, 628–631.
- Martyn, J.C., Davidson, B.E., Studdert, M.J., 1990. Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus: comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences. *J. Gen. Virol.* 71, 2747–2753.
- Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., Sosa, K., Pérez, R., 2013. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158, 1133–1141.
- McClure, V., van Schoor, M., Thompson, P.N., Kjelgaard-Hansen, M., Goddard, A., 2013. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 243, 361–366.
- McElligott, S., Collins, P.J., Sleator, R.D., Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., O’Shea, H., 2011. Detection and genetic characterization of canine parvoviruses and coronaviruses in southern Ireland. *Arch. Virol.* 156, 495–503.
- Meers, J., Kyaw-Tanner, M., Bensink, Z., Zwijnenberg, R., 2007. Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 85, 392–396.
- Merhej, V., Raoult, D., 2012. Rhizome of life, catastrophes, sequence exchanges, gene creations, and giant viruses: how microbial genomics challenges Darwin. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 113.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1984. Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. *Vet. Pathol.* 21, 509–515.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Lanieu, M.E., Slauson, D.O., 1985a. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. *Vet. Pathol.* 22, 617–624.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1985b. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet. Pathol.* 22, 60–71.
- Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 182, 114–124.
- Mira, F., Dowgier, G., Purpari, G., Vicari, D., Di Bella, S., Macaluso, G., Gucciardi, F., Randazzo, V., Decaro, N., Guercio, A., 2018a. Molecular typing of a novel canine parvovirus type 2a mutant circulating in Italy. *Infect. Genet. Evol.* 61, 67–73.
- Mira, F., Purpari, G., Lorusso, E., Di Bella, S., Gucciardi, F., Desario, C., Macaluso, G., Decaro, N., Guercio, A., 2018b. Introduction of Asian canine parvovirus in Europe through dog importation. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 16–21.

- Miranda, C., Parrish, C.R., Thompson, G., 2014. Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 26, 462–464.
- Miranda, C., Carnevali, J., Parrish, C.R., Thompson, G., 2015. Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Vet. Microbiol.* 180, 59–64.
- Miranda, C., Parrish, C.R., Thompson, G., 2016. Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. *Vet. Microbiol.* 183, 37–42.
- Miranda, C., Thompson, G., 2016a. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 97(9), 2043–2057.
- Miranda, C., Thompson, G., 2016b. Canine parvovirus in vaccinated dogs: a field study. *Vet. Rec.* 178, 397.
- Mittal, M., Chakravarti, S., Mohapatra, J.K., Chug, P.K., Dubey, R., Upmanuy, V., Narwal, P.S., Kumar, A., Churamani, C.P., Kanwar, N.S., 2014. Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure. *Infect. Genet. Evol.* 23, 1–6.
- Mochizuki, M., Kawabata, H., Sheng, W.J., 1991. Antigenic and genomic comparisons of some feline parvovirus subspecies strains. *J. Vet. Med. Ser. B* 38, 99–105.
- Mochizuki, M., Harasawa, R., Nakatani, H., 1993. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38, 1–10.
- Mochizuki, M., Horiuchi, M., Hiragi, H., San Gabriel, M.C., Yasuda, N., Uno, T., 1996. Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2101–2105.
- Mochizuki, M., Ohshima, T., Une, Y., Yachi, A., 2008. Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 1305–1314.
- Mohammed, J.G., Ogbé, A.O., Zwandor, N.J., Umoh, J.U., 2008. Risk factors associated with canine parvovirus enteritis in Vom And Environs. *Anim. Res. Int.* 2, 366–368.
- Mohr, A.J., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Steiner, J.M., Ruaux, C.G., Williams, D.A., 2003. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 791–798.
- Monteiro, K., Allendorf, S.D., Vicente, A.F., Appolinário, C.M., Peres, M.G., Cortez, A., Heinemann, M.B., Megid, J., 2016. Viral type characterization and clinical aspects of canine parvovirus in naturally infected dogs in São Paulo State, Brazil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 36, 1181–1185.
- Mukhopadhyay, H.K., Nookala, M., Thangamani, N.R.K., Sivaprakasam, A., Antony, P.X., Thanislass, J., Srinivas, M.V., Pillai, R.M., 2017. Molecular characterisation of parvoviruses from domestic cats reveals emergence of newer variants in India. *J. Feline Med. Surg.* 19, 846–852.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D., 1995. Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. (Suppl.)* 10, 412–415.
- Murrell, B., Wertheim, J.O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S.L., 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 8, e1002764.
- Muz, D., Oğuzoğlu, T.Ç., Timurkan, M.Ö., Akın, H., 2012. Characterization of the partial VP2 gene region of canine parvoviruses in domestic cats from Turkey. *Virus Genes* 44, 301–308.
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kawakami, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mikami, T., Mochizuki, M., 2001. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 663–668.
- Nakamura, M., Nakamura, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Mochizuki, M., Akashi, H., 2003. Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1085–1089.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T.T., Nguyen, N.H., Huynh, L.M.T., Nguyen, L.T., Nguyen, P.N., Nguyen, P. V., Nguyen, N.P.T., Akashi, H., 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch. Virol.* 149, 2261–2269.

- Namroodi, S., Milanlou, D., Rezaei, H., 2017. Heavy metal bioaccumulation and its potential relation with incidence of canine parvovirus infection in golden jackals, North Iran. *Iran. J. Vet. Med.* 11, 113–125.
- Nandi, S., Chidri, S., Kumar, M., Chauhan, R.S., 2010. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Res. Vet. Sci.* 88, 169–171.
- Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T.K., Ravishankar, C., 2013. Emergence of canine parvovirus-2 variants and its impact on vaccination. *World Appl. Sci. J.* 23, 1366–1376.
- Nara, P.L., Winters, K., Rice, J.B., Olsen, R.G., Krakowka, S., 1983. Systemic and local intestinal antibody response in dogs given both infective and inactivated canine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1989–95.
- Neuerer, F., Horlacher, K., Truyen, U., Hartmann, K., 2008. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. *J. Feline Med. Surg.* 10, 247–251.
- Nivy, R., Hahn, S., Perl, S., Karnieli, A., Aroch, I., 2011. A fatal outbreak of parvovirus infection: first detection of canine parvovirus type 2c in Israel with secondary *Escherichia coli* septicemia and meningoencephalitis. *Isr. J. Vet. Med.* 66, 96–102.
- Nookala, M., Mukhopadhyay, H.K., Sivaprakasam, A., Balasubramanian, B., Antony, P.X., Thanislass, J., Srinivas, M.V., Pillai, R.M., 2016. Full-length VP2 gene analysis of canine parvovirus reveals emergence of newer variants in India. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 63, 411–426.
- Ntafis, V., Xylouri, E., Kalli, I., Desario, C., Mari, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2010. Characterization of canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 737–740.
- O’Sullivan, G., Durham, P.J.K., Smith, J.R., Campbell, R.S.F., 1984. Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis. *Aust. Vet. J.* 61, 1–4.
- Ohneiser, S.A., Hills, S.F., Cave, N.J., Passmore, D., Dunowska, M., 2015. Canine parvoviruses in New Zealand form a monophyletic group distinct from the viruses circulating in other parts of the world. *Vet. Microbiol.* 178, 190–200.
- Ohshima, T., Hisaka, M., Kawakami, K., Kishi, M., Tohya, Y., Mochizuki, M., 2008. Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 769–775.
- Ohshima, T., Mochizuki, M., 2009. Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 403–408.
- Olvera, A., Busquets, N., Cortey, M., De Deus, N., Ganges, L., Núñez, J.I., Peralta, B., Toskano, J., Dolz, R., 2010. Applying phylogenetic analysis to viral livestock diseases: Moving beyond molecular typing. *Vet. J.* 184, 130–137.
- Organtini, L.J., Allison, A.B., Lukk, T., Parrish, C.R., Hafenstein, S.L., 2015. Global displacement of canine parvovirus by a host-adapted variant: structural comparison between pandemic viruses with distinct host ranges. *J. Virol.* 89, 1909–1912.
- Osterhaus, A.D.M.E., Drost, G.A., Wirahadiredja, R.M.S., van den Ingh, T.S.G.A.M., 1980. Canine viral enteritis: prevalence of parvo-, corona- and rotavirus infections in dogs in the Netherlands. *Vet. Q.* 2, 181–190.
- Otto, C.M., Drobatz, K.J., Soter, C., 1997. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J. Vet. Intern. Med.* 11, 65–70.
- Otto, C.M., Rieser, T.M., Brooks, M.B., Russell, M.W., 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1500–1504.
- Palermo, L.M., Hafenstein, S.L., Parrish, C.R., 2006. Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges. *J. Virol.* 80, 8482–8492.
- Paradiso, P.R., Rhode, S.L., Singer, I.I., 1982. Canine parvovirus: a biochemical and ultrastructural characterization. *J. Gen. Virol.* 62, 113–125.
- Parker, J.S.L., Parrish, C.R., 2000. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* 74, 1919–1930.

- Parrish, C.R., 1990. Emergence, natural history and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Adv. Virus Res.* 38, 403–450.
- Parrish, C.R., 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183, 195–205.
- Parrish, C.R., 1995a. Molecular epidemiology of parvoviruses. *Semin. Virol.* 6, 415–418.
- Parrish, C.R., 1995b. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres. Clin. Haematol.* 8, 57–71.
- Parrish, C.R., 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 29–40.
- Parrish, C.R., 2011. Parvoviruses, in: *Fenner's Veterinary Virology*. Dubovi, E.J., Maclachlan, J.N. (Eds.), Elsevier, 4th Ed., 224–235.
- Parrish, C.R., Carmichael, L.E., Antczak, D.F., 1982. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional antisera and monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 72, 267–278.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Carmichael, L.E., 1988a. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 166, 293–307.
- Parrish, C.R., Burtonboy, G., Carmichael, L.E., 1988b. Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology* 163, 230–232.
- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988c. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69, 1111–1116.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–6552.
- Parrish, C.R., Kawaoka, Y., 2005. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 553–586.
- Patterson, E.V., Reese, M.J., Tucker, S.J., Dubovi, E.J., Crawford, P.C., Levy, J.K., 2007. Effect of vaccination on parvovirus antigen testing in kittens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 359–363.
- Pedroza-Roldán, C., Páez-Magallan, V., Charles-Niño, C., Elizondo-Quiroga, D., Leonel De Cervantes-Mireles, R., López-Amezcuca, M.A., 2015. Genotyping of canine parvovirus in western Mexico. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 27, 107–111.
- Percy, D.H., Scott, F.W., Albert, D.M., 1975. Retinal dysplasia due to feline panleukopenia virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 167, 935–937.
- Pereira, C.A., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D'Angelo, M., Durigon, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127–133.
- Pérez, R., Bianchi, P., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Maya, L., Panzera, Y., Sosa, K., Zoller, S., 2012. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 155, 214–219.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N., Carrau, L., Hernández, M., Francia, L., Sosa, K., Tomás, G., Panzera, Y., Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N., 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One* 9, e111779.
- Phromnoi, S., Sirinarumit, K., Sirinarumit, T., 2010. Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Thailand. *Virus Genes* 41, 23–29.
- Pinto, L.D., Streck, A.F., Gonçalves, K.R., Souza, C.K., Corbellini, Â.O., Corbellini, L.G., Canal, C.W., 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165, 29–33.
- Pollock, R.V., 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103–119.
- Pollock, R.V., Carmichael, L.E., 1982. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer,

- decline, and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 37–42.
- Pollock, R.V., Coyne, M.J., 1993. Canine Parvovirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 23, 555–568.
- Pond, S.L.K., L., S., Frost, S.D.W., 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1208–1222.
- Pond, S.L.K., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096–3098.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Posada, D., 2009. Selecting models of evolution, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 345–361.
- Potgieter, L.N., Jones, J.B., Patton, C.S., Webb-Martin, T.A., 1981. Experimental parvovirus infection in dogs. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* 45, 212–216.
- Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2001. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 612–615.
- Prittie, J., 2004. Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 14, 167–176.
- Purpari, G., Mira, F., Di Bella, S., Di Pietro, S., Giudice, E., Guercio, A., 2018. Investigation on canine parvovirus circulation in dogs from Sicily (Italy) by biomolecular assay. *Acta Vet.* 68, 80–94.
- Qin, Q., Loeffler, I.K., Li, M., Tian, K., Wei, F., 2007. Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China. *Virus Genes* 34, 299–302.
- Rallis, T.S., Papazoglou, L.G., Adamama-Moraitou, K.K., Prassinou, N.N., 2000. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: a retrospective study. *J. Vet. Med. Ser. A* 47, 507–511.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2013. Tracer 1.6. UK. Tech. Rep.
- Reed, A.P., Jones, E. V., Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62, 266–276.
- Rezabek, G.B., 2008. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 837–850.
- Rhode, S.L., 1985a. Trans-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J. Virol.* 55, 886–889.
- Rhode, S.L., 1985b. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J. Virol.* 54, 630–3.
- Rice, J.B., Winters, K.A., Krakowka, S., Olsen, R.G., 1982. Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infect. Immun.* 38, 1003–1009.
- Richards, J.R., Elston, T.H., Ford, R.B., Gaskell, R.M., Hartmann, K., Hurley, K.F., Lappin, M.R., Levy, J.K., Rodan, I., Scherk, M., Schultz, R.D., Sparkes, A.H., 2006. The 2006 American Association of Feline Practitioners Feline Vaccine Advisory Panel Report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 1405–1441.
- Robinson, W.F., Huxtable, C.R., Pass, D.A., 1980a. Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet. Pathol.* 17, 282–293.
- Robinson, W.F., Wilcox, G.E., Flower, R.L.P., 1980b. Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet. Pathol.* 17, 589–599.
- Rodrigo, A.G., 2009. The coalescent: population genetic inference using genealogies, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 551–563.
- Ronquist, F., van der Mark, P., Huelsenbeck, J.P., 2009. Bayesian phylogenetic analysis using MRBAYES, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P.,

- Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 210–266.
- Sagazio, P., Tempesta, M., Buonavoglia, D., Cirone, F., Buonavoglia, C., 1998. Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73, 197–200.
- Sanmartín, I., van der Mark, P., Ronquist, F., 2008. Inferring dispersal: a bayesian approach to phylogeny-based island biogeography, with special reference to the Canary Islands. *J. Biogeogr.* 35, 428–449.
- Santos, N., Almendra, C., Tavares, L., 2009. Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. *J. Wildl. Dis.* 45, 221–226.
- Schatzberg, S.J., Haley, N.J., Barr, S.C., Parrish, C.R., Steingold, S.F., Summers, B.A., Lahunta, A., Kornegay, J.N., Sharp, N.J.H., 2003. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of parvoviral DNA from the brains of dogs and cats with cerebellar hypoplasia. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 538–544.
- Schmidt, H.A., von Haeseler, A., 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 181–198.
- Schmitz, S., Coenen, C., Matthias, K., Heinz-Jürgen, T., Neiger, R., 2009. Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 21, 344–345.
- Schoeman, J.P., Goddard, A., Herrtage, M.E., 2007. Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 231, 1534–1539.
- Schoeman, J.P., Goddard, A., Leisewitz, A.L., 2013. Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *N. Z. Vet. J.* 61, 217–222.
- Schultz, R.D., 2006. Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review. *Vet. Microbiol.* 117, 75–79.
- Schwartz, D., Green, B., Carmichael, L.E., Parrish, C.R., 2002. The canine minute virus (minute virus of canines) is a distinct parvovirus that is most similar to bovine parvovirus. *Virology* 302, 219–223.
- Schwarz, G., 1978. Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Stat.* 6, 461–464.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 379–384.
- Sharp, N.J.H., Davis, B.J., Guy, J.S., Cullen, J.M., Steingold, S.F., Kornegay, J.N., 1999. Hydranencephaly and cerebellar hypoplasia in two kittens attributed to intrauterine parvovirus infection. *J. Comp. Pathol.* 121, 39–53.
- Sheikh, M.O.B., Rashid, P.M.A., Marouf, A.S., Raheem, Z.H., Manjunath, S., Janga, S.C., 2017. Molecular typing of canine parvovirus from Sulaimani, Iraq and phylogenetic analysis using partial VP2 gene. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(3), 225–235.
- Sobrinho, R., Arnal, M.C., Luco, D.F., Gortázar, C., 2008. Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Vet. Microbiol.* 126, 251–256.
- Soma, T., Taharaguchi, S., Ohinata, T., Ishii, H., Hara, M., 2013. Analysis of the VP2 protein gene of canine parvovirus strains from affected dogs in Japan. *Res. Vet. Sci.* 94, 368–371.
- Spibey, N., Greenwood, N.M., Sutton, D., Chalmers, W.S.K., Tarpey, I., 2008. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128, 48–55.
- Stander, N., Wagner, W.M., Goddard, A., Kirberger, R.M., 2010. Ultrasonographic appearance of canine parvoviral enteritis in puppies. *Vet. Radiol. Ultrasound* 51, 69–74.
- Stann, S.E., Di Giacomo, R.F., Giddens, W.E., Evermann, J.F., 1984. Clinical and pathologic features of parvoviral diarrhea in pound-source dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 651–5.
- Stavisky, J.H., Gaskell, R.M., Dawson, S., German, A., Parsons, B., Clegg, S.R., Newman, J., Pinchbeck, G., 2011. A case-control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. *Prev. Vet. Med.* 99, 185–192.
- Steinel, A., Venter, E.H., Van Vuuren, M., Parrish, C.R., Truyen, U., 1998. Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65, 239–242.

- Steinel, A., Munson, L., van Vuuren, M., Truyen, U., 2000. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J. Gen. Virol.* 81, 345–350.
- Steinel, A., Parrish, C.R., Bloom, M.E., Truyen, U., 2001. Parvovirus infections in wild carnivores. *J. Wildl. Dis.* 37, 594–607.
- Strasheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198, 175–184.
- Streck, A.F., De Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Zang, L., Pinto, L.D., Canal, C.W., 2009. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 40, 465–469.
- Strimmer, K., von Haeseler, A., 2009. Genetic distances and nucleotide substitution models, in: *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (Eds.), Cambridge University Press, 111–141.
- Stuetzer, B., Hartmann, K., 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet. J.* 201, 150–155.
- Sung, M.H., Chen, T.M., Yang, Y.C., Lu, Y.T., Hsu, M.Y., Liang, M., Chen, K.H., Chao, D.Y., Lan, Y.C., 2017. Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2a and 2b among shelter dogs — the new recombination in virus. *Taiwan Vet. J.* 43, 47–53.
- Sutton, D., Vinberg, C., Gustafsson, A., Pearce, J., Greenwood, N.M., 2013. Canine parvovirus type 2c identified from an outbreak of severe gastroenteritis in a litter in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 55, 64.
- Sykes, J.E., 2013. Canine parvovirus infections and other viral enteritides, in: *Canine and Feline Infectious Diseases*. 141–151.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3), 585–595.
- Tattersall, P., 2006. The evolution of parvovirus taxonomy, in: *Parvoviruses. Section A Virus Groups and Evolution of the Family*. Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., Parrish, C.R. (Eds.), Edward Arnold Ltd, 5–15.
- Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M.E., Brown, K.E., Linden, R.M., Muzyczka, N., Parrish, C.R., Tijssen, P., 2005. Family Parvoviridae, in: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C., International Committee on Taxonomy of Viruses. (Eds.), Elsevier/Academic Press, San Diego, 353–369.
- Timurkan, M.Ö., Oğuzoğlu, T.Ç., 2015. Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) infection in dogs in Turkey. *Vet. Ital.* 51, 39–44.
- Touihri, L., Bouzid, I., Daoud, R., Desario, C., El Goulli, A.F., Decaro, N., Ghorbel, A., Buonavoglia, C., Bahloul, C., 2009. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes* 38, 249–258.
- Tratschin, J.-D., McMaster, G.K., Kronauer, G., Siegl, G., 1982. Canine parvovirus: relationship to wild-type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. *J. Gen. Virol.* 61, 33–41.
- Truyen, U., 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 47–50.
- Truyen, U., 2006. Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9–13.
- Truyen, U., Parrish, C.R., 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 66, 5399–5408.
- Truyen, U., Agbandje-McKenna, M., Parrish, C.R., 1994a. Characterization of the Feline Host Range and a Specific Epitope of Feline Panleukopenia Virus. *Virology* 200, 494–503.
- Truyen, U., Platzer, G., Parrish, C.R., Hänichen, T., Hermanns, W., Kaaden, O.R., 1994b. Detection of Canine Parvovirus DNA in Paraffin-Embedded Tissues by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Ser. B* 41, 148–152.
- Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S.F., Obermaier, B., Veijalainen, P., Parrish, C.R., 1995. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J. Virol.* 69, 4702–4710.

- Truyen, U., Parrish, C.R., 1995. The evolution and control of parvovirus host ranges. *Semin. Virol.* 6, 311–317.
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996a. Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range. *Virology* 215, 186–189.
- Truyen, U., Platzer, G., Parrish, C.R., 1996b. Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.* 138, 365–366.
- Truyen, U., Müller, T., Heidrich, R., Tackmann, K., Carmichael, L.E., 1998. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiol. Infect.* 121, 433–440.
- Truyen, U., Steinel, A., Bruckner, L., Lutz, H., Möstl, K., 2000. [Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 115–119.
- Truyen, U., Parrish, C.R., 2013. Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Vet. Microbiol.* 165, 29–32.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje-McKenna, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Parrish, C.R., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456–1464.
- Tupler, T., Levy, J.K., Sabshin, S.J., Tucker, S.J., Greiner, E.C., Leutenegger, C.M., 2012. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 338–343.
- Url, A., Truyen, U., Rebel-Bauder, B., Weissenböck, H., Schmidt, P., 2003. Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3801–3805.
- Url, A., Schmidt, P., 2005. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. *Res. Vet. Sci.* 79, 57–59.
- Van den Broek, A.H.M., 1990. Serum protein electrophoresis in canine parvovirus enteritis. *Br. Vet. J.* 146, 255–259.
- Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., Vuento, M., 1997. Characterization of a Nuclear Localization Signal of Canine Parvovirus Capsid Proteins. *Eur. J. Biochem.* 250, 389–394.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Mäkinen, P., Kakkola, L., Marjomäki, V., Vuento, M., 1998. Intracellular Route of Canine Parvovirus Entry. *J. Virol.* 72(1), 802–806.
- Wang, D., Yuan, W., Davis, I., Parrish, C.R., 1998. Nonstructural Protein-2 and the Replication of Canine Parvovirus. *Virology* 240, 273–281.
- Wang, H.C., Chen, W.D., Lin, S.L., Chan, J.P.W., Wong, M.L., 2005. Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus VP2 Gene in Taiwan. *Virus Genes* 31, 171–174.
- Wang, J., Cheng, S., Yi, L., Cheng, Y., Yang, S., Xu, H., Zhao, H., Yan, X., Wu, H., 2012. Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus. *Virol. J.* 9, 252.
- Wilkes, R.P., Lee, P.Y.A., Tsai, Y.L., Tsai, C.F., Chang, H.H., Chang, H.F.G., Wang, H.T.T., 2015. An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need. *J. Virol. Methods* 220, 35–38.
- Wilson, S., Illambas, J., Siedek, E., Stirling, C., Thomas, A., Plevová, E., Sture, G., Salt, J., 2014. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine* 32, 5420–5424.
- Woodroffe, R., Prager, K.C., Munson, L., Conrad, P.A., Dubovi, E.J., Mazet, J.A.K., 2012. Contact with Domestic Dogs Increases Pathogen Exposure in Endangered African Wild Dogs (*Lycaon pictus*). *PLoS One* 7, e30099.
- Woolford, L., Crocker, P., Bobrowski, H., Baker, T., Hemmatzadeh, F., 2017. Detection of the Canine Parvovirus 2c Subtype in Australian Dogs. *Viral Immunol.* 30, 371–376.
- Wu, H., Rossmann, M.G., 1993. The Canine Parvovirus Empty Capsid Structure. *J. Mol. Biol.* 233, 231–244.
- Wu, J., Gao, X.T., Hou, S.H., Guo, X.Y., Yang, X.S., Yuan, W.F., Xin, T., Zhu, H.F., Jia, H., 2015. Molecular epidemiological and phylogenetic analyses of canine parvovirus in domestic dogs and cats in Beijing,

2010–2013. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1305–1310.

- Xiao-ying, C., Zhi-jing, X., Zhong-peng, Z., Shi-jin, J., Hong-kun, Z., Yan-li, Z., Xing-xiao, Z., 2011. Genetic Diversity of Parvovirus Isolates from Dogs and Wild Animals in China. *J. Wildl. Dis.* 47, 1036–1039.
- Xu, J., Guo, H.C., Wei, Y.Q., Shu, L., Wang, J., Li, J.S., Cao, S.Z., Sun, S.Q., 2015. Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus Isolates from Sichuan and Gansu Provinces of China in 2011. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 91–95.
- Yang, D.K., Yoon, S.S., Byun, J.W., Lee, K.W., Oh, Y.I., Song, J.Y., 2010. Serological Survey for Canine Parvovirus Type 2a (CPV-2a) in the Stray Dogs in South Korea. *J. Bacteriol. Virol.* 40, 77.
- Yilmaz, Z., Senturk, S., 2007. Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enteritis. *J. Small Anim. Pract.* 48, 643–650.
- Yoon, S.H., Jeong, W., Kim, H., An, D.J., 2009. Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: a Bayesian approach. *Arch. Virol.* 154, 1353–1360.
- Yuan, W., Parrish, C.R., 2001. Canine Parvovirus Capsid Assembly and Differences in Mammalian and Insect Cells. *Virology* 279, 546–557.
- Yule, T.D., Roth, M.B., Dreier, K., Johnson, A.F., Palmer-Densmore, M., Simmons, K., Fanton, R., 1997. Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine* 15, 720–729.
- Zhang, R., Yang, S., Zhang, W., Zhang, T., Xie, Z., Feng, H., Wang, S., Xia, X., 2010. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes* 40, 397–402.
- Zhao, H., Wang, J., Jiang, Y., Cheng, Y., Lin, P., Zhu, H., Han, G., Yi, L., Zhang, S., Guo, L., Cheng, S., 2017. Typing of Canine Parvovirus Strains Circulating in North-East China. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 495–503.
- Zhao, Y., Lin, Y., Zeng, X., Lu, C., Hou, J., 2013. Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. *Virol. J.* 10, 272.