

بررسی و مقایسه مولکولی سویه های بومی پاروویروس با سویه های خارجی و واکسن در سگهای ایران

رضا فرجی^۱، مصطفی صادقی^{۲*}، اردشیر نجاتی جوارمی^۲، سیدرضا میرائی آشتیانی^۲

۱. دانش آموخته دکترای تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. عضو هیات علمی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

مقدمه

امروزه یکی از تهدیدات مهم و زیان رسان صنعت پرورش یا نگهداری سگها، بیماری‌هایی مسری و خطرناک به طور ویژه برای توله‌ها نظیر پاروویروس یا عفونت پارووی (Parvo) است که اصطلاحاً به آن ویروس اسهال و استفراغ پارووی سگ نیز می‌گویند (Miranda et al, 2016). پس از ظهور CPV-2 در اواسط دهه ۱۹۸۰، سویه‌های جدیدی پدید آمده و سرعت جایگزین سویه اولیه ویروس CPV-2 شدند، این آنتی‌ژن‌های جدید CPV-2a و CPV-2b نامیده شدند، که در آن CPV-2b از CPV-2a 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 (درج Glu در موقعیت ۴۲۶) 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. بهترین روش مقابله با پاروویروس، واکسیناسیون به موقع توله سگها می‌باشد. سگ بیمار باید از تمام سگ‌های دیگر (چه واکسن خورده باشد و چه واکسن نخورده باشد) حداقل تا دو هفته بعد از بهبودی جدا باشد (Miranda et al, 2016). این در حالی است که استفاده از واکسن‌ها نیز بطور کامل مصونیت علیه بیماری ایجاد نمی‌کند و یا گاهی مشاهده شده خطای واکسن یا درصد ابتلا به بیماری پس از واکسیناسیون بیش از انتظار بروز می‌کند. بدیهی است بخش عمده‌ای از خطای واکسن در سگ‌های ایران به ویژه در مورد پاروویروس به صورت ناشناخته و غیرقابل اثبات باقی مانده است. از طرفی طی مطالعات متعدد به اثبات رسیده که تفاوت‌های نوکلئوتیدی متعدد و به تبع آن، تغییر آمینواسیدی در توالی پلی‌پپتید ۲ ویروس (VP2) پاروو می‌تواند عامل مهمی در تغییر افینیته ویروس و بیماری‌زایی آن و همچنین تغییر دامنه میزبان گردد (Decaro et al, 2006). این موضوع اهمیت مطالعه مداوم و با دقت در ابعاد مولکولی و پروتئینی در این ویروس و بررسی و مقایسه آن با توجه به زمان و مکان متفاوت را می‌طلبد. لذا در این تحقیق بر آن شده‌ایم تا با مقایسه این ناحیه مهم از ژنوم و مشخصات پروتئینی پاروویروس‌های بیماری‌زای داخلی در سگ‌های داخل کشور با سویه‌های واکسن موجود در دنیا که عموماً توسط دامداران و دامپزشکان کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد، وجود یا عدم وجود اختلاف ژنتیکی و سویه‌ای بین پاروویروس‌های خارجی و داخلی و علت احتمالی خطای واکسن موجود را بررسی نماییم.

مواد و روشها

دست کم تعداد ۲۰۶ نمونه مدفوع از هر سگ مشکوک به پاروویروس بر اساس علائم بالینی نمونه‌گیری انجام شد. کل کشور به پنج منطقه شامل: شمال-غرب، شمال-شرق، جنوب-غرب، جنوب-شرق و مرکزی تقسیم و به ترتیب از یک تا ۵ شماره گذاری شد. بدین ترتیب در هر منطقه جغرافیایی دست کم از یک استان نمونه‌گیری انجام شد (شکل ۲). نمونه‌گیری بصورت سواب‌های استریل و یا نمونه کامل بافت و نسوج مدفوع در لوله‌های آزمایشی استریل انجام شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری ابتدا در ظروف حاوی یخ خشک و یا یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در اولین فرصت به فریزر ۲۰- و پس از آن جهت نگهداری بلند مدت به فریزر ۷۰- منتقل شدند. تمامی رکوردهای ثبت و ضبط شده پس از اصلاح و مرتب‌سازی در نرم افزار اکسل جمع‌آوری شده تا در نهایت جهت آنالیزهای آماری لازم، بصورت ورودی مورد نظر در نرم‌فزار آماری SAS قرار گیرد. تمامی نمونه‌ها طی دستورکار مخصوص شرکت QIAGEN مورد استخراج DNA قرار گرفتند. جهت تایید استخراج ژنوم مورد نظر، یک جفت پرایمر که با مشخصات جدول ۱ طراحی شده (یک ناحیه ۱۶۰ جفت بازی مقاوم و مشترک بین تمام سویه‌ها از ژن VP2 که از ناحیه باز شماره ۳۱۳۶ تا ۳۲۹۵ ژنوم پاروویروس را تشکیل خواهد نمود) انتخاب و مورد بررسی از لحاظ کیفی و تکثیر تخصصی قرار گرفت و سپس سفارش داده شد (Nandi et al, 2009).

جدول ۱) مشخصات مولکولی پرایمرهای رفت و برگشت برای تکثیر قطعه ۱۶۰ بازی از VP2

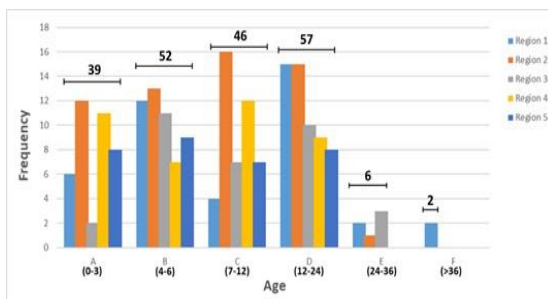
نام پرایمرها	توالی پرایمرها	مشخصات مولکولی پرایمرها
pCPV-RT (Frw)	5'-CATTGGGCTTACCACCATTT-3'	(20 mer, position 3136 to 3155)
pCPV-RT (Rvs)	5'-CCAACCTCAGCTGGTCTCAT-3'	(20 mer, position 3276 to 3295)

تعیین سویه ویروس‌ها به روش ابداعی دکارو و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام انجام گرفت (Decaro et al, 2010). ناحیه کد کننده آنتی ژنیک ویروس که مربوط به کپسید پروتئینی ویروس به طول حدود ۲۲۰۰ کیلوباز بود بوسیله روش PCR با پرایمرهای طراحی شده ذیل تکثیر شده و سپس جهت تایید روی ژل آگارز ۰.۸ درصد الکتروفورز صورت گرفته و نتایج توسط دستگاه GelDoc بررسی شد. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Primer3plus طراحی شد جهت تکثیر ژن VP2 از پرایمر رفت CPV2161F با توالی: ۵'-TTGGCGTTACTCACAAAGACGTGC-3' و برگشت CPV4823R با توالی: ۵'-ACCAACCACCCACACCATAACAAC-3' استفاده شد. سکانس ژن مورد نظر با استفاده از مرکز داده‌های ژنومی Gen Bank در پایگاه Pubmed شناسایی شد. نمونه‌ها به‌همراه پرایمرهای مورد نظر به انستیتو Zooprofilattico Sperimentale ایالت پولیا کشور ایتالیا جهت توالی‌یابی فرستاده شد. توالی‌های دریافت شده بوسیله نرم‌افزار BioEdit Version 7.1 مورد اصلاح هم‌ردیفی و انطباق قرار گرفت تا در نهایت برای هر نمونه توالی کامل ناحیه مورد نظر آماده استفاده در مراحل بعدی انطباق، فیلوژنی و تعیین موتاسیون گشت. سکانس‌های بدست آمده ژن VP2 در کنار سکانس‌های شاهد با استفاده از نرم‌افزار BioEdit به ساختمان اول ترجمه شده و تحت ارزیابی و تحلیل موتاسیون قرار گرفتند. در انتها با تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده به بررسی ساختار پروتئینی قطعات مورد نظر و مقایسه آن با سویه‌های خارجی و واکسن نمودیم تا بتوانیم علاوه بر تحلیل دلایل احتمالی شکستن واکسن پاروویروس در کشور، به یک جمع بندی کلی در مورد سویه‌های در حال گردش این ویروس و تفاوت‌های ژنتیکی و پروتئینی احتمالی آن‌ها که می‌تواند تغییر الگوی پاتوژنسیته و بیماری‌زایی را در طیف وسیعی از حیوانات گوشتخوار داخل کشور موجب گردد برسیم.

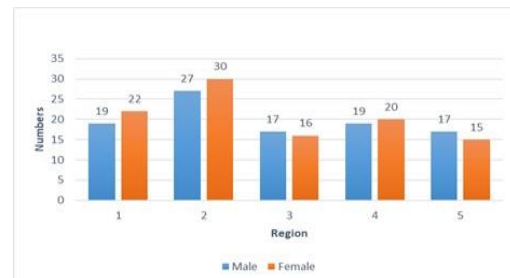
نتایج و بحث

در بازه زمانی مشخص (۱۰ ماه) که نمونه‌گیری از سطح کشور انجام شد میزان کیس‌های مشکوک و سپس تعداد بیماران قطعی با روش‌های تشخیصی مذکور در قسمت مواد و روشها به شرح زیر برآورد شد: از کل ۲۱۲ نمونه ۲۰۳ نمونه مشکوک به عفونت پاورویی با علائم تب، بی‌حالی، اسهال، اسهال خونی و استفراغ بطور صحیح و بدون خطا مورد بررسی به روش PCR قرار گرفت که نشان داد در آن زمان ۴۹ قلاده از سگ‌های مشکوک به طور قطعی بیمار بودند. جدول ۴ توزیع فراوانی علائم کلینیکال در نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. بیشترین علامت مربوط به اسهال بوده چرا که این اتفاق مهمترین عامل احتمالی درگیری پاروویروس می‌باشد (Carman et al, 1985). در مجموع از ۲۰۳ نمونه اخذ شده صحیح 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 جمع آوری شد که تعداد بیماران قطعی به ترتیب چهار، یک، ۲ و ۲ عدد در کرمانشاه گزارش شد. از منطقه دوم تعداد کیس‌ها (مشکوک-مثبت قطعی) به ترتیب کرج (۷-۲۴)، تهران (۷-۱۹)، قم (۷-۱) 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 به ترتیب 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 (شکل ۱-ج). 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 به خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج بدست آمده میانگین نرخ شیوع پاروویروس در کشور در سال ۹۸-۱۳۹۷ حدود ۲۴ درصد برآورد شد. این در حالیکه در تنها مطالعه موردی قبلی در ایران این نرخ حدود ۱۶ درصد گزارش شده بود (Mosalanezhad et al. 2008). با مطالعه نتایج متعدد بین‌المللی قبلی متوجه خواهیم شد که نمی‌توان هیچ اختلاف معنی داری را در مورد میزان شیوع این ویروس در نظر داشت چرا که همواره این نرخ بسته به زمان و موقعیت جغرافیای مناطق تحت مطالعه واریانس

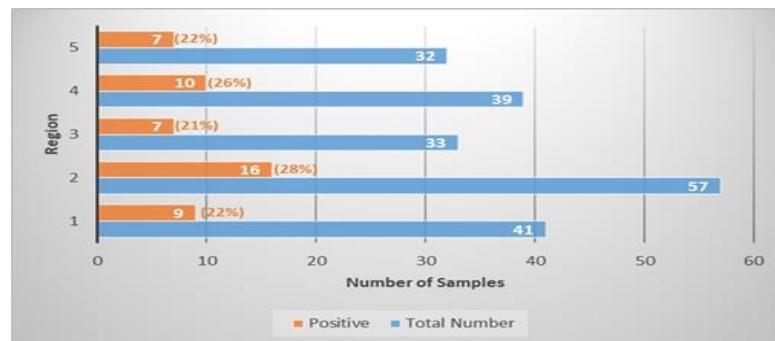
بسیار بالایی داشته و از ۱۰ تا ۹۰ درصد متغیر بوده است (Qi et al, 2020). نرخ شیوع به تفکیک جنسیت به ترتیب در نرها حدود ۲۳ درصد و در ماده‌ها حدود ۲۵ درصد برآورد گردید و همین انتظار میرفت که با توجه به نمونه‌گیری تصادفی از هردو جنس اختلاف قابل توجهی بین جنس نر و ماده در مواجهه با این بیماری وجود نداشته باشد که در اکثر مطالعات قبلی نیز نتایج مشابه بوده است (شکل ۱- الف)؛ اما با اینحال در برخی مطالعات نرخ بیماری در نرها بیشتر گزارش شده که تحت تاثیر میزان فراوانی نمونه‌برداری در این جنس بوده است (Qi et al, 2020). همچنین به تفکیک سن نرخ شیوع در رده‌های سنی زیر شش ماه حدود ۳۹ درصد، شش ماهه تا یکساله ۲۲ درصد، یک تا دو ساله حدود ۸ درصد و بیش از دو سال کمتر از ۵ درصد بود (شکل ۱- ب). این تفاوت نرخ مثبت پاروویروس در سنین کمتر در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است که می‌تواند مربوط به ضعف سیستم ایمنی در سنین زیر شش ماه و همچنین مقاومت اکتسابی ناشی از تکرار واکسن و ایمنی بیشتر سگ‌های بزرگتر باشد (Cavalli et al, 2014). 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 به ترتیب 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. مهمترین علت احتمالی تفاوت نرخ شیوع متاثر از جمعیت نمونه‌گیری و همچنین مراجعه بیشتر به کلینیک‌های دامپزشکی در شهرهای کلانی مانند تهران است. حتی این فرضیه نیز مطرح است که نرخ بالای نگهداری و مراجعه و مواجهه سگ‌ها با یکدیگر در شهرهای بزرگتر امکان افزایش انتقال و شیوع این ویروس را فراهم می‌کند.



ب) نمودار فراوانی سگ‌ها در دسته‌های مختلف سنی به تفکیک هر منطقه



الف) نمودار فراوانی سگ‌های مورد مطالعه در پنج منطقه به تفکیک جنسیت ستونهای نارنجی رنگ جنس ماده و ستونهای آبی جنس نر را نشان می‌دهند



ج) نمودار فراوانی و درصد نمونه‌های مثبت قطعی نسبت به کل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق پنجگانه

شکل ۱) نمودارهای محاسباتی درصد و فراوانی نمونه‌ها و سگ‌های مورد آزمایش

تنها منبع موثر احتمالی در میزان و شدت بیماری در سگ‌های مورد مطالعه ما دامنه سنی سگ‌ها بود که بیشترین تعداد و شدیدترین علائم مربوط به سگ‌های زیر شش ماه بود ($P > 0.01$). در اکثر مطالعات گذشته همانند این نتیجه گزارش شده و به اثبات رسیده است که حساسیت توله‌های زیر شش ماه نسبت به این بیماری بیشتر و آثار آن روی این سنین به مراتب شدیدتر و کشنده تر است (Houston et al, 1996). در مورد عوامل دیگر نظیر نژاد، منطقه نمونه برداری، جنس و فصل نمونه برداری اختلاف معناداری بین سطوح مختلف مشاهده نشد. این درحالیست که در برخی مطالعات اشاره شده که فصول بهار و پاییز احتمال افزایش شیوع بیماری بیشتر است (Qi et al, 2020). نتایج RT-PCR مشخص کرد که تمامی نمونه‌ها با سویه 2a درگیر بوده‌اند. این در حالیست که در چند مطالعه موردی در شهرهای ارومیه، اهواز، شیراز و تهران سویه‌های مختلف با نسبت‌های متفاوتی شناسایی و گزارش شده است (Dastmalchi et al, 2017). شبیه به این نتیجه در کشورهای دیگر نیز مشاهده شده؛ بعنوان مثال با وجود گزارش‌های مختلفی از حضور CPV-2c در استرالیا یک مطالعه جامع در این کشور که به بررسی شیوع سویه‌های مختلف پاروویروس در ۹ سال اخیر پرداخته هیچگونه نمونه‌ای از حضور سویه 2c را مشاهده نکردند (Mohyedini et al, 2013). جالب اینجاست که وقوع CPV-2a به تدریج گزارش شده و از سال ۲۰۱۱ به عنوان سویه اصلی در اروگوئه افزایش یافته است (Maya et al. 2013). سویه CPV-2a بصورت غالب در نیوزیلند و با شیوع ۹۸/۵٪ در کنار سویه اصلی CPV-2 با نسبت کوچک (۱/۵٪) بوده. در ژاپن CPV-2b غالب‌ترین سویه بود که بدنبال آن CPV-2a با فراوانی کمتری انجام شد. در تایوان گردش یا انتشار همزمان CPV-2a و CPV-2b با نرخ مشابهی گزارش شد (Lin et al. 2014). در چین و کره CPV-2a سویه غالبی بود و به دنبال آن CPV-2b و اخیراً انتشار CPV-2c در شمال شرقی چین مشخص شده (Geng et al. 2015). در هندوستان هر سه سویه و با غلبه CPV-2a مشخص شده است (Nandi et al., 2010). در حالیکه در مطالعه‌ی اخیر CPV-2c شناسایی نشده است. غلبه CPV-2a در کشورهای اروپایی بلغارستان (Filipov et al., 2011)، ایتالیا، انگلستان، اسپانیا، آلمان، فرانسه، بلژیک و مجارستان و پس از آن CPV-2c و CPV-2b گزارش شده است (Decaro et al. 2007). در پرتغال سویه CPV-2c غالب بود و پس از آن CPV-2b و CPV-2a با نسبت کمتری گزارش شدند (Miranda et al. 2016). در آفریقا، گزارش‌های محدودی درباره توزیع نوع CPV در این قاره وجود دارد، بطوریکه CPV-2a و CPV-2b در آفریقای جنوبی و نامیبیا شناسایی شدند (Dogonyaro et al. 1998; et al. 2013; Steinel et al. 2013). با توجه به این موضوع که در کشور ما مطالعات جامع و گسترده‌ای در زمینه شیوع و ژنوتایپینگ این ویروس وجود نداشته است و از طرفی نرخ جایگزینی سویه‌های مختلف با توجه به زمان و مکان بسیار متنوع است به نظر می‌آید. بررسی مقایسه‌ای از همترازی و انطباق توالی‌های ایران (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) یک شباهت ۹۸-۹۹٪ را با اکثر توالی‌های گزارش شده در بانک ژن نشان داد. با این حال، توالی‌ها شباهت ۹۹-۱۰۰٪ را در سطح اسید آمینه با اکثر توالی‌های گزارش شده در سرتاسر جهان، نشان دادند. پس از هم‌ردیفی و انطباق توالی‌های آماده شده ایرانی نسبت به توالی‌های سویه‌های مختلف شامل سویه اصلی CPV-2، سویه CPV-2a و CPV-2 اصلی نقاط مشترک و متفاوت سویه‌های ایرانی روی ناحیه VP2 مشخص شده است. در بررسی اولیه نقاط مهم تیبیک که در مطالعات ابتدایی گذشته اختلافات آمینواسیدی و تمایزات زیرگروهی را عامل شده در نواحی نوکلئوتیدی ژن VP2 به ترتیب در توالی A3045T (آمینواسید ۸۷)، T3088C (آمینواسید ۱۰۱)، C3685G (آمینواسید ۳۰۰)، G3699T (آمینواسید ۳۰۵)، 4062A (آمینواسید ۴۲۶) و 4449T (آمینواسید ۵۵۵) مطابق با سکانس رفرنس بود و هیچ تفاوتی در این نواحی در بین نمونه‌های ایران مشاهده نشد. یک جهش دیگر که از سال ۲۰۰۰ به بعد در دنباله شماره ۲۹۷ قطعه VP2 با جابجایی سرین به آلانین اتفاق افتاد نامگذاری جدید CPV-2a New و CPV-2b New را برای این دو سویه ایجاد کرد که امروزه بیش از ۹۰ درصد این سویه‌ها در این دسته قرار می‌گیرند (S297A) اما در اکثر مقالات به ذکر نام new یا واژه "جدید" برای این دو سویه پرداخته نمی‌شود. تمامی نمونه‌های ایرانی در قالب این سویه قرار گرفته و از نوع جدید 2a تلقی می‌گردند. نکته جالب توجه این است که در برخی نقاط دیگر کشور جانشینی نوکلئوتیدی مختلفی رخ داده است که با هیچ یک از دیگر سویه‌های خارجی تطابق نداشت و به نوعی میتوان برخی از آن‌ها را بعنوان مارکر سویه‌های ایرانی معرفی نمود و حتی برخی دیگر با توجه به اشتراک منطقه‌ای به خوبی بیانگر نرخ بالای جهش در این ویروس و تمایز منطقه‌ای آن‌ها خواهند بود.

- Carman, PS, and RC Povey. 1985. 'Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery', *Research in veterinary science*, 38: 134-40.
- Cavalli, A., et al., *Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2014. **26**(4): p. 563-566.
- Dastmalchi Saei, H., et al., *Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) antigenic variants from healthy and diarrheic dogs in Urmia region, Iran*. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 2017. **11**(1): p. 9-19.
- Decaro, Nicola, Costantina Desario, Melissa J Beall, Alessandra Cavalli, Marco Campolo, Anthony A DiMarco, Francesca Amorisco, Maria Loredana Colaianni, and Canio Buonavoglia. 2010. 'Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test', *The Veterinary Journal*, 184: 373-75.
- Desario, Costantina, Nicola Decaro, Marco Campolo, Alessandra Cavalli, Francesco Cirone, Gabriella Elia, Vito Martella, Eleonora Lorusso, Michele Camero, and Canio Buonavoglia. 2005. 'Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus?', *Journal of virological methods*, 126: 179-85.
- 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. *Veterinary microbiology*, 165(3-4), 460-465 .
- Filipov, C., Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., Sciarretta, R., & Buonavoglia, C. (2011). Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 23(1), 152-154 .
- Geng, Y., Guo, D., Li, C., Wang, E., Wei, S., Wang, Z . . . , Wang, X. (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(9), e013.
- Houston, D., C. Ribble, and L. Head, *Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991)*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1996. **208**(4): p. 542-546.
- 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. *Virology journal*, 11(1), 39 .
- Maya, L., et al., *Phylogenetic analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants*. Archives of virology, 2013. **158**(6): p. 1133-1141.
- Miranda, Carla, and Gertrude Thompson. 2016. 'Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants', *Journal of General Virology*, 97: 2043-57.
- Mohyedini, S.-a., et al., *Comparison of immunochromatographic rapid test with molecular method in diagnosis of canine parvovirus*. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 2013. **7**(1): p. 57-61.
- Mosalanezhad, Bahman, Najafabadi M ghorbanpour, R avizeh, and A Rounagh. 2008. 'prevalence of canine parvovirus (CPV) in diarrheic dogs referred to veterinary hospital in Ahvaz.'
- Nandi, S, S Chidri, and M Kumar. 2009. 'Molecular characterization and phylogenetic analysis of a canine parvovirus isolate in India', *Veterinárni medicína*, 54: 483-90.
- Parrish, Colin R, Per Have, William J Foreyt, James F Evermann, Megumi Senda, and Leland E Carmichael. 1988. 'The global spread and replacement of canine parvovirus strains', *Journal of General Virology*, 69: 1111-16.
- Qi, S., et al., *A Mini-Review on the Epidemiology of Canine Parvovirus in China*. Frontiers in veterinary science ,2020 .7 p. 5.
- Steinel, A., Parrish, C. R., Bloom, M. E., & Truyen, U. (2001). Parvovirus infections in wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), 594-607 .