

مطالعه جامع شیوع پاروویروس سگ‌سانان (CPV) در ایران و مقایسه فیلوژنتیکی ناحیه ژن VP2 سویه‌های غالب ایرانی با سایر سویه‌های شایع

رضا فرجی^۱، اردشیر نجاتی جوارمی^۲، مصطفی صادقی^{۳*}، سید رضا میرایی آشتیانی^۲ و سید حمیدرضا مژگانی^۴
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، استاد و دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار ویروس‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی البرز
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱۹)

چکیده

یکی از اصلی‌ترین چالش‌هایی که این روزها گله‌داران، صاحبان سگ‌ها و یا مراکز آموزش و پرورش سگ‌های کار را تهدید می‌کند مربوط به بیماری پاروویروس (CPV) سگ‌سانان است. این ویروس در طی سال‌ها از زمان شناسایی تا کنون به انواع و سویه‌های متعددی انشقاق یافته که در نتیجه تغییرات ژنتیکی و آمینو اسیدی، تابع آن بوده و موجب شده طیف وسیعی از خانواده گوشت‌خواران را در سراسر جهان تهدید کند. بهترین راه مبارزه با تبعات این بیماری واکسیناسیون می‌باشد. لذا با توجه به عدم وجود مطالعات کافی از نحوه پراکنش و شیوع سویه‌های مختلف این ویروس که ممکن است از علل برجسته خطای واکسن و درگیری بالای سگ‌های کشور با این ویروس باشد در این تحقیق با مطالعه مولکولی و مقایسه فیلوژنتیکی سویه‌های ایرانی نسبت به سایر سویه‌های شایع جهان دریافتیم که سویه غالب شایع در کشور از نوع CPV-2a بوده و با شیوع ۲۴ درصدی و ضمن اختلاف ژنتیکی در چندین نقطه از ژن VP2 با دیگر سویه‌ها احتمالاً شاهد انتشار سویه جدیدی از این ویروس در کشور هستیم. در ضمن بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده مشخص شد که ایزوله‌های ایرانی آن سویه اختلاف توپولوژیکی نسبتاً زیادی نسبت به سویه‌های منشأ واکسن‌های تجاری رایج دارند که فرض اولیه این تحقیق را حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پاروویروس، سگ‌سانان، فیلوژنتیک، CPV-2، ژن VP2.

A comprehensive study of the prevalence of canine parvovirus (CPV-2) in Iran and phylogenetic comparison of dominant Iranian CPV-types with other global types based on VP2 gene

Reza Faraji¹, Ardeshir Nejati Javaremi², Mostafa Sadeghi^{3*}, S. Reza Miraei Ashtiani² and S. Hamid Reza Mozhgani⁴

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor in Animal Breeding & Genetics, College of Agriculture & Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Professor of Virology, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

(Received: Aug. 15, 2020 - Accepted: Oct. 10, 2020)

ABSTRACT

Nowadays one of the major challenges facing herders, dog owners, or working dog training centers is canine parvovirus (CPV-2). The virus has split into several types over the years since it discovered and resulted to genetic and amino acid changes that threaten a wide range of carnivorous around the world. The best way to avoiding the consequences of this disease is vaccination. This study were designed, due to the lack of sufficient studies on the distribution and prevalence of different types of this virus, which may be a prominent cause of vaccine errors, also because of high involvement of Iranian dogs with CPV. Molecular study and phylogenetic comparison of Iranian types compared to other types through the world showed that the dominant type of CPV-2 existed in Iran is CPV-2a with a prevalence of 24% and genetic differences in several points of VP2 gene with other types. We are probably facing to a new version of this virus in our country. In addition, based on the drawn phylogenetic tree, it was found that Iranian isolates on the other side have a relatively high topological difference compared to the origin types and conventional vaccines strain, which supports the initial hypothesis of this study.

Keywords: Canine, CPV-2, parvovirus, phylogenetic, VP2 gene.

* Corresponding author E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir

مقدمه

سگسانان دارای تاریخ تکاملی طولانی در حدود پنجاه میلیون سال هستند و از حدود ۱۲ تا ۳۰ هزار سال پیش مورد استفاده و اهلی شدن قرار گرفته‌اند که در طول این هزاران سال به دسته‌های سگ گله، سگ محافظ و سگ‌های مسابقه، شکار و غیره تمایز یافته‌اند (Wayne & Ostrander, 2007; Clutton-Brock, 2012). امروزه هزاران واحد بزرگ و حرفه‌ای پرورش و اصلاح نژاد و تربیت سگ در سرتاسر جهان مشغول به کار هستند و در دو بعد علمی و عملی، بازار بسیار بزرگ و مهمی را به وجود آورده‌اند که با اهداف بسیار مهم و متنوعی اقدام به تولید و پرورش سگ‌هایی با قابلیت‌های ویژه از جمله حفاظت، کشف مواد مخدر، امداد و غیره می‌نمایند. یکی از تهدیدات مهم و زیان‌رسان صنعت پرورش یا نگهداری سگ‌ها، بیماری‌هایی مسری و خطرناک به‌طور ویژه برای توله‌ها نظیر پاروویروس یا عفونت پاروویروس (*Parvoviridae*) است که اصطلاحاً به آن ویروس اسهال و استفراغ پاروویروس سگ نیز می‌گویند (Miranda & Thompson, 2016). این ویروس از خانواده پاروویروس‌هاست که با درگیر نمودن روده‌ها و مغز استخوان می‌تواند موجب اسهال، استفراغ و کاهش توانایی دفاعی بدن در مقابل عفونت شود. عوارض این بیماری در توله‌ها بسیار شدیدتر از بالغین است (Carman & Povey, 1985; Hoelzer et al., 2008). پاروویروس یک بیماری نوظهور است که در اواخر دهه ۷۰ میلادی شناخته شد. قبل از آن، این سویه ویروس وجود نداشت و به نظر می‌رسد در اثر ایجاد تغییراتی (جهش) در پاروو ویروس‌های دیگر حیوانات مثل گربه تبدیل به این ویروس مخصوص سگ‌ها شده است (Parker et al., 2001).

این بیماری ویروسی در تمام نقاط جهان وجود دارد اما در مناطق با آب‌وهوای گرم و مرطوب (مثل ایران) و با شروع فصل بهار و پاییز بیشتر دیده می‌شود (Luo et al., 2017). پس از ظهور CPV-2 در اواسط دهه ۱۹۸۰، سویه‌های جدیدی پدید آمده و سرعت جایگزین سویه اولیه ویروس CPV-2 شدند. CPV-2c نیز همانند سویه‌های قبلی علایمی چون اسهال‌های

مخاطی و یا هموراژیک، لکوپنی و لنفوپنی را بروز می‌دهد (Kapil et al., 2007; Hong et al., 2007). با توجه به این حقیقت که ویروس دائماً در شرف تغییر ژنتیکی و به تبع آن مستعد تغییر در رفتار بیماری‌زایی است، واضح است که مطالعه مستمر و رصد دوره‌ای ویروس به ما کمک خواهد کرد تا ضمن شناسایی ابعاد مختلف بیماری‌زایی آن قابلیت اقدام جهت پیش‌گیری و یا درمان بیماری ناشی از آن را افزایش دهیم.

بهترین روش مقابله با پاروویروس، واکسیناسیون به‌موقع توله‌سگ‌ها می‌باشد (Miranda & Thompson, 2016). مادرانی که ایمنی در برابر پاروویروس را از طریق واکسیناسیون یا مبتلا شدن به بیماری قبلاً به دست آورده‌اند، می‌توانند پادزهر (آنتی‌بادی) بیماری را از طریق شیر در ۲۴ ساعت ابتدایی شیردهی به توله‌ها انتقال دهند (Parrish, 1999). توله سگ‌های واکسینه نشده چندین برابر بیشتر از واکسینه شده‌ها در معرض خطر ابتلا به بیماری قرار دارند (Decaro et al., 2006). این در حالی است که استفاده از واکسن‌ها نیز به‌طور کامل مصونیت علیه بیماری ایجاد نمی‌کند و یا گاهی اوقات مشاهده شده خطای واکسن یا درصد ابتلا به بیماری پس از واکسیناسیون بیش از انتظار بروز می‌کند (Raj et al., 2010). این خطا معلول عوامل متعددی از جمله شرایط ژنتیکی و محیطی حیوان (نژاد، سن، جنس و غیره)، شرایط ژنتیکی و محیطی واکسن (سویه ویروس، سلامت محصول، عملکرد آن و غیره) و خطای تکنیکی کار است. در کشور ما احتمالاً عوامل دوم یعنی عوامل مربوط به ژنتیک و نوع واکسن بیشتر اهمیت دارد، چرا که تأمین واکسن به‌ویژه در حیطة سگ کاملاً وابسته به خارج است و طبیعی است که واکسن‌های وارداتی از سویه‌های ویروسی، کیلومترها دورتر از شرایط بومی کشور ما تهیه شده است (Nandi et al., 2013). لذا در این تحقیق بر آن شده‌ایم تا با مقایسه ژنوم و مشخصات ژنتیکی پاروویروس‌های بیماری‌زای داخلی در سگ‌های داخل کشور با ژنوم و مشخصات ژنتیکی سویه‌های واکسن و شایع دنیا که عموماً توسط دامداران و دامپزشکان کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد، بتوانیم به‌طور روشن وجود یا عدم وجود اختلاف ژنتیکی و سویه‌ای بین

مشخصات جدول ۱ طراحی شده (یک ناحیه ۱۶۰ جفت بازی مقاوم و مشترک بین تمام سویه‌ها که از ناحیه باز شماره ۳۱۳۶ تا ۳۲۹۵ ژنوم پاروویروس را تکثیر خواهد نمود) انتخاب، و از لحاظ کیفی و تکثیر تخصصی مورد بررسی قرار گرفت و سپس سفارش داده شد (Nandi et al., 2009).

تعیین سویه ویروس‌ها به روش ابداعی Decaro et al. (2006) انجام شد که شامل مراحل ذیل بود: طراحی پرایمر و پروب‌ها بر اساس SNP‌های متفاوت بین سویه 2a و 2b (4062A→G) و بین 2b و 2c (4064T→A) که مسئول بروز آمینواسید آسپارژین، آسپارات و گلوتامات به ترتیب در تیپ‌های 2a، 2b و 2c در ناحیه کپسید پروتئینی VP2 ویروس پاروو صورت گرفت. پروب‌های MGB در ناحیه ۵' به وسیله FAM ویژه تیپ 2b و VIC ویژه تیپ 2a و 2c نشان‌گذاری شدند. آزمایش RealTime-PCR بر اساس تکنولوژی MGB ویژه تیپ‌های 2a، 2b و 2c به وسیله دستگاه BioRad مدل CFX96 انجام شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار تشخیص توالی مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش در یک مخلوط ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر DNA استاندارد یا نمونه، ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط سوپرمیکس مخصوص واکنش و ۹۰۰ نانومول پرایمرهای موردنیاز و ۲۰۰ نانومول پروب‌های مذکور بود. چرخه دمایی به صورت فعال‌سازی iTaq DNA polymerase در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ چرخه تکراری شامل واسرشت‌سازی با دمای ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه و اتصال و بسط با دمای ۶۰ درجه در یک دقیقه انجام گرفت (Decaro et al., 2010).

پس از جمع‌آوری داده‌ها و نتایج قطعی استخراج و تشخیص پاروو در هر منطقه تمامی داده‌ها در برنامه Excel 2016 گردآوری و مرتب‌سازی شد و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای محاسباتی آماری میزان شیوع و پراکندگی پاروویروس در کشور مورد ارزیابی قرار گرفت.

پاروویروس‌های خارجی و داخلی و علت احتمالی خطای واکسن موجود را محرز نماییم.

مواد و روش‌ها

برای کسب حداکثری تنوع و رعایت اصول اپیدمیولوژی، از کل کشور با استفاده از فرمول $n=pqz^2/d^2$ در علوم اپیدمیولوژی (Borm et al., 2007) (n: تعداد نمونه موردنیاز، p: احتمال شیوع بر اساس مطالعات گذشته، q: 1-p، z: مقدار بحرانی متناظر با سطح اطمینان ۵٪ که معادل ۱/۹۶ می‌باشد، d: احتمال خطای ۰/۰۵) و استناد به مطالعات گذشته مبنی بر اعلام نرخ شیوع ۱۶ درصدی پاروویروس در سگ‌ها (Mosalezhad et al., 2008) دست‌کم تعداد ۲۰۶ عدد نمونه مدفوع از سگ‌های مشکوک به پاروویروس بر اساس عوامل بالینی گرفته شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ ماه از بهمن‌ماه سال ۹۶ لغایت آبان‌ماه ۹۷ از کلینیک‌های دامپزشکی و باشگاه‌های پرورشی اخذ گردید. کل کشور به پنج منطقه شامل شمال-غرب، شمال-شرق، جنوب-غرب، جنوب-شرق و مرکزی تقسیم و به ترتیب از یک تا ۵ شماره‌گذاری شد. بدین ترتیب در هر منطقه جغرافیایی دست‌کم از یک استان نمونه‌گیری انجام شد.

برای تشخیص ابتدایی آلودگی CPV از تست ایمونوکروماتوگرافی به وسیله کیت تشخیص سریع CPV (SNAP Canine Parvovirus Antigen Test, IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA) و سپس از روش استاندارد بین‌المللی PCR استفاده شد. استخراج DNA و Real-time PCR برای تشخیص واریانت ویروس بر اساس روش‌های متداول بین‌المللی نظیر TaqMan (Decaro et al., 2005) همراه با دو روش (MGB) برای تعیین واریته ویروس استفاده شد (Decaro et al., 2006).

تمامی نمونه‌ها طی دستورکار مخصوص شرکت QIAGEN مورد استخراج DNA قرار گرفتند. جهت تأیید استخراج ژنوم موردنظر، یک جفت پرایمر که با

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای تکثیر ناحیه ۱۶۰ بازی از ژن VP2

Table 1. Characteristic of Primers for amplifying 160 bp fragment of VP2

Primers name	Sequences (5'-3')	Molecular characteristic
pCPV-RT (Fw)	5'-CATTGGGCTTACCACCATTT-3'	(20 mer, position 3136 to 3155)
pCPV-RT (Rvs)	5'-CCAACCTCAGCTGGTCTCAT-3'	(20 mer, position 3276 to 3295)

ارزیابی توزیع جغرافیایی اخذ شده و مورد استفاده قرار گرفت.

عملیات ویرایش، تدوین و ارزیابی مقایسه‌ای توالی اسیدهای نوکلئیک نیز توسط نرم‌افزار BioEdit صورت گرفت. با توجه به با اهمیت بودن ناحیه VP2 در القای بیماری این ناحیه از ژنوم انتخاب شده و برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از ابزار BLAST سایت NCBI شبیه‌ترین توالی با کمترین eValue و بالاترین Score به‌عنوان ژنوم رفرنس انتخاب شد.

انطباق توالی تدوین شده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Version 7.1 (Hall *et al.*, 2011) از منطق Multiple Sequence Alignment-CLUSTALW صورت گرفت. پس از انجام انطباق محصولات انطباق یافته با فرمت FASTA وارد نرم‌افزار JModeltest V2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) شد تا با پیش آنالیز توالی‌ها بهترین مدل ممکن جهت رسم درخت فیلوژنی انتخاب و مورد استفاده قرار گیرد. در نهایت توالی‌های موردنظر وارد نرم‌افزار MEGA-X10 شده و با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood و بهترین روش جایگزینی منتخب Kimura 2-parameter و Bootstrap-Resampling با قدرت ۱۰۰۰ تحت فرایند فیلوژنی و طبقه‌بندی قرار گرفتند. روند فوق برای ارزیابی توزیع جغرافیایی نیز صورت پذیرفت با این تفاوت که از توالی‌های شاهدهی که دلالت بر ناحیه جغرافیایی دارند، استفاده شد.

ناحیه کدکننده آنتی‌ژنیک ویروس که مربوط به کپسید پروتئینی ویروس به طول حدود ۲۲۰۰ کیلوباز بود به‌وسیله روش PCR با پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ تکثیر شده و سپس جهت تأیید روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز صورت گرفته و نتایج توسط دستگاه ژل‌داک بررسی شد.

نمونه‌هایی که از کیفیت پایین‌تر از استاندارد برخوردار بودند مجدد مورد استخراج قرار گرفته و یا محصول PCR قبل از ارسال برای توالی با روش‌های تخلیص از ژل و یا به‌کمک آنزیم خالص‌سازی شدند.

جهت توالی‌یابی به‌منظور بررسی و مقایسه قطعه VP2 (حدود ۱۷۵۵ باز) که شامل ناحیه اصلی کدکننده پروتئین کپسید ویروس و القای بیماری‌زایی می‌باشد چهار پرایمر طراحی شده مورد استفاده قرار گرفت که به شرح جدول ۳ بود.

توالی‌های دریافت‌شده به‌وسیله نرم‌افزار BioEdit Version 7.1 (Hall *et al.*, 2011) مورد اصلاح هم‌ردیفی و انطباق قرار گرفت تا در نهایت برای هر نمونه توالی کامل ناحیه موردنظر آماده استفاده در مراحل بعدی انطباق، فیلوژنی و تعیین جهش‌های احتمالی گشت.

توالی‌های شاهد جهت ارزیابی فیلوژنتیکی و همچنین تعیین و مقایسه ساختار پروتئینی به‌وسیله سایت و نرم‌افزارهای آنلاین NCBI^۱ از بانک ژن Gene Bank براساس مطالعات انجام‌شده و توالی‌های ثبت‌شده در دو بعد ارزیابی ژنوتیپ و

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای تکثیر ناحیه ۲۲۰۰ بازی ژن VP1/2

Table 2. Characteristic of primers for amplifying 2200 bp fragment of VP1/2

Primers name	Sequnces (5'-3')	Molecular characteristic
CPV2161F	5'-TTGGCGTTACTCACAAAGACGTGC-3'	(24 mer, position 2158 to 2181)
CPV4823R	5'-ACCAACCACCCACACCATAACAAC-3'	(24 mer, position 4737 to 4760)

جدول ۳. مشخصات پرایمرهای تکثیر چند نقطه‌ای ژن VP2 جهت توالی

Table 3. Characteristic of primers for multiple amplifying of VP2 gene for sequencing

Primers name	Sequnces (5'-3')	Bases counts	Position
F1	AGATAGTAATAATACTATGCCATTT	25 mer	3314-3338
R1	TGGTTGGTTTCCATGGATAAAAACC	25 mer	3369-3393
R2	TTTGAATCCAATCCTTCTGGAT	25 mer	4009-4033
R3	CCTATATCAAATACAAGTACAATA	24 mer	4605-4628

نتایج و بحث

پراکندگی و شیوع پاروویروس در کشور

در بازه زمانی مشخص (۱۰ ماه) که نمونه‌گیری از سطح کشور انجام شد میزان نمونه‌های مشکوک و سپس تعداد بیماران قطعی با روش‌های تشخیصی مذکور در قسمت مواد و روش‌ها به شرح زیر بود:

از کل ۲۰۶ مشکوک به عفونت پاروویبی با علائم تب، بی‌حالی، اسهال، اسهال خونی و استفراغ به‌طور صحیح و بدون خطا مورد بررسی به‌روش PCR قرار گرفت که نشان داد در آن زمان ۴۹ قلاده از سگ‌های مشکوک به‌طور قطعی بیمار بودند. شرح کامل تعداد نمونه‌ها به تفکیک جغرافیایی شامل مناطق، استان‌ها و شهرها در جدول ۵ آورده شده و به‌صورت شماتیک روی نقشه جغرافیایی کشور مشخص شده است.

در مجموع از تمام نمونه‌های اخذ شده از کل کشور به تفکیک پنج منطقه مختلف با مختصات جغرافیایی (۱ شمال-غرب، ۲ مرکز، ۳ شمال-شرق، ۴ جنوب-غرب و ۵ جنوب-شرق؛ تعداد ۴۲ نمونه مشکوک از شهرهای منطقه یک شامل ۱۵ نمونه تبریز، ۱۴ نمونه ارومیه، شش نمونه زنجان و هفت نمونه کرمانشاه جمع‌آوری شد که تعداد بیماران قطعی به‌ترتیب ۴، ۱، ۲ و ۲ عدد نیز در کرمانشاه گزارش شد. از منطقه دوم تعداد کیس‌ها (مشکوک/مثبت قطعی) به‌ترتیب کرج (۷/۲۴)، تهران (۷/۱۹)، قم (۱/۷) و اصفهان (۳/۹) بود. در منطقه سوم نیز که نمونه‌گیری از شهرهای گرگان، مشهد و سبزوار انجام شده بود تعداد نمونه‌های مشکوک و قطعی به‌ترتیب گرگان (۲/۱۱)، مشهد (۳/۱۳) و سبزوار (۲/۹) گزارش شد. از منطقه چهارم شهرهای اهواز (۷/۲۷) و شیراز (۳/۱۲) تعداد کیس‌های مشکوک و مثبت قطعی بود. و در نهایت در منطقه پنجم کرمان ۱۹ کیس مشکوک و ۳ مثبت قطعی و زاهدان ۱۳ کیس مشکوک با ۳ کیس مثبت قطعی را به‌خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج به‌دست آمده میانگین نرخ شیوع پاروویروس در کشور در سال ۱۳۹۷-۹۸ حدود ۲۴ درصد برآورد شد. با توجه به مطالعه قبلی که نرخ شیوع را حدود ۱۶ درصد برآورد شده بود به نظر می‌آید نرخ شیوع نسبت به گذشته افزایش داشته در مطالعات متعدد بعدی نیز

می‌توان این موضوع را استنباط کرد (Dastmalchi et al., 2017; Askari Firoozjahi et al., 2011). از طرف دیگر پویایی این ویروس در تغییر ساختاری و ژنتیکی و افزایش استفاده از سال‌های اخیر به دلایل متعدد یکی دیگر از دلایل احتمالی این رخداد است. از لحاظ جغرافیایی نرخ شیوع به تفکیک هر منطقه و شهر در جدول زیر آورده شده. بیشترین نرخ شیوع مربوط به شهر تهران (۳۷ درصد) و کمترین نرخ شیوع مربوط به شهر قم (۱۴ درصد) گزارش شده.

بالاترین و پایین‌ترین میانگین نرخ شیوع با توجه به هر منطقه به‌ترتیب مربوط به منطقه دو با ۳۰ درصد و منطقه سوم ۲۱ درصد بود. به همین نحو میانگین نرخ شیوع در منطقه اول ۲۲ درصد، منطقه چهارم ۲۶ درصد و منطقه پنجم نیز ۲۲ درصد برآورد شد.

استخراج DNA و تشخیص ویروس با کمک PCR

جهت کاهش هزینه‌های تشخیص ویروس در نمونه‌ها بهترین و دقیق‌ترین روش یعنی روش واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرزاسیون مرسوم (Conventional PCR) انجام شد. این روش نسبت به روش‌های قدیمی رایج همچون تیتراسیون^۱ HA و EIA^۲ صحت و دقت بالاتری دارد (Silva et al., 2013; Decaro et al., 2005). همچنین پس از آنکه استخراج ژنوم از نمونه‌های مثبت اعلام شده توسط کیت‌های تشخیص سریع انجام شد، مشاهده شد که تعدادی از نمونه‌ها مثبت کاذب بودند و ژنوم ویروسی از آنها به‌دست نیامد. این امر احتمالاً به‌دلیل حساسیت بالای این کیت‌ها در مقابل دقت نسبتاً پایین‌تر است (Drane et al., 1994). لذا دوباره تمامی نمونه‌ها با دقت مورد استخراج ژنوم با استفاده از کیت‌های مخصوص (CADOR Qiagen)^۳ قرار گرفت، که نتیجه آن مثبت‌شدن یک نمونه که قبلاً منفی اعلام شده بود و منفی شدن چند نمونه مثبت کاذب بود (Mohyedini et al., 2013). تمامی نمونه‌ها جهت تأیید به‌دست‌آمدن ژنوم ویروس توسط تکثیر یک قطعه محافظت شده ۱۶۰ بازی مشترک در تمام سویه‌ها روی ژل آگارز تأیید شدند.

1. Hemagglutination Assay
2. Enzyme Immuno Assay
3. QIAamp cador Pathogen Mini Kit (Qiagen S.p.A., Milan, Italy)

جدول ۴. میزان و درصد شیوع پاروویروس در سگ‌های مورد مطالعه به تفکیک موقعیت مکانی و زمان در ایران

Table 4. Prevalence ratio of CPV isolated by time & zone in Iran

Zone*	City	All suspected cases	All confirmed cases	Prevalence ratio	Time (Month)
1	Tabriz	14	4	26%	October
1	Urumia	14	2	14%	September
1	Zanjan	6	1	16%	June
1	Kermanshah	7	2	28%	July
2	Karaj	24	7	29%	March
2	Tehran	19	7	37%	March
2	Qom	7	1	14%	July
2	Isfahan	9	3	33%	April
3	Gorgan	11	2	18%	October
3	Mashhad	13	3	23%	October
3	Sabzevar	9	2	22%	November
4	Ahwaz	27	7	26%	April
4	Shiraz	12	3	25%	September
5	Kerman	19	4	21%	October
5	Zahedan	13	3	23%	August
Total	Whole country	203	49	24%	9 Months

در نتیجه ۴۹ توالی مشخص یک‌دست از قطعه مورد نظر ۲۲۰۰ بازی به‌دست آمد که با هم‌ردیفی اولیه روی سایت NCBI مشخص شد بیشترین شباهت با کمترین eValue را نسبت به توالی مربوط به سویه جدید 2a گزارش شده از چین در سال ۲۰۱۸ را داشتند (Acc.No: MH545963). نتایج هم‌ردیفی و مقایسات توالی نمونه‌ها جهش‌های نوکلئوتیدی به شرح ذیل را مشخص کرد که برخی از این جهش‌ها تأثیری بر تعیین پروفایل آمینواسیدی نداشته (*Silent mutation*) ولی برخی دیگر موجب تغییر آمینواسید وحشی به نوع جهش یافته شده‌اند (*Missense mutation*): باز شماره ۲۸۳۳ (A به C) تغییر آسپارژین به ترئونین، ۲۸۳۷ (A به C) تغییر گلوتامات به آسپاراتات، ۳۰۰۰ (A به C) تغییر آسپارژین به ترئونین، ۳۰۰۱ (A به C) تغییر آسپارژین به ترئونین و تغییر آسپارژین به ترئونین، ۳۰۰۲ (A به C) تغییر آسپارژین به ترئونین تغییر آسپارژین به ترئونین، ۳۱۳۷ (A به C) بدون تغییر در ترجمه آمینواسید، ۳۷۰۷ (T به G) بدون تغییر در ترجمه آمینواسید، ۳۷۰۸ (C به G) تغییر آسپارژین به ترئونین، ۳۷۳۷ (A به G) بدون تغییر در ترجمه آمینواسید، ۳۷۳۸ (A به G) تغییر آسپارژین به ترئونین، ۴۰۶۷ (T به C) بدون تغییر در ترجمه آمینواسید، ۴۰۷۶ (A به C) بدون تغییر در ترجمه آمینواسید، و در نهایت باز شماره ۴۳۸۵ (A به G) که آن نیز بدون تغییر در ترجمه آمینواسید ایجاد شده‌اند. این در حالی

تأیید و تشخیص سویه‌های ویروس با روش RT-PCR تمامی نمونه‌ها پس از انتقال به دانشگاه آلدومورو ایتالیا مجدداً مورد ارزیابی و استخراج مواد ژنتیکی قرار گرفت و نتایج RT-PCR علاوه بر تأیید نتایج قبلی (۴۹ نمونه مثبت قطعی) مشخص کرد که تمامی نمونه‌ها با سویه 2a درگیر بوده‌اند. این سویه پس از شناسایی سویه قدیمی و اصلی CPV-2 در دهه ۸۰ میلادی تا سال ۲۰۰۰ در اکثر نقاط جهان شناسایی و گزارش شده است (Parrish *et al.*, 1988; Decaro *et al.*, 2010). در کشور ما نیز در سال‌های گذشته تعدادی مطالعه محدود شیوع و نوع این ویروس را در شهرهای ارومیه (Dastmalchi Saei *et al.*, 2017)، اهواز (Askari *et al.*, 2017)، شیراز (Namroodi *et al.*, 2017)، تهران (Firoozjahi *et al.*, 2011) و گزارش کرده‌اند که متأسفانه به بررسی مولکولی و توالی‌یابی جهت مقایسه سویه‌ها پرداخته نشده بود. ثبت توالی تمامی نمونه‌های مربوط به ژن VP2 در پایگاه آنلاین مرکز بین‌المللی داده‌های زیست فناوری (Johnson *et al.*, 2008) (NCBI) انجام شد و تمامی ۴۹ نمونه به‌ترتیب شماره دسترسی از *MT860066* تا *MT860103* را به‌خود اختصاص دادند.

تکثیر قطعه VP1/VP2، توالی‌یابی و هم‌ردیفی توالی‌ها نتایج توالی‌یابی حاصله که به‌صورت چهار قطعه مجزای ۴۵۰ تا ۶۰۰ بازی دریافت شد در نرم‌افزار *BioEdit* مورد هم‌ردیفی و چینش و اصلاح قرار گرفت.

منفرد و یا هم زمان سویه‌های *CPV-2a* و *CPV-2b* مشاهده شده است. در شمال آمریکا، به‌ویژه در ایالات متحده هر ۳ نوع *CPV-2*، توزیع هم زمان دارند. در حالی که در جنوب آمریکا *CPV-2c* شایع‌ترین واریته می‌باشد، به‌طوری‌که این مورد در مطالعات اروگوئه، برزیل و اکوادور نیز نشان داده شده است (Pedroza-Roldán *et al.*, 2015).

رسم درخت فیلوژنتیکی

درخت فیلوژنتیکی شکل ۱ که با روش گفته‌شده در قسمت مواد و روش‌ها طراحی و ترسیم شده کلید (*Clade*) مربوط به ایران را در دورترین نقطه درخت نسبت به جد مشترک پانلوکوپنیا (*panleukopenia*) به‌عنوان *Outgroup* (که به رنگ قرمز کشیده شده) و در مجاورت کلید مربوط به سویه‌های 2a منتشرشده در کشورهای شرقی نظیر چین قرار داده است. شاخه‌های سبز نشان‌دهنده تعلق به سویه 2a، شاخه‌های آبی سویه 2b، شاخه‌های بنفش رنگ سویه 2c و شاخه‌های مشکی رنگ کلید مربوط به سویه‌های قدیمی و اولیه *CPV-2* و همچنین سویه‌های منشأ اکثر واکسن‌های رایج را نشان می‌دهد. سویه 2a اولین تیپ مشتق شده از سویه اصلی قدیمی *CPV-2* بوده است که در تمامی نقاط جهان در حال انتشار است (Truyen *et al.*, 1996; Decaro *et al.*, 2010).

است که جهش‌های بازهای شماره ۳۰۰۰، ۴۰۶۷ و ۴۳۸۵ به ترتیب "A به C، C به T و C به A" به "G" در تمامی نمونه‌های ایرانی مشترک بودند. تعداد و اطلاعات کامل جایگزینی باز (جهش)ها در جدول ۶ به تفصیل آمده است.

در سال‌های گذشته به‌وسیله تحقیقات گسترده جهش‌های زیادی در این ویروس گزارش شده که برخی از مهمترین آنها موجب ایجاد آنتی‌ژن‌های جدید شد که نامگذاری‌های امروزه این سویه‌ها را رقم زده است (Parrish *et al.*, 1988). این آنتی‌ژن‌های جدید *CPV-2a* و *CPV-2b* نامیده شدند، که در آن *CPV-2a* از *CPV-2b* توسط یک جایگزینی اسید آمینه (*Asn* به *Asp*) در موقعیت ۴۲۶ پروتئین VP2 متمایز می‌شود (Parrish *et al.*, 1988). در سال ۲۰۰۰، یک نوع آنتی‌ژن جدید دیگر با نام *CPV-2c* (*Glu*) در موقعیت ۴۲۶ اضافه شده) در ایتالیا شناسایی شد (Desario *et al.*, 2005). جالب توجه می‌باشد که در عرض چند سال، این نوع جدید توانست در ایتالیا تا حدودی جانشین *CPV-2a* و *CPV-2b* شود. بر اساس آخرین ارزیابی‌ها، توزیع و تنوع ژنتیکی *CPV-2a*، *CPV-2b* و *CPV-2c* در سراسر جهان در حال نوسان است. برای مثال مطالعات نشان داده است که ۳ واریته *CPV-2* در ایتالیا، اسپانیا و آلمان توزیع همزمان دارند. در هند، کره و به‌طور عمده کشورهای آسیایی توزیع

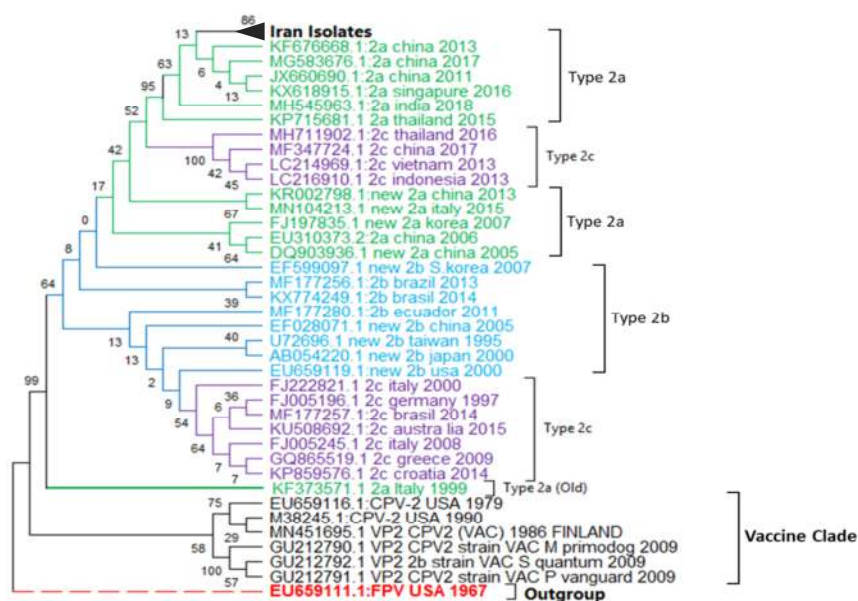
جدول ۶. اطلاعات جایگزینی بازها و تغییرات آمینواسیدها در نمونه‌های مناطق و شهرهای مختلف.

Table 6. The information of bases substitution & amino acid changes in samples of different cities.

SNP No.	Base Position on Genome	AA Position on VP2	Wild base	Mutant base	Wild AA	Mutant AA	samples	Cities	Regions	Total Num.	Percent
1	2833	17	A	C	Asn	Thr	3-9	Tabriz, Zanjan, Urumia	1	7	14
2	2837	18	A	C	Glu	Asp	5-7	Tabriz	1	3	6
3	3000	73	A	C	Met	Lue	12-25, 31, 39, 44	Karaj, Tehran, Qom, Sabzevar, Ahwaz, Kerman	2, 3, 4, 5	17	35
4	3051	90	T	C	Thr	Thr	17-20, 23, 25, 33-39, 42	Karaj, Tehran, Qom, Ahwaz, Shiraz	2, 4	14	28
5	3137	118	A	C	Gly	Gly	28, 30-32	Mashhad, Sabzevar	3	4	8
6	3707	308	T	G	Val	Val	10, 11, 17, 18, 40, 41	Karaj, Isfahan, Shiraz	2, 4	7	14
7	3708	309	C	G	Cys	Glu	10, 11, 17, 18	Karaj, Isfahan	2	4	8
8	3737	318	A	G	Cys	Cys	43-45, 47-49	Kerman, Zahedan	5	6	12
9	3738	319	A	G	Met	Val	44, 46, 48	Kerman, Zahedan	5	3	6
10	3905	374	G	C	Gly	Gly	17-20, 23, 25, 33-39, 42	Karaj, Tehran, Ahwaz, Shiraz	2, 4	13	26
11	4067	428	T	C	Asn	Asn	All samples	All cities	1-5	49	100
12	4076	431	A	C	Lue	Lue	1 & 2	Kermanshah	1	2	4
13	4385	534	A	G	Val	Val	All samples	All cities	1-5	49	100

* در برخی نواحی ژنی که درون یک کدون بیش از یک تغییر نوکلئوتیدی به‌صورت متوالی رخ داده است موجب می‌گردد که کدون دو یا سوم نسبت به تغییر یا عدم تغییر کدون قبلی اسید آمینه‌های متفاوتی را کد نماید.

In some areas of the gene that more than one nucleotide change occurs consecutively within a codon, causes the second or third codon encode to a different amino acid.



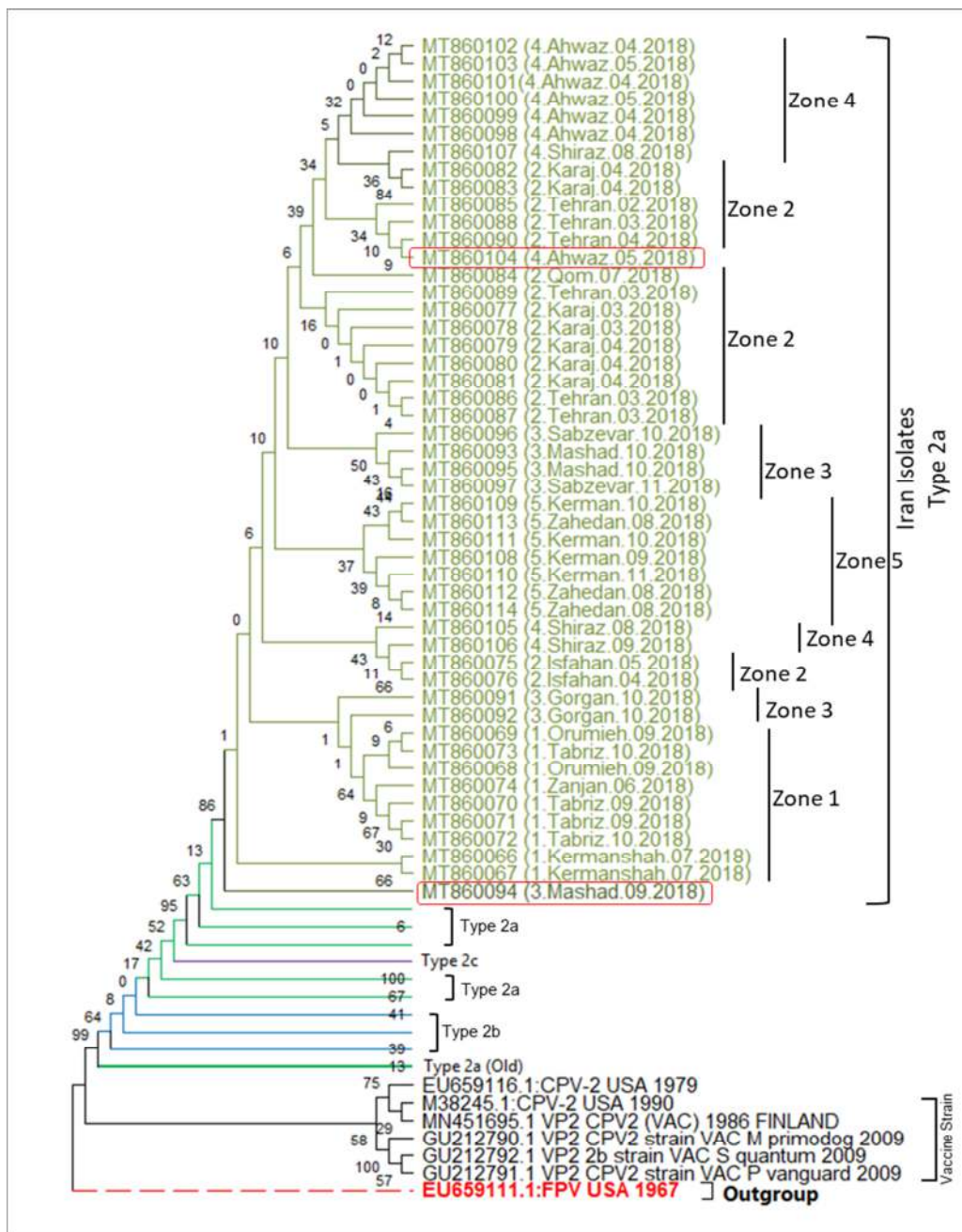
شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی ناحیه VP2 پاروویروس‌های ایرانی در کنار سایر سویه‌های شایع جهان به تفکیک موقعیت مکانی و زمانی گزارش

Figure 1. Phylogenetic tree of VP2 gene comparing all type of global circulating CPV with time & region details

مطالعات گذشته و روند تکاملی پاروویروس را تأیید می‌نماید (Decaro & Buonavoglia, 2012).

تمامی ۴۹ نمونه توالی شده از پاروویروس‌های ایرانی روی یک کلید مشخص با بیشترین فاصله تکاملی نسبت به ریشه یا *Outgroup* قرار گرفتند و تقریباً هر ۵ منطقه جغرافیایی به صورت یک کلید مجزا و مشخص با یک جد مشترک خواهری نسبت به سویه‌های 2a قابل رویت هستند. در مطالعات متعددی نتایج شبیه به تحقیق حاضر گزارش شده که نشان از نرخ شیوع بالای این ویروس در جهان داشته (Miranda & Thompson, 2016). با توجه به نرخ جهش بالا در برخی ویروس‌ها انتظار می‌رود که ویروس‌های بومی هر منطقه بیشترین شباهت ژنتیکی به همدیگر را دارا باشند (Li *et al.*, 2017). تنها یک سویه از منطقه ۳ (شهر مشهد) که در ماه نهم سال ۲۰۱۸ نمونه‌گیری شده نسبتاً مجزا از بقیه نمونه‌ها یا به تعبیری جد مشترک سایر ۴۸ نمونه که یک شاخه خواهری را درون کلید ایران به وجود آورده مشهود است. این تاکسا منطبق بر موتانت‌های دیگر مشاهده شده در سویه‌های ایرانی نیست که می‌تواند دلالت بر ایجاد سویه‌هایی جدید یا متمایز از این ویروس در کشور باشد (Nikbakhat *et al.*, 2018).

در شکل ۱ کلید مربوط به پاروویروس‌های ایرانی به صورت یک شاخه مجزا متمرکز شده تا از افزایش حجم تصویر جلوگیری کنیم. علت قرارگرفتن سویه‌های مشترک در بین کلادهای مربوط به دیگر سویه‌ها (به طور مثال سویه‌های 2c مربوط به کشورهای تایلند، چین، ویتنام و اندونزی) این حقیقت است که ما از توالی نوکلئوتیدی به عنوان ورودی اطلاعاتی جهت رسم درخت فیلوژنی استفاده کردیم و از طرفی تفکیک و نام گذاری سویه‌های مختلف به صورت قراردادی بر مبنای کمتر از ۶ تغییر بازی (جهش) است (Parrish *et al.*, 1991). این در حالی است که در طول توالی ژن VP2 که بیش از ۲ هزار باز است سیر تکاملی هر منطقه جغرافیایی به مرور زمان تعداد جانشینی‌های نوکلئوتیدی بسیاری را موجب می‌گردد. در ادامه در شکل ۲ کلید و شاخه‌های باز شده ایرانی به تفکیک منطقه و شهر و زمان با شماره دسترسی ثبت شده و تخصیص یافته به هر نمونه قابل مشاهده و بررسی می‌باشد. تایپ 2b و 2c که با یک تغییر در اسیدآمین شماره ۴۲۶ به ترتیب از اسپارژین به آسپارات و گلوتمات به وجود آمده‌اند در کلیدهای خواهری مشخص هم‌رنگ شده‌اند. این درخت تمامی



شکل ۲. بخش یا Clade درخت فیلوژنی متعلق به سویه‌های ایرانی به تفکیک موقعیت زمانی و مکانی کشور
Figure 2. Clade belong to Iranian Isolates including time & zone classification

نتیجه‌گیری

بالینی و زیست بومی جهت ساخت یا ارائه یک واکسن مناسب برای استفاده در کشور ضروری است. در آخر با توجه به تأیید وجود جهش‌های جدید ژنتیکی و پروتئینی در سویه‌های در حال انتشار ایرانی بررسی ساختار پروتئینی و نقشه‌یابی اپیتوپ‌های بیماری‌زای این سویه بومی به‌شدت موردنیاز است که این مقوله از اهداف ضمنی تحقیق حاضر بوده و نتایج آن به‌زودی منتشر می‌شود و در دسترس قرار خواهد گرفت.

با توجه به درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده بر مبنای توالی ژنتیکی سویه‌های ایرانی کاملاً مشهود است که اختلاف ژنتیکی سویه‌های شایع در کشور به‌ویژه با سویه‌های قدیمی این ویروس که اتفاقاً اکثر واکسن‌ها نیز از همین سویه‌ها تهیه گشته می‌تواند یکی از مهمترین کاندیداهای خطای واکسن‌های موجود در ایران تلقی گردد (Spibey *et al.*, 2008; Siedek *et al.*, 2011).

REFERENCES

1. Askari Firoozjahi, H., Sardar Jafari Shoorijeh, A. M. & Tamadon, A. (2011). Characterization of Iranian isolates of canine parvovirus in fecal samples using polymerase chain reaction assay. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9, 63-68.
2. Borm, G. F., Fransen, J. & Lemmens, W. A. (2007). A simple sample size formula for analysis of covariance in randomized clinical trials. *Journal of clinical epidemiology*, 60(12), 1234-1238.
3. Carman, P.S. & Povey, R.C. (1985). Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology & virus recovery. *Research in Veterinary Science*, 38, 134-40.
4. Clutton-Brock, J. (2012). *Animals as domesticates: a world view through history* (MSU Press).
5. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). J Model Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
6. Dastmalchi Saei, H., Javadi, S., Akbari, S., Hadian, N. & Zarza, E. (2017). Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) antigenic variants from healthy and diarrheic dogs in Urmia region, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(1), 9-19.
7. Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A. L., Camero, M., Manna, L., d'Aloja, D. , ... & Buonavoglia, C. (2006). First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(10), 468-472.
8. Decaro, N. & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus-a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary microbiology*, 155(1), 1-12.
9. Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E. & Buonavoglia, C. (2005). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*, 33(4), 261-267.
10. Decaro, N., Desario, C., Beall, M. J., Cavalli, A., Campolo, M., DiMarco, A. A. Amorisco, F., Colaianni, M.L. & Buonavoglia, C. (2010). Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *The Veterinary Journal*, 184(3), 373-375.
11. 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?. *Journal of Virological Methods*, 126(1-2), 179-185.
12. Drane, D. P., Hamilton, R. C. & Cox, J. C. (1994). Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 41(3), 293-302.
13. Hall, T., Biosciences, I. & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.
14. Hoelzer, K., Shackelton, L. A., Parrish, C. R. & Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 9), 2280.
15. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(5), 535-539.
16. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. & Thomas, L. M. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36, W5-W9.
17. Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston, L., Campbell, G. & Johnson, B. (2007). Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 4044-4047.
18. 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(1), 1-13.
19. Luo, H., Li, K. & Zhang, H. (2017). Epidemiology of Canine distemper and Canine parvovirus in pet dogs in Wenzhou, China. *Indian J Anim Res*, 51(1), 159-61.
20. Miranda, C. & Thompson, G. (2016). Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*, 97(9), 2043-2057.
21. Mohyedin, S. A., Jamshidi, S., Rafati, S., Nikbakht Boroujeni, G. R., Malmasi, A., Taslimi, Y. & Akbarein, H. A. (2013). Comparison of immunochromatographic rapid test with molecular method in diagnosis of canine parvovirus. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 7(1), 57-61.
22. Mosalanezhad, B., Ghorbanipour, N. M., Avizeh, R. & Rounagh, A. (2008). Prevalence of canine parvovirus (CPV) in dihaeretic dogs referred to veterinary hospital in Ahvaz.
23. 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. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(2), 113-125.
24. Nandi, S., Chidri, S. & Kumar, M. (2009). Molecular characterization and phylogenetic analysis of a canine parvovirus isolate in India. *Veterinarni Medicina*, 54(10), 483-490.

25. Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T. K. & Ravishankar, C. (2013). Emergence of canine parvovirus-2 variants and its impact on vaccination. *World Applied Sciences Journal*, 23(10), 1366-1376.
26. Nikbakhat, G., Shahram, S. & Mohyeddini, S. (2018). Detection of a new canine parvovirus mutant in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 12(1), 1-7.
27. Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J. & Parrish, C. R. (2001). Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *Journal of Virology*, 75(8), 3896-3902.
28. Parrish, C. R. (1999). Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, 69, 29-40.
29. Parrish, C. R., Have, P., Foreyt, W. J., Evermann, J. F., Senda, M. & Carmichael, L. E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology*, 69(5), 1111-1116.
30. Pedroza-Roldán, C., Pérez-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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(1), 107-111.
31. Raj, J. M., Mukhopadhyay, H. K., Thanislass, J., Antony, P. X. & Pillai, R. M. (2010). Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(8), 1237-1241.
32. Siedek, E. M., Schmidt, H., Sture, G. H. & Raue, R. (2011). Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 124(1-2), 58-64.
33. Silva, M. M. O., Castro, T. X., Costa, E. M., Trancoso, T. A. L., Mendes-de-Almeida, F., Labarthe, N. V. & Cubel Garcia, R. C. N. (2013). Comparison of three laboratorial tests for diagnosis of canine parvovirus infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(1), 149-152.
34. 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. *Veterinary Microbiology*, 128(1-2), 48-55.
35. Truyen, U. W. E., EVERMANN, J. F., VIELER, E. & PARRISH, C. R. (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 215(2), 186-189.
36. Wayne, R. K. & Ostrander, E. A. (2007). Lessons learned from the dog genome. *TRENDS in Genetics*, 23(11), 557-567.