



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

Corso di Dottorato in Scienze Veterinarie – XXXVIII Ciclo  
Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Cristina Cravana  
Curriculum Scienze Cliniche Veterinarie

---

**APPROCCIO ONE HEALTH ALLO STUDIO DEI VIRUS  
ENTERICI ED EPATICI DEL CANE: NUOVI MODELLI DI  
STUDIO NELL'INTERFACCIA UOMO-ANIMALE**

Tesi di Dottorato di: **Dott. FRANCESCO MIRA**

Tutor: Chiar.ma Prof. **ELISABETTA GIUDICE**

Co-Tutor: **Dott.ssa ANNALISA GUERCIO**

Settore Scientifico Disciplinare: MVET-04/B

---

anno accademico (2024/2025)

## **RIASSUNTO**

La crescente presenza di cani in ambito domestico e della necessità di gestione di questa specie animale in ambito urbano/sub-urbano rende necessaria una maggiore attenzione all'interfaccia che connette uomo ed animali e di perseguire gli obiettivi di sorveglianza e di controllo delle malattie attraverso un approccio One Health. Infatti, anche gli animali da compagnia possono rappresentare fonti di infezioni zoonotiche, fungere da ospiti intermedi tra specie animali e l'uomo, o essere considerate specie sentinella per la sorveglianza delle malattie emergenti. Attraverso un modello di studio biomolecolare multi-target dei virus classici (CPV-2, CAAdV-1 e -2, CDV, CCoV) ed emergenti (NoV ed altri calicivirus, RoV, HEV, AstV) a tropismo enterico o epatico del cane, la presente tesi di dottorato ha avuto l'obiettivo di aggiornare i dati sui ceppi circolanti, valutare le correlazioni genomiche tra i virus del cane e quelli potenzialmente rilevanti nella specie umana. È stato adottato un approccio basato sull'analisi biomolecolare dei genomi virali e dei dati ad essi associati, comparandoli con quelli disponibili in database internazionali, in relazione ai segni clinici o a lesioni d'organo, all'origine dei campioni ed alla rappresentatività temporale. I risultati hanno descritto la circolazione dei virus target nella popolazione canina, evidenziando il ruolo dei cani quali sentinelle per lo studio della loro epidemiologia ed evoluzione. Tra i risultati più rilevanti, quelli riguardanti l'evidenza di agenti zoonotici (norovirus, astrovirus e rotavirus) e le loro correlazioni con i ceppi da altre specie animali. Nel suo complesso, questo studio fornisce un contributo nella caratterizzazione multi-target di virus rilevanti per la specie e potenzialmente rilevanti nell'interfaccia uomo-animale, offrendo un modello di studio per la comprensione del ruolo degli animali da compagnia secondo una prospettiva coerente con l'approccio One Health.

**Parole chiave:** cane; virus; One Health; parvovirus del cane di tipo 2; adenovirus del cane; coronavirus enterico del cane; virus del cimurro; norovirus; calicivirus; rotavirus; astrovirus; virus dell'epatite E.

## **ABSTRACT**

The growing presence of dogs in domestic environments and the need to manage this animal species in urban/suburban environments, makes it necessary a greater attention to the human-animal interface and to promote the objectives of disease surveillance and control through a One Health approach. Indeed, even pets can represent sources of zoonotic infections, act as intermediate hosts between animal species and humans, or be considered sentinel species for the surveillance of emerging diseases. Through a multi-target biomolecular study model of classical (CPV-2, CAAdV-1 and -2, CDV, CCoV) and emerging (NoV and other caliciviruses, RoV, HEV, AstV) enteric or hepatic tropism viruses of the dog, this doctoral thesis aimed to update the data on circulating strains, evaluate the genomic correlations between dog viruses and those potentially relevant in the human species. An approach based on the biomolecular analysis of viral genomes and associated data was adopted, comparing them with those available in international databases, in relation to clinical signs or to organ lesions, the origin of the samples and their temporal representativeness. The results described the circulation of target viruses in the canine population, highlighting the role of dogs as sentinels in the study of their epidemiology and evolution. Among the most notable findings were those regarding the presence of potentially zoonotic agents (noroviruses, astroviruses, and rotaviruses) and their correlations with strains from other animal species. Overall, this study contributes to the multi-target characterization of species-relevant and potentially relevant viruses at the human-animal interface, offering a study model for understanding the role of companion animals from a perspective consistent with the One Health approach.

**Keywords:** dog; virus; One Health; canine parvovirus type 2; canine adenovirus; canine coronavirus; canine distemper virus; norovirus; calicivirus; rotavirus; astrovirus; hepatitis E virus.

## INDICE

ABBREVIAZIONI.....	2
INTRODUZIONE .....	3

### CAPITOLO I

VIRUS CLASSICI DEL CANE A TROPISMO ENTERICO ED EPATICO .....	6
Parvovirus del cane di tipo 2 .....	7
Adenovirus del cane .....	12
Coronavirus enterico del cane .....	16
Virus del cimurro.....	22
VIRUS EMERGENTI POTENZIALMENTE RILEVANTI NELL'INTERFACCIA UOMO-CANE .....	27
Norovirus – Calicivirus .....	30
Rotavirus .....	35
Astrovirus .....	39
Virus dell'epatite E .....	43
PREMESSA ALLO STUDIO .....	46

### CAPITOLO II

SCOPO DELLO STUDIO .....	48
MATERIALI E METODI .....	49
RISULTATI E CONSIDERAZIONI .....	58
VIRUS A TROPISMO ENTERICO ED EPATICO CLASSICI .....	63
Canine parvovirus type 2 (CPV-2).....	63
Canine adenovirus (CAAdV) .....	70
Canine coronavirus (CCoV).....	76
Canine distemper virus (CDV).....	91
VIRUS EMERGENTI .....	93
Norovirus (NoV) - Calicivirus.....	93
Rotavirus (RoV) .....	98
Astrovirus (AstV).....	102
Hepatitis E virus (HEV) .....	108
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	111

## ABBREVIAZIONI

<b>Pet</b>	animale domestico da compagnia
<b>CPV-2</b>	canine parvovirus type 2 (parvovirus del cane di tipo 2)
<b>CAdV-1 and -2</b>	canine adenovirus type 1 and 2 (canine adenovirus di tipo 1 e 2)
<b>CDV</b>	canine distemper virus (virus del cimurro del cane)
<b>CCoV</b>	canine coronavirus (coronavirus del cane)
<b>NoV</b>	norovirus
<b>RoV</b>	rotavirus
<b>AstV</b>	astrovirus
<b>HEV</b>	hepatitis E virus (virus dell'epatite E)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
<b>Real Time RT-PCR</b>	Real Time Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

## INTRODUZIONE

Secondo una stima del 2024, in Italia si registra una popolazione di cani di proprietà pari a circa 9 milioni di animali, una delle più numerose tra i paesi d'Europa (*Rapporto ASSALCO-ZOOMARK 2025*). Si stima infatti che oltre il 20% dei cittadini residenti in Italia possieda almeno un cane (*Diverio et al., 2016*) e che questa specie animale rappresenti il 37% tra gli animali domestici ospitati nelle case italiane (*37° Rapporto Italia 2025 dell'Eurispes*). Difatti, oggi i cani sono per lo più tenuti come animali da compagnia, essendo la relazione uomo-cane in grado di determinare effetti positivi reciproci misurabili e quindi di migliorare le condizioni sociali, emotive e fisiche delle persone (*Diverio et al., 2016; Serpell, 2003*). La crescita numerica degli animali da compagnia ed in particolare quella dei cani di proprietà è stata progressiva nel corso degli anni, con un incremento di 1,7 milioni di soggetti solamente negli ultimi quindici anni (*Rapporto ASSALCO-ZOOMARK 2022*). Appare invece ancora oggi indefinita la popolazione di cani non di proprietà/randagi, più consistente e talvolta incontrollata in alcune regioni del meridione d'Italia.

Parallelamente a questa rapida crescita ed all'evoluzione della relazione tra uomo e cane, l'attenzione è stata posta alla necessità di fornire nuovi e adeguati strumenti normativi e regolatori, soprattutto per ciò che attiene la gestione ed il contenimento della popolazione canina vagante, con particolare riferimento alle aree o regioni dove questo fenomeno è diventato e continua ancora oggi ad essere rilevante.

Inoltre, questo stretto legame tra l'uomo e la specie canina evidenzia anche la necessità di porre sempre maggiore attenzione, da un punto di vista sanitario, all'interfaccia che li connette, in funzione della crescente presenza di cani in ambito domestico e della necessità di gestione di questa specie animale in ambito urbano/sub-urbano e nelle strutture di accoglienza pubbliche e private. Infatti, anche nell'interfaccia uomo-animale si è sviluppata una crescente necessità di un approccio *One Health* alla sorveglianza ed al controllo delle malattie, in particolare per quelle a carattere zoonotico o emergenti (*Bowser et al., 2018*). L'approccio *One Health*, inteso come un approccio olistico, integrato ed unificato, ha come scopo quello di bilanciare ed ottimizzare in maniera sostenibile la salute di persone, animali ed ambiente. Questa visione integrata può contribuire ad indirizzare verso un approccio globale al controllo delle malattie note o emergenti, dalla prevenzione ed individuazione precoce alla preparazione, responsività e gestione di queste ("preparedness, response and management") (*WHO*).

La maturata relazione uomo-cane e l'approccio *One Health* rinnovano l'importanza del ruolo del medico veterinario e della ricerca scientifica in questa interfaccia. Infatti, il paradigma *One Health* riconosce l'importanza delle informazioni su malattie infettive, zoonosi e sui fattori predittivi correlati nelle popolazioni animali, ivi comprese quelle di animali domestici, talvolta poco definite, per poter adottare adeguate politiche di sanità pubblica riguardanti, tra gli altri, la progettazione di piani di sorveglianza, la gestione del benessere canino e del fenomeno del randagismo, la salvaguardia della fauna selvatica (*Carvelli et al., 2020*).

Un obiettivo chiave del paradigma *One Health* include la sorveglianza delle malattie infettive negli animali domestici e selvatici, per anticipare l'insorgenza di nuove zoonosi, attraverso sistemi di sorveglianza e

segnalazione delle malattie più efficaci che includano professionisti della salute ambientale, umana e veterinaria (Day *et al.*, 2012). Secondo questo approccio permangono però alcune lacune, in particolare la mancanza di una sorveglianza che includa gli animali da compagnia (Day *et al.*, 2012). In una prospettiva *One Health*, gli animali da compagnia possono rappresentare fonti di infezioni zoonotiche, fungere da ospiti intermedi tra la fauna selvatica e gli esseri umani, o essere considerate specie sentinella per la sorveglianza delle malattie emergenti (Halliday *et al.*, 2007).

In tal senso, un esempio è rappresentato dalla densità numerica dei cani in ambito urbano e dalla loro concentrazione nei rifugi e nei canili, fattori che forniscono condizioni ideali per la diffusione di malattie, tra cui quelle di origine virale. Infatti, l'alloggio di cani a stretto contatto nelle strutture sanitarie pubbliche e private, talvolta con storie vaccinali sconosciute o potenzialmente esposti a fonti di stress, come anche la condivisione degli spazi urbani (strade e parchi) da parte dei cani di proprietà o randagi, creano le condizioni potenziali in cui le malattie di origine virale possono essere prevalenti, diffuse e difficili da controllare (Pesavento & Murphy, 2014). A questi fattori si aggiungono quelli connessi alla movimentazione o al trasporto dei cani e relativi attrezzi di governo, che facilitano la diffusione di agenti patogeni anche a lunghe distanze, oltre a quelli relativi alle caratteristiche intrinseche di alcuni patogeni, tra cui l'elevata resistenza nell'ambiente o sulle superfici inanimate. In questo contesto, occorre considerare che alcuni virus enterici del cane (parvovirus del cane di tipo 2, virus del cimurro, coronavirus enterico, adenovirus di tipo 1) hanno uno spettro d'ospite esteso anche ad altri mammiferi domestici o selvatici, che per altri (norovirus, rotavirus) è stata evidenziata una più stretta correlazione genetica tra i ceppi umani e canini, e che per alcuni (astrovirus, virus dell'epatite E) deve ancora essere chiarito il ruolo del cane nella sua diffusione/trasmisione o il relativo potenziale zoonotico.

Pertanto, stabilita la necessità di una maggiore definizione di questi aspetti in relazione alla loro crescente rilevanza sanitaria, diventa quanto mai basilare rivolgere l'attenzione verso le malattie enteriche ed epatiche di origine virale del cane, allo scopo di approfondire le conoscenze sugli agenti patogeni coinvolti, in particolare chiarendone l'ecologia, le caratteristiche genomiche e la correlazione con altre specie virali e animali, per contribuire al contenimento della loro diffusione e trasmissione e offrire nuovi modelli di studio basati sull'evidenza scientifica.

---

37° Rapporto Italia 2025 dell'Eurispes - [https://eurispes.eu/wp-content/uploads/2025/05/eurispes\\_-\\_sintesi-37-rapporto-italia.pdf](https://eurispes.eu/wp-content/uploads/2025/05/eurispes_-_sintesi-37-rapporto-italia.pdf)  
Bowser, N.H.; Anderson, N.E. Dogs (*Canis Familiaris*) as Sentinels for Human Infectious Disease and Application to Canadian Populations: A Systematic Review. *Vet Sci* 2018, 5, 83, doi:10.3390/vetsci5040083.  
Carvelli, A.; Scaramozzino, P.; Iacoponi, F.; Condoleo, R.; Della Marta, U. Size, Demography, Ownership Profiles, and Identification Rate of the Owned Dog Population in Central Italy. *PLoS One* 2020, 15, e0240551, doi:10.1371/journal.pone.0240551.  
Day, M.J.; Breitschwerdt, E.; Cleaveland, S.; Karkare, U.; Khanna, C.; Kirpensteijn, J.; Kuiken, T.; Lappin, M.R.; McQuiston, J.; Mumford, E.; et al. Surveillance of Zoonotic Infectious Disease Transmitted by Small Companion Animals. *Emerg Infect Dis* 2012, 18, e1, doi:10.3201/eid1812.120664.  
Diverio, S.; Bocchini, B.; Menchetti, L.; Bennett, P.C. The Italian Perception of the Ideal Companion Dog. *Journal of Veterinary Behavior* 2016, 12, 27–35, doi:10.1016/j.jveb.2016.02.004.

Halliday, J.E.B.; Meredith, A.L.; Knobel, D.L.; Shaw, D.J.; Bronsvoort, B.M. de C.; Cleaveland, S. A Framework for Evaluating Animals as Sentinels for Infectious Disease Surveillance. *J R Soc Interface* 2007, 4, 973–984, doi:10.1098/rsif.2007.0237.

Pesavento, P.A.; Murphy, B.G. Common and Emerging Infectious Diseases in the Animal Shelter. *Vet Pathol* 2014, 51, 478–491, doi:10.1177/0300985813511129.

Rapporto ASSALCO-ZOOMARK 2022 - Alimentazione e cura degli animali da compagnia pet in Italia: 15 anni di cambiamenti in famiglia e in società - [https://www.assalco.it/archivio10\\_documento-generico\\_0\\_1338\\_169\\_5.html](https://www.assalco.it/archivio10_documento-generico_0_1338_169_5.html)

Rapporto ASSALCO-ZOOMARK 2025 - Alimentazione e cura degli animali da compagnia pet come elemento evolutivo della società: relazione, integrazione e diritti - [https://www.assalco.it/moduli/downloadFile.php?file=oggetto\\_documento\\_generico/2512217473100\\_\\_ORapporto+Assalco+-+Zoomark+2025+-+Sintesi.pdf](https://www.assalco.it/moduli/downloadFile.php?file=oggetto_documento_generico/2512217473100__ORapporto+Assalco+-+Zoomark+2025+-+Sintesi.pdf)

Serpell, J.A. Anthropomorphism and Anthropomorphic Selection--beyond the “Cute Response.” *Society & Animals: Journal of Human-Animal Studies* 2003, 11, 83–100, doi:10.1163/156853003321618864.

WHO. One Health. [https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1).

## CAPITOLO I

### VIRUS CLASSICI DEL CANE A TROPISMO ENTERICO ED EPATICO

Tra i molteplici virus descritti nel cane, alcuni sono una comune causa di malattia enterica, soprattutto nei soggetti più giovani, mentre per altri è stato descritto uno specifico tropismo per il tessuto epatico, come ad esempio l'adenovirus del cane di tipo 1 (specie *Canine adenovirus type 1*, CAdV-1) causa di una forma clinica di epatite (la così detta epatite di Rubarth). Ad oggi l'infezione da CAdV-1 resta l'unica forma infettiva virale del cane con una chiara e riconosciuta correlazione ad una manifestazione clinica legata a lesioni d'organo primarie a carico del tessuto epatico. Le malattie da virus a tropismo enterico sono caratterizzate da segni clinici comuni, come quelli gastroenterici, talvolta indistinguibili in relazione all'agente eziologico. Tra questi, il parvovirus del cane di tipo 2 (specie *Protoparvovirus carnivoran1*, già descritto come canine parvovirus type 2, CPV-2) ed il virus del cimurro (*Morbillivirus canis*, già descritto come canine distemper virus, CDV) sono stati segnalati frequentemente nella specie canina, mostrando una rapida diffusione globale, ridotta solo con l'uso dei vaccini. Per questi virus è stata descritta una chiara correlazione con le lesioni all'apparato gastro-enterico, o in altri distretti, e con specifici segni clinici.

Altri virus, quali il coronavirus enterico del cane (*Alphacoronavirus 1*, già descritto come canine coronavirus, CCoV) e l'adenovirus del cane di tipo 1, sono stati riportati meno frequentemente, principalmente in determinati contesti correlati alle movimentazioni di animali o di sovraffollamento, spesso in associazione con altri virus più noti come il CPV-2. Inoltre, le caratteristiche e le implicazioni cliniche e patologiche di virus come il CCoV sono ancora da approfondire.

I virus enterici hanno mostrato avere una diffusione globale e, negli ultimi anni, per alcuni di loro (CPV-2) sono stati descritti casi clinici conseguenti all'introduzione di cani importati da altre nazioni o continenti, evidenziando come la diffusione dei virus rifletta anche dinamiche legate alla globalizzazione, come già ampiamente osservato per molti virus patogeni per la specie umana.

Inoltre, la maggior parte di questi virus (CPV-2, CDV, CCoV e CAdV-1) sono stati descritti sia nei carnivori domestici che negli animali selvatici, rinnovando l'interesse nei confronti dei rapporti tra le diverse specie. È proprio questa interfaccia che assume un ruolo rilevante nel favorire la diffusione dei virus o i salti di specie, sottolineando la necessità di approfondire le conoscenze sulle infezioni nelle differenti specie animali.

Infine, la recente evidenza di casi clinici di malattia nell'uomo o in primati non umani associati a virus del cane, quali il coronavirus o il virus del cimurro, hanno rinnovato gli interrogativi sul potenziale ruolo degli animali da compagnia come reservoir o come ospiti intermedi di varianti virali soggette a mutazioni o ricombinazioni oppure esposte ad altri fattori che possano favorire la trasmissione tra specie diverse.

Le caratteristiche delle principali malattie enteriche ed epatiche del cane e dei relativi agenti infettivi di origine virale che le causano, vengono quindi di seguito descritte come base del presente studio.

## **PARVOVIRUS DEL CANE DI TIPO 2**

### **Definizione**

La parvovirosi canina o gastroenterite emorragica virale è una malattia infettiva, caratterizzata da alta morbilità e mortalità, sostenuta dal parvovirus canino di tipo 2 (canine parvovirus type 2, CPV-2). Questa malattia colpisce principalmente i cani giovani, maggiormente quelli di età compresa tra le sei settimane ed i sei mesi (*Pollock & Coyne, 1993; Marenzoni, 2023*); i cani adulti sono comunemente immuni al virus, grazie alla vaccinazione o all'infezione naturale (*Pollock & Coyne, 1993*), seppure occasionalmente siano stati riportati casi clinici anche in età avanzata. La malattia ha un decorso acuto, con segni clinici prevalentemente gastroenterici e leucopenia (*Pollock & Coyne, 1993; Marenzoni, 2023*). In passato è stata descritta anche una forma clinica di miocardite fatale in neonati, ma che risulta oggi praticamente scomparsa grazie all'immunità passiva materna che li rende refrattari all'infezione nelle prime settimane dopo la nascita (*Pollock & Coyne, 1993*).

Il CPV-2 si è evoluto come nuovo agente patogeno nei cani a partire dalla fine degli anni '70 ed ha avuto origine dal virus della panleucopenia felina (FPV) o da un virus a questo correlato (FPV-like). Questo nuovo virus ha quindi interessato una popolazione priva di protezione, causando una drammatica pandemia che ha colpito tutte le popolazioni di carnivori domestici e selvatici del mondo (*Hueffer et al., 2004; Carmichael, 2005*). Studi sierologici hanno indicato che il virus era presente in Europa già nel 1976 (*Carmichael, 2005*). Nonostante il ricorso alla profilassi vaccinale abbia notevolmente ridotto l'incidenza della parvovirosi, questa malattia ha acquisito un carattere endemico ed ancora oggi è la principale causa di malattia gastroenterica di origine virale del cane (*Marenzoni, 2023*).

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Il virus della parvovirosi canina, comunemente noto come parvovirus canino, è stato da subito definito come CPV-2, essendo il secondo parvovirus descritto nei cani, distinguibile dal CPV-1 o virus minuto del cane (oggi tassonomicamente incluso nella specie *Bocaparvovirus carnivoran1*) che è causa di riassorbimento ed aborto nelle cagne gravide (*Pollock & Coyne, 1993*). Il parvovirus del cane è oggi tassonomicamente incluso dalla International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2024) nella famiglia *Parvoviridae*, genere *Protoparvovirus*, specie *Protoparvovirus carnivoran1*.

Si tratta di un virus di piccole dimensioni (18-26 nm), tra i più piccoli conosciuti, con un capsido di simmetria icosaedrica, privo di envelope e con un genoma di DNA a filamento singolo (ssDNA) (*Marenzoni, 2023; Hoelzer & Parrish, 2010*). Il genoma di CPV-2 contiene due frame di lettura aperti (*open reading frames*, ORFs), di cui uno che codifica per le due proteine non strutturali (NS), NS1 e NS2, mentre il secondo per le due proteine strutturali, le proteine virali (VP)1 e VP2 (*Capozza et al., 2023*). Il capsido è composto da tre proteine strutturali (VP1, VP2 e VP3), di cui la VP2 è la proteina più abbondante (rappresenta il 90% del capsido virale) ed il principale determinante dello spettro d'ospite e dell'interazione virus-ospite (*Decaro & Buonavoglia, 2012*). Ci sono almeno sei o sette cambiamenti di aminoacidi tra FPV

e CPV-2, per lo più accumulati nel dominio VP2 che interagisce con il recettore della transferrina della cellula ospite (TfR) (Decaro & Buonavoglia, 2012; Martella et al., 2006), responsabili quindi dell'adattamento del virus tra le due specie. Inoltre, il CPV-2 ha da subito mostrato un tasso evolutivo maggiore rispetto a quello di FPV, simile a quello dei virus a RNA (Decaro & Buonavoglia, 2012). Questa caratteristica, insieme alla pressione immunitaria, può avere contribuito alla rapida emersione di nuove varianti del virus già nei primi anni '80, portando alla scomparsa del tipo virale originale CPV-2 (oggi presente solo in alcune formulazioni vaccinali) e la sostituzione da parte delle varianti CPV-2a e CPV-2b, a cui si è aggiunta nel 2000 la variante CPV-2c (Carmichael, 2005; Decaro & Buonavoglia, 2012; Martella et al., 2006; Buonavoglia et al., 2001). Tali varianti sono distinte tra loro da mutazioni nella sequenza che codifica per la proteina VP2, in particolare al residuo amminoacidico 426. Nel corso degli anni, studi basati sul genoma completo di CPV-2 hanno descritto diversi genotipi e lineages di CPV-2, da una parte riconducibili ad un'unica variante (CPV-2a) distinta dal tipo originale CPV-2 (Hoelzer & Parrish, 2010) e da un'altra riflettenti maggiormente l'origine geografica e quindi l'epidemiologia del virus (Grecco et al., 2018; Franzo et al., 2023; Bahoussi et al., 2022). Il CPV-2 ancora oggi ha una diffusione su scala mondiale, con continue variazioni dei genotipi circolanti a seconda delle aree geografiche e dei periodi di analisi epidemiologica (Franzo et al., 2023; Bahoussi et al., 2022; Miranda & Thompson, 2016). Le varianti di CPV-2 sono anche globalmente diffuse tra i gatti, avendo queste riacquisito la capacità di infettare questa specie rispetto al tipo CPV-2 originario, ed in molte specie di animali selvatici, principalmente ma non esclusivamente carnivori, mostrando la capacità di determinare forme asintomatiche/paucisintomatiche o con manifestazioni cliniche simili a quelle osservate nel cane (Capozza et al., 2023; Zhou et al., 2024).

### **Patogenesi**

La via di trasmissione più comune del CPV è il contatto oro-fecale, tramite contatto diretto con animali eliminatori del virus o indiretto con le loro feci, oppure con l'esposizione a materiali/strumenti (fomiti) o superfici contaminate (Zhou et al., 2024; Mylonakis et al., 2016). La trasmissione indiretta riflette le caratteristiche di elevata resistenza ambientale del virus, essendo questo estremamente resistente alle variazioni di pH e temperatura, al trattamento con solventi lipidici, tripsina e la maggior parte dei disinfettanti (Decaro & Buonavoglia, 2012). Dopo il suo ingresso, il virus replica dapprima nei tessuti linfoidei associati all'apparato gastroenterico e nel timo; successivamente, gli animali diventano viremici entro 1-5 giorni dall'esposizione (Mazzafarro, 2020; Decaro & Buonavoglia, 2012). Nei cuccioli sieronegativi di 2-3 settimane di età, il CPV è anche in grado di replicarsi nelle cellule cardiache, inducendo una miocardite fatale, sebbene questa forma non sia più osservata grazie agli anticorpi derivati dalla madre (Decaro & Buonavoglia, 2012). L'infezione dei leucociti, principalmente linfociti circolanti e associati ai tessuti, induce linfopenia acuta (Pollock, 1982; Decaro & Buonavoglia, 2012).

La moltiplicazione virale nelle cellule epiteliali intestinali in rapida divisione porta a iperdinamismo intestinale, infiammazione e necrosi tissutale, risultando in una enterite emorragica, mentre la replicazione

virale nel midollo osseo e nei tessuti linfoidei può portare a leucopenia, compromettendo ulteriormente la funzione immunitaria dell'ospite (Mylonakis et al., 2016; Decaro & Buonavoglia, 2012).

La mancanza di immunità, combinata con la batteriemia da traslocazione di batteri intestinali, espone gli animali colpiti ad un rischio elevato di sviluppare sepsi ed endotossitemia, shock settico, sindrome da risposta infiammatoria sistemica (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), insufficienza multiorgano (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) e morte (Mylonakis et al., 2016; Mazzaferro, 2020).

### **Segni clinici e Lesioni**

Dopo un periodo di incubazione che può variare da 3 a 7 giorni, in conseguenza delle lesioni al tratto gastroenterico si osserva la comparsa dei principali segni clinici quali febbre, prostrazione, inappetenza, vomito e diarrea emorragica o mucosa (Mazzaferro, 2020; Decaro & Buonavoglia, 2012). Ne consegue uno stato di disidratazione e di malassorbimento delle sostanze nutritive. La distruzione della corteccia del timo e dei precursori dei leucociti nel midollo osseo determinano una significativa leucopenia (Mazzaferro, 2020). La traslocazione di batteri intestinali o di loro tossine determina segni ed alterazioni ematologiche riferibili a shock settico, endotossitemia e SIRS.

### **Diagnosi**

La diagnosi di parvovirosi si basa comunemente sull'utilizzo di test diagnostici rapidi (test immunocromatografici), disponibili anche per la pratica ambulatoriale o per effettuare test in campo, e/o test di biologia molecolare (PCR o Real Time PCR) presso laboratori più attrezzati. I test molecolari, insieme all'analisi della sequenza di CPV-2 consentono sia la genotipizzazione del ceppo virale in esame (CPV-2 o le sue varianti CPV-2a, -2b e -2c), che la discriminazione tra i ceppi vaccinali e quelli di campo. Nell'ambito della ricerca si possono effettuare anche prove diagnostiche dirette di emoagglutinazione ed isolamento virale o anche di microscopia elettronica. I test immunocromatografici si basano comunemente su campioni fecali, mentre i test biomolecolari possono essere effettuati sia *intra-vitam* su feci, tamponi rettali o fecali, sia *post-mortem* su campioni di tessuto d'organo (più comunemente intestino, linfonodi mesenterici, milza).

La determinazione degli anticorpi anti-CPV-2 si basa su esami sierologici allestiti tramite prove di inibizione dell'emoagglutinazione oppure tramite test ELISA (su sangue, siero o plasma, in funzione delle indicazioni della casa produttrice).

### **Profilassi e Controllo**

La profilassi nei confronti della parvovirosi si basa su adeguate misure di biosicurezza finalizzate a prevenire l'introduzione e la diffusione del virus negli ambienti in cui vengono ospitati i cani, attraverso idonee pratiche di pulizia e disinfezione degli ambienti (ipoclorito di sodio) (Cavalli et al., 2018), separazione degli animali malati dai sani, gestione dei cuccioli e determinazione degli anticorpi di

derivazione materna per la programmazione della vaccinazione. Quest'ultima si basa sull'utilizzo di vaccini vivi attenuati, di cui sono disponibili in commercio diverse formulazioni allestite con ceppi CPV-2 o CPV-2b. Recentemente è stato immesso in commercio in Italia un vaccino vivo ricombinante (ceppo 630a), che esprime la proteina VP2 la cui sequenza codificante del gene ha origine da un ceppo CPV-2c. Ad oggi non sono disponibili test commerciali per la discriminazione di questo ceppo vaccinale dai ceppi di campo dello stesso genotipo.

### Terapia

Il tasso di sopravvivenza può risultare molto basso (fino al 9%) se l'animale malato non viene sottoposto ad una terapia, solitamente di tipo supportivo (Mylonakis *et al.*, 2016). Il trattamento medico si basa su fluido terapia, controllo della glicemia e dell'ipalbuminemia, trattamento antiemetico, supporto nutrizionale, analgesia, utilizzo di fattori stimolanti il midollo osseo e, se occorre, trattamento antibiotico.

### Bibliografia

- Bahoussi, A.N.; Wang, P.-H.; Ma, Z.-H.; Rani, N.; Wu, C.; Xing, L. Identification of Novel Recombinants and Proposed Standard Reference Genomes for Phylogenetic Classification of Canine Parvovirus-2 (CPV-2): Comprehensive Analysis Revealing Global Evolutionary Trait. *Front Vet Sci* 2022, 9, 1030522, doi:10.3389/fvets.2022.1030522.
- Buonavoglia, C.; Martella, V.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Cavalli, A.; Buonavoglia, D.; Bozzo, G.; Elia, G.; Decaro, N.; Carmichael, L. Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001, 82, 3021–3025, doi:10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Capozza, P.; Buonavoglia, A.; Pratelli, A.; Martella, V.; Decaro, N. Old and Novel Enteric Parvoviruses of Dogs. *Pathogens* 2023, 12, 722, doi:10.3390/pathogens12050722.
- Carmichael, L.E. An Annotated Historical Account of Canine Parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005, 52, 303–311, doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00868.x.
- Cavalli, A.; Marinaro, M.; Desario, C.; Corrente, M.; Camero, M.; Buonavoglia, C. In Vitro Virucidal Activity of Sodium Hypochlorite against Canine Parvovirus Type 2. *Epidemiol Infect* 2018, 146, 2010–2013, doi:10.1017/S0950268818002431.
- Decaro, N.; Buonavoglia, C. Canine Parvovirus--a Review of Epidemiological and Diagnostic Aspects, with Emphasis on Type 2c. *Vet Microbiol* 2012, 155, 1–12, doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.007.
- Franzo, G.; Mira, F.; Schirò, G.; Canuti, M. Not Asian Anymore: Reconstruction of the History, Evolution, and Dispersal of the “Asian” Lineage of CPV-2c. *Viruses* 2023, 15, 1962, doi:10.3390/v15091962.
- Grecco, S.; Iraola, G.; Decaro, N.; Alfieri, A.; Alfieri, A.; Gallo Calderón, M.; da Silva, A.P.; Name, D.; Aldaz, J.; Calleros, L.; et al. Inter- and Intracontinental Migrations and Local Differentiation Have Shaped the Contemporary Epidemiological Landscape of Canine Parvovirus in South America. *Virus Evol* 2018, 4, vey011, doi:10.1093/ve/vey011.
- Hoelzer, K.; Parrish, C.R. The Emergence of Parvoviruses of Carnivores. *Vet Res* 2010, 41, 39, doi:10.1051/vetres/2010011.
- Hueffer, K.; Truyen, U.; Parrish, C.R. [Evolution and host variation of the canine parvovirus: molecular basis for the development of a new virus]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2004, 117, 130–135.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2024. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202404273&taxon\\_name=Protoparvovirus%20carnivoran1](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202404273&taxon_name=Protoparvovirus%20carnivoran1)
- Marenzoni, M.L. Parvovirosi canina. In: *Malattie infettive degli animali*. Point Vétérinaire Italie: Milano, Italy, 2023; pp. 677-685.
- Martella, V.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. Evolution of CPV-2 and Implication for Antigenic/Genetic Characterization. *Virus Genes* 2006, 33, 11–13, doi:10.1007/s11262-005-0034-8.
- Mazzaferro, E.M. Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2020, 50, 1307–1325, doi:10.1016/j.cvsm.2020.07.008.

- Miranda, C.; Thompson, G. Canine Parvovirus: The Worldwide Occurrence of Antigenic Variants. *J Gen Virol* 2016, 97, 2043–2057, doi:10.1099/jgv.0.000540.
- Mylonakis, M.E.; Kalli, I.; Rallis, T.S. Canine Parvoviral Enteritis: An Update on the Clinical Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet Med (Auckl)* 2016, 7, 91–100, doi:10.2147/VMRR.S80971.
- Pollock, R.V. Experimental Canine Parvovirus Infection in Dogs. *Cornell Vet* 1982, 72, 103–119.
- Pollock, R.V.; Coyne, M.J. Canine Parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993, 23, 555–568, doi:10.1016/s0195-5616(93)50305-4.
- Zhou, H.; Cui, K.; Su, X.; Zhang, H.; Xiao, B.; Li, S.; Yang, B. Overview of Recent Advances in Canine Parvovirus Research: Current Status and Future Perspectives. *Microorganisms* 2024, 13, 47, doi:10.3390/microorganisms13010047.

## ADENOVIRUS DEL CANE

Gli adenovirus patogeni per il cane sono due distinti tipi, l'adenovirus del cane di tipo 1 (*canine adenovirus type 1*, CAAdV-1) che è responsabile dell'epatite infettiva del cane e l'adenovirus del cane di tipo 2 (*canine adenovirus type 2*, CAAdV-2) che è responsabile della tracheobronchite infettiva (Decaro et al., 2008). Questi due virus sono correlati antigenicamente e geneticamente, ma mostrano differente tropismo: CAAdV-1 colpisce le cellule endoteliali vasali e del parenchima epatico e renale, mentre CAAdV-2 replica nel tratto respiratorio e, solo limitatamente, nell'epitelio intestinale (Decaro et al., 2008; Zhu et al., 2022). In questa tesi, per le sue finalità, si intende trattare specificatamente del CAAdV-1.

### **Definizione**

L'epatite infettiva del cane (*infectious canine hepatitis*, ICH) è una malattia infettiva di origine virale descritta nei *Canidi*, *Ursidi* e *Mustelidi*, a carattere sistemico, che si manifesta con un'epatite necrotico-emorragica acuta causata dalla replicazione del CAAdV-1 nelle cellule endoteliali vascolari e negli epatociti, più grave negli animali di giovane età (Decaro et al., 2008). L'infezione da CAAdV-1 fu descritta per la prima volta agli inizi del '900 nelle volpi in Nord America e la malattia fu definita come encefalite epizootica delle volpi (Green et al., 1930). Successivamente, nel 1947, questa malattia fu descritta nei cani in Svezia dal medico veterinario Carl Swen Rubarth (Rubarth, 1947) e, per tale motivo, è ancora oggi nota anche come "epatite di Rubarth".

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Il CAAdV-1 è tassonomicamente incluso dalla International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2024) nella famiglia *Adenoviridae*, genere *Mastadenovirus*, specie *Mastadenovirus canidae*.

Si tratta di un virus di grandi dimensioni (70-90 nm), tra i più grandi virus a DNA, privo di envelope e con un capsido di simmetria icosaedrica composto da 252 capsomeri di cui 240 esoni (hexons), che formano la superficie dell'icosaedro e rappresenta la principale proteina bersaglio degli anticorpi neutralizzanti dell'ospite (Ji et al., 2020), e 12 pentoni ai vertici dell'icosaedro (Zhou et al., 2022; Balboni et al., 2025). Ciascun pentone ha una struttura proteica chiamata fibra (fiber), che è responsabile del tropismo virale (Zhu et al., 2022; Balboni et al., 2025), essendo determinante per il legame ad uno specifico recettore della superficie cellulare (Ji et al., 2020). Il capsido racchiude un genoma di DNA lineare a doppio filamento (dsDNA) (Zhu et al., 2022; Balboni et al., 2025). Il genoma include la regione E3, una regione non essenziale per la replicazione ma i cui prodotti svolgono un ruolo importante nell'inibire la difesa immunitaria antivirale dell'ospite (Zhu et al., 2022). Il numero di paia di basi della regione E3 differisce tra i due tipi di adenovirus del cane e, per tale motivo, l'amplificazione tramite PCR di questa regione determina due prodotti di differenti dimensioni, tali da consentire la discriminazione tra i due tipi virali (Hu et al., 2001), utile ai fini diagnostici.

Sebbene la vaccinazione abbia ridotto la sua diffusione, il CAAdV-1 continua ad essere rilevato nel mondo, sia in animali domestici che selvatici delle famiglie dei canidi (cani, volpi, lupi), degli ursidi e dei mustelidi (Mira et al., 2022). Anche in Italia, le sporadiche descrizioni dell'ultimo ventennio evidenziano una continua circolazione di CAAdV-1, con casi clinici correlati principalmente alla bassa copertura vaccinale nei cani da allevamento, all'importazione incontrollata di cani, alle popolazioni di cani randagi, spesso in co-infezione con altri agenti patogeni (Pratelli et al., 2001; Decaro et al., 2007, 2008; Balboni et al., 2014; Pintore et al., 2016; Mira et al., 2022), mentre sporadiche appaiono le segnalazioni in cuccioli di proprietà (Dall'Ara, 2023).

### **Patogenesi**

La via di infezione del CAAdV-1 è oro-nasale, ed avviene sia per contatto diretto con animali malati che indiretto attraverso l'esposizione a saliva, feci, urina o secrezioni respiratorie infette oppure superfici o materiali contaminate (Decaro et al., 2008). Il CAAdV-1 risulta molto resistente e quindi in grado di contaminare l'ambiente esterno. Inoltre, l'ampio spettro d'ospite del CAAdV-1, che include specie animali domestiche e selvatiche che possono condividere gli stessi ambienti, non consente di definire con chiarezza le dinamiche di trasmissione e diffusione tra questi animali in questi contesti, ivi compreso il ruolo dei cani randagi (Balboni et al., 2025). Il virus replica principalmente negli endoteli vasali e nel tessuto epatico, producendo lesioni tissutali diffuse caratterizzate da permeabilità degli endoteli (emorragie, versamenti cavitari, congestione d'organo e versamenti cavitari), da lesioni epatiche (necrosi epatica) e da alterazioni ematologiche (leucopenia, aumento delle transaminasi e disordini della coagulazione). Il tasso di mortalità risulta variabilmente basso (10-30%), sebbene co-infezioni con altri agenti patogeni possano esacerbare le manifestazioni cliniche ed il tasso di mortalità (Decaro et al., 2008; Sykes, 2013).

### **Segni clinici e Lesioni**

Il periodo di incubazione post-infezione varia tra 4 e 9 giorni. Il segno clinico più precoce è rappresentato da ipertermia (>40 °C) a decorso bifasico, seguito da depressione, perdita di appetito, vomito e diarrea, dolore e distensione addominale (per accumulo di liquido sieroso-sanguinolento e per l'aumento di volume del fegato) e, meno frequentemente, segni neurologici (associati a danno vascolare nel sistema nervoso centrale), opacità corneale (il così detto "occhio blu"), nefrite interstiziale, disturbi della coagulazione associati a coagulazione intravascolare disseminata (Decaro et al., 2008; Sykes, 2013; Zhu et al., 2022; Balboni et al., 2025).

### **Diagnosi**

La diagnosi di epatite infettiva si basa comunemente sull'utilizzo di test di laboratorio basati su prove dirette (PCR, isolamento virale su linee cellulari permissive, immunofluorescenza) su campioni di feci o di tessuti d'organo oppure su prove indirette (sieroneutralizzazione, ELISA) su emosiero per il rilievo degli anticorpi anti-adenovirus (Balboni et al., 2025). I test di PCR consentono una rapida identificazione del DNA di

CAdV e la discriminazione tra CAdV-1 ed CAdV-2. I test sierologici non consentono di discriminare gli anticorpi verso l'uno o l'altro tipo virale, né di discriminare tra gli anticorpi di derivazione vaccinale e quelli derivati da infezione naturale. Nella comune pratica clinica vengono quindi utilizzati test di laboratorio diretti, principalmente test di PCR. Inoltre, per finalità di ricerca, sono disponibili protocolli di PCR che utilizzano primers che consentono il sequenziamento dei geni Hexon e Fiber (Balboni *et al.*, 2017), al fine di valutarne la variabilità e mettere a confronto i ceppi virali.

### **Profilassi e Controllo**

La profilassi si basa principalmente sull'igiene degli ambienti, attraverso l'utilizzo di calore umido, i sali quaternari di ammonio e l'ipoclorito di sodio, e sull'utilizzo di vaccini efficaci nei confronti del CAdV-1. I primi vaccini vivi attenuati allestiti con ceppi di CAdV-1 si sono dimostrati efficaci ma talvolta associati ad episodi di nefrite interstiziale, opacità corneale o encefalite post-vaccinale. Pertanto, sono stati sostituiti con vaccini allestiti con ceppi di CAdV-2, correntemente in uso ed indicati come vaccini "core" (Dall'Ara, 2023), in grado di fornire cross-protezione nei confronti anche del CAdV-1 ma senza indurre danni renali o oculari (Decaro *et al.*, 2008).

### **Terapia**

Il trattamento medico è principalmente sintomatico e di supporto, attraverso la somministrazione di fluidi, trasfusioni di plasma o di sangue intero, utilizzo di anticoagulanti, farmaci per contrastare l'iperammoniemia attribuibile a danni epatici e renali (Greene, 1990; Decaro *et al.*, 2008; Sykes, 2013).

### **Bibliografia**

- Balboni, A.; Dondi, F.; Agnoli, C.; Verin, R.; Gruarin, M.; Morini, M.; Battilani, M. Novel Sequence Variants of Viral Hexon and Fibre Genes in Two Dogs with Canine Adenovirus Type 1-Associated Disease. *Vet J* 2017, 223, 73–75, doi:10.1016/j.tvjl.2017.05.011.
- Balboni, A.; Mollace, C.; Giunti, M.; Dondi, F.; Prospero, S.; Battilani, M. Investigation of the Presence of Canine Adenovirus (CAdV) in Owned Dogs in Northern Italy. *Res Vet Sci* 2014, 97, 631–636, doi:10.1016/j.rvsc.2014.10.010.
- Balboni, A.; Magliocca, M.; Urbani, L.; Battilani, M. Canine Adenoviruses in Wildlife: Role in At-Risk Species Conservation and Interface with Domestic Animals. *Pathogens* 2025, 14, 200, doi:10.3390/pathogens14020200.
- Dall'Ara, P. Epatite infettiva del cane. In: *Malattie infettive degli animali*. Point Vétérinaire Italie: Milano, Italy, 2023; pp. 677-676.
- Decaro, N.; Campolo, M.; Elia, G.; Buonavoglia, D.; Colaianni, M.L.; Lorusso, A.; Mari, V.; Buonavoglia, C. Infectious Canine Hepatitis: An "Old" Disease Reemerging in Italy. *Res Vet Sci* 2007, 83, 269–273, doi:10.1016/j.rvsc.2006.11.009.
- Decaro, N.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008, 38, 799–814, viii, doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.006.
- Green, R.G.; Ziegler, N.R.; Green, B.B.; Dewey, E.T. Epizootic fox encephalitis. I. General description. *Am J Epidemiol* 1930, 12, 109–129, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a115259.
- Greene, CE. Infectious canine hepatitis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. WB Saunders: Philadelphia, USA, 1990; pp. 242–51.
- Hu, R.L.; Huang, G.; Qiu, W.; Zhong, Z.H.; Xia, X.Z.; Yin, Z. Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. *Vet Res Commun* 2001, 25, 77–84, doi:10.1023/a:1006417203856.

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2024.  
[https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202402418&taxon\\_name=Mastadenovirus%20canidae](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202402418&taxon_name=Mastadenovirus%20canidae)
- Ji, J.; Li, W.; Hu, W.; Xu, X.; Kan, Y.; Yao, L.; Bi, Y.; Xie, Q. Novel Genotype Definition and the First Epidemiological Investigation of Canine Adenovirus Type 2 in Dogs in Central China. *Front Vet Sci* 2020, 7, 534, doi:10.3389/fvets.2020.00534.
- Mira, F.; Puleio, R.; Schirò, G.; Condorelli, L.; Di Bella, S.; Chiaramonte, G.; Purpari, G.; Cannella, V.; Balboni, A.; Randazzo, V.; et al. Study on the Canine Adenovirus Type 1 (CAV-1) Infection in Domestic Dogs in Southern Italy. *Pathogens* 2022, 11, 1254, doi:10.3390/pathogens11111254.
- Pintore, M.D.; Corbellini, D.; Chieppa, M.N.; Vallino Costassa, E.; Florio, C.L.; Varello, K.; Bozzetta, E.; Adriano, D.; Decaro, N.; Casalone, C.; et al. Canine Adenovirus Type 1 and *Pasteurella Pneumotropica* Co-infection in a Puppy. *Vet Ital* 2016, 52, 57–62, doi:10.12834/VetIt.270.934.1.
- Pratelli, A.; Martella, V.; Elia, G.; Tempesta, M.; Guarda, F.; Capucchio, M.T.; Carmichael, L.E.; Buonavoglia, C. Severe Enteric Disease in an Animal Shelter Associated with Dual Infections by Canine Adenovirus Type 1 and Canine Coronavirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001, 48, 385–392, doi:10.1046/j.1439-0450.2001.00466.x.
- Rubarth, S. An Acute Virus-Disease with Liver Lesion in Dogs (Hepatitis Contagiosa Canis); a Pathologico-Anatomical and Etiological Investigation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1947.
- Sykes, J.E.; Greene, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th ed.; Elsevier Health Sciences: St. Louis, MO, USA, 2013.
- Zhu, Y.; Xu, J.; Lian, S.; Zhang, R.; Hou, J.; Wang, M.; Yan, X. Difference Analysis Between Canine Adenovirus Types 1 And 2. *Front Cell Infect Microbiol* 2022, 12, 854876, doi:10.3389/fcimb.2022.854876.

## CORONAVIRUS ENTERICO DEL CANE

I coronavirus degli animali hanno uno spettro d'ospite molto ampio e, in funzione del genere, interessano numerose specie di mammiferi (uomo compreso) e di volatili. I coronavirus appartenenti ai generi *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* sono causa di infezione per lo più dei mammiferi, mentre quelli degli altri generi (*Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*) infettano principalmente gli uccelli, sebbene questa separazione talvolta non appaia ben netta, essendo stati segnalati dei salti tra animali di specie diverse (*spillover*) (Domańska-Blicharz et al., 2020).

I coronavirus noti per essere patogeni per il cane sono due, il coronavirus enterico ed il coronavirus respiratorio del cane, ed appartengono, rispettivamente, al genere *Alphacoronavirus* ed al *Betacoronavirus*. Questi due virus oltre ad appartenere a due diversi generi, mostrano ampia divergenza genetica, presentano tropismo d'organo e determinano quadri clinici ben distinti. Il coronavirus respiratorio del cane (CRCoV) è stato identificato per la prima volta nel 1978 (Binn et al., 1979) e causa malattia respiratoria da solo o, in associazione ad altri. Fa parte del complesso di patogeni che determinano la sindrome respiratoria endemica definita "malattia respiratoria infettiva canina" (*canine infectious respiratory disease*, CIRDC), precedentemente nota come tosse dei canili (Erles et al., 2003). Il coronavirus enterico ha tropismo per l'apparato gastroenterico, segnatamente l'intestino, dove causa una malattia generalmente da asintomatica a moderata, sebbene alcuni ceppi ipervirulenti abbiano causato malattia sistemica, talvolta grave. In questa tesi, per le sue finalità, si intende trattare specificatamente del coronavirus enterico del cane.

### **Definizione**

Il coronavirus enterico del cane (CCoV, talvolta definito in letteratura anche con l'acronimo CeCoV) è stato segnalato per la prima volta da un focolaio di enterite acuta in un gruppo di cani militari nel 1971 in Germania (Binn et al., 1974). Da subito si sono quindi susseguite numerose segnalazioni in tutto il mondo, definendo il carattere enzootico di questo virus nella popolazione canina. Oggi risulta essere uno dei virus enterici prevalenti nel cane (Dowgier et al., 2017) responsabile anche di enterite in carnivori selvatici (tra cui lupi e volpi) e potenzialmente in grado di colpire altri animali, in relazione al suo potenziale intrinseco di ricombinazione (Dong et al., 2022; Buonavoglia et al., 2023). Il CCoV è un patogeno enterico canino che causa comunemente un'enterite autolimitante con diarrea lieve o di maggiore rilevanza negli animali giovani, sebbene alcuni ceppi più virulenti o l'associazione con altri virus enterici possano determinare segni clinici più rilevanti, talvolta gravi e con exitus infausto.

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Il CCoV è stato tassonomicamente incluso dalla International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, <https://ictv.global/taxonomy>) in un'unica specie virale, insieme ad altri coronavirus degli animali domestici (il coronavirus del gatto, FCoV, ed i coronavirus del suino, il virus della gastroenterite trasmissibile del suino (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) ed il coronavirus respiratorio suino (porcine respiratory

coronavirus, PRCoV), denominata *Alphacoronavirus 1* (subgenere *Tegacovirus* del genere *Alphacoronavirus*) (Whittaker et al., 2018; Olarte-Castillo et al., 2025).

Si tratta di un virus di forma sferica, di grandi dimensioni (circa 100-120 nm di diametro), provvisto di envelope e con genoma a singolo filamento di RNA (ssRNA). Il genoma di CCoV è composto da una sequenza di circa 30.000 paia di basi (il più grande tra i virus a RNA) che formano una serie di finestre di lettura (open reading frames, ORFs), di cui due parzialmente sovrapposte (la ORF1a e la ORF1b) ed altre che codificano per proteine non strutturali o per le quattro proteine strutturali maggiori: la proteina spike (S), dell' envelope (E), di membrana (M) e del nucleocapside (N) (Pratelli, 2011).

Tra queste, la glicoproteina S è il principale induttore della produzione di anticorpi neutralizzanti il virus e determina la fusione del virus con la cellula ospite (Pratelli, 2011). Il gene che codifica per la proteina spike si compone di due subunità, S1 e S2, e la subunità S1 include il dominio N-terminale (NTD) e il dominio C (Tyrrell et al., 1975). Inoltre, la proteina S risulta essere la più variabile e, sulla base delle divergenze nella sequenza del gene che la codifica, sono stati distinti due differenti genotipi di CCoV: il coronavirus del cane di tipo I (canine coronavirus type I, CCoV-I) ed il coronavirus del cane di tipo II (canine coronavirus type II, CCoV-II) (Decaro & Buonavoglia, 2011). Inoltre, sulla base di studi evolutivi ed in accordo alle differenze evidenziate a livello di NTD, per il genotipo II del CCoV è stata documentata la circolazione e distinzione dei due sub-genotipi CCoV-IIa e CCoV-IIb, originati attraverso meccanismi di ricombinazioni ed evoluzioni geniche (Decaro et al., 2009; Erles e Brownlie, 2009; Pratelli et al., 2022). Questi meccanismi di ricombinazione hanno riguardato anche altri alphacoronavirus, ponendo relazioni evolutive comuni tra ceppi di CCoV e di FCoV (entrambi i genotipi FCoV-I e FCoV-II) e TGEV (correlato al CCoV-IIb). Più recentemente, è stato ipotizzato che fenomeni di ricombinazione tra CCoV-IIa e FCoV possano essere all'origine del ceppo FCoV-23, che ha causato un grande focolaio di peritonite infettiva del gatto (FIP) nell'isola di Cipro (Attipa et al., 2025). Già da prima, nel cane, infezioni miste dei due genotipi I e II di CCoV negli stessi individui potrebbero avere favorito la comparsa di ceppi con caratteristiche intermedie tra i due (Escutenaire et al., 2007; Pratelli et al., 2004; Regan et al., 2012), rafforzando l'ipotesi che questo fenomeno possa avere un ruolo importante nella generazione di nuovi ceppi virali o nuove varianti genomiche. Recentemente, sono stati inoltre descritti due ceppi virali di CCoV, di cui uno (denominato HuCCoV\_Z19Haiti) isolato dalle urine di un team medico di ritorno negli Stati Uniti d'America da Haiti (Centro America), a marzo 2017 (Lednicky et al., 2022), mentre l'altro (denominato CCoV-HuPn-2018) è stato identificato in tamponi rinofaringei di bambini con polmonite in Malesia nel 2017-2018 (Vlasova et al., 2022), evidenziando ancora una volta come anche il CCoV possa essere oggetto di mutazioni, ricombinazioni o più o meno confermati salti di specie.

Ceppi di CCoV sono stati segnalati in molti paesi del mondo, maggiormente nella popolazione canina domestica dell'Europa e, più recentemente, dell'Asia (Olarte-Castillo et al., 2025); con minore frequenza, sono stati segnalati anche in carnivori non domestici (lupo, volpe, procione) (Wang et al., 2006; Molnar et al., 2014; East et al., 2017; Alfano et al. 2019). Studi comparativi hanno evidenziato la circolazione di ceppi di CCoV con le stesse caratteristiche del genoma tra i carnivori domestici e animali selvatici.

## **Patogenesi**

L'infezione da CCoV è comune tra gli animali domestici, in particolare tra i cani ospitati in strutture o ambienti dove talvolta risulta difficile limitare i contatti diretti tra gli individui (*Stavisky et al., 2012; Licitra et al., 2014*), o tra quelli randagi. La patogenesi dell'infezione da CCoV non è ancora ben documentata, poiché solo pochi ceppi virali sono adattati alla crescita su monostrati cellulari permissivi e questo condiziona le prove sperimentali. Il virus si trasmette, direttamente o indirettamente, per via oro-fecale, essendo eliminato attraverso le feci (*Keenan et al., 1976; Roseto et al., 1980*). Dopo l'infezione, il CCoV penetra e replica nel citoplasma degli enterociti maturi (apicali e laterali) dei villi intestinali, determinando atrofia e fusione dei villi, approfondimento delle cripte intestinali, con appiattimento delle cellule epiteliali ed aumento della cellularità della lamina propria, e secrezione delle cellule calciformi. Inoltre, le attività enzimatiche intraepiteliali sono generalmente depresse (*Keenan et al., 1976; Licitra et al., 2014*). La coinfezione con altri virus enterici, descritta in molti casi, può condurre ad una sovrapposizione ed aggravamento del quadro clinico e della prognosi. L'eliminazione attraverso le feci, valutata attraverso la microscopia, perdura per 6-9 giorni dopo l'infezione (*Keenan et al., 1976*), sebbene più recenti tecniche di analisi biomolecolari abbiano rilevato l'RNA di CCoV anche fino a 6 mesi post-infezione (*Pratelli et al., 2001, 2002*). Alcuni ceppi del genotipo II possono mostrare maggiore virulenza ed il virus e le lesioni possono essere rilevate anche in organi extra-intestinali (così detto "coronavirus pantropico") (*Decaro et al., 2012*).

## **Segni clinici e Lesioni**

Il periodo di incubazione post-infezione varia tra 4-7 giorni. Esiste una forma asintomatica oppure i segni clinici possono essere di grado moderato (in particolare per il CCoV-I) e limitati al tratto gastro-enterico (*Keenan et al., 1976*). Alcuni ceppi più virulenti (CCoV pantropico) possono determinare manifestazioni cliniche di grado da moderato a grave, principalmente a carico dell'apparato gastroenterico (*Decaro e Buonavoglia, 2011*). I segni clinici associati a questi ceppi sono ipertermia (39,5–40 °C), letargia, anoressia, vomito, diarrea emorragica e segni neurologici. Inoltre, si possono riscontrare leucopenia e lesioni anche gravi a livello di tratto digerente, polmoni, fegato, milza e reni, tessuti in cui è stato rilevato l'RNA del CCoV-II (*Decaro e Buonavoglia, 2011*). In ogni caso, i segni clinici non sono specifici del CCoV, risultando comuni alla maggior parte dei virus enterici o altri quadri patologici del cane.

## **Diagnosi**

Essendo i segni clinici non specificamente riferibili all'infezione da CCoV ed in considerazione delle limitazioni nell'isolamento del virus, la diagnosi si basa sul sospetto clinico e la conferma attraverso test di laboratorio basati su prove dirette (test immunocromatografici e/o prove di RT-PCR o Real Time RT-PCR) su campioni di feci o di tessuti d'organo. Sono anche disponibili coniugati fluorescenti per le prove di immunofluorescenza; presso laboratori attrezzati, è possibile identificare il virus tramite microscopia

elettronica. Per le finalità di ricerca sono disponibili protocolli per lo studio della sequenza dei ceppi virali, attraverso prove di biologia molecolare che hanno comunemente come target il gene M ed il gene S, utili per lo studio e la comparazione del genoma di CCoV.

### **Profilassi e Controllo**

La profilassi si basa quasi esclusivamente sull'igiene degli ambienti e sulla gestione degli animali. Non sono disponibili, quantomeno in Italia, vaccini nei confronti del CCoV. In assenza di strategie profilattiche specifiche, considerata la frequenza di coinfezioni con CPV-2 e CAAdV, virus per cui esistono vaccini efficaci, e con potenziali azioni sinergiche nella patogenesi e nella depressione immunitaria, si suggerisce la profilassi vaccinale contro questi altri virus per ridurre il rischio di forme gravi.

### **Terapia**

Il trattamento medico è esclusivamente sintomatico e di supporto, attraverso la somministrazione di fluidi ed antiemetici.

### **Bibliografia**

- Alfano, F.; Fusco, G.; Mari, V.; Occhiogrosso, L.; Miletto, G.; Brunetti, R.; Galiero, G.; Desario, C.; Cirilli, M.; Decaro, N. Circulation of Pantropic Canine Coronavirus in Autochthonous and Imported Dogs, Italy. *Transbound Emerg Dis* 2020, 67, 1991–1999, doi:10.1111/tbed.13542.
- Attipa, C.; Warr, A.S.; Epaminondas, D.; O'Shea, M.; Hanton, A.J.; Fletcher, S.; Malbon, A.; Lyraki, M.; Hammond, R.; Hardas, A.; et al. Feline Infectious Peritonitis Epizootic Caused by a Recombinant Coronavirus. *Nature* 2025, 645, 228–234, doi:10.1038/s41586-025-09340-0.
- Binn, L.N.; Alford, J.P.; Marchwicki, R.H.; Keefe, T.J.; Beattie, R.J.; Wall, H.G. Studies of Respiratory Disease in Random-Source Laboratory Dogs: Viral Infections in Unconditioned Dogs. *Lab Anim Sci* 1979, 29, 48–52.
- Binn, L.N.; Lazar, E.C.; Keenan, K.P.; Huxsoll, D.L.; Marchwicki, R.H.; Strano, A.J. Recovery and Characterization of a Coronavirus from Military Dogs with Diarrhea. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 1974, 359–366.
- Buonavoglia, A.; Pellegrini, F.; Decaro, N.; Galgano, M.; Pratelli, A. A One Health Perspective on Canine Coronavirus: A Wolf in Sheep's Clothing? *Microorganisms* 2023, 11, 921, doi:10.3390/microorganisms11040921.
- Decaro, N.; Buonavoglia, C. Canine Coronavirus: Not Only an Enteric Pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011, 41, 1121–1132, doi:10.1016/j.cvsm.2011.07.005.
- Decaro, N.; Mari, V.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Camero, M.; Elia, G.; Martella, V.; Cordioli, P.; Enjuanes, L.; Buonavoglia, C. Recombinant Canine Coronaviruses Related to Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine Are Circulating in Dogs. *J Virol* 2009, 83, 1532–1537, doi:10.1128/JVI.01937-08.
- Decaro, N.; Mari, V.; von Reitzenstein, M.; Lucente, M.S.; Cirone, F.; Elia, G.; Martella, V.; King, V.L.; Di Bello, A.; Varello, K.; et al. A Pantropic Canine Coronavirus Genetically Related to the Prototype Isolate CB/05. *Vet Microbiol* 2012, 159, 239–244, doi:10.1016/j.vetmic.2012.03.039.
- Domańska-Blicharz, K.; Woźniakowski, G.; Konopka, B.; Niemczuk, K.; Welz, M.; Rola, J.; Socha, W.; Orłowska, A.; Antas, M.; Śmietanka, K.; et al. Animal Coronaviruses in the Light of COVID-19. *J Vet Res* 2020, 64, 333–345, doi:10.2478/jvetres-2020-0050.
- Dong, B.; Zhang, X.; Bai, J.; Zhang, G.; Li, C.; Lin, W. Epidemiological Investigation of Canine Coronavirus Infection in Chinese Domestic Dogs: A Systematic Review and Data Synthesis. *Prev Vet Med* 2022, 209, 105792, doi:10.1016/j.prevetmed.2022.105792.
- Dowgier, G.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Desario, C.; Mari, V.; Lucente, M.S.; Lanave, G.; Buonavoglia, C.; Elia, G. A Molecular Survey for Selected Viral Enteropathogens Revealed a Limited Role of Canine Circovirus in the Development of Canine Acute Gastroenteritis. *Vet Microbiol* 2017, 204, 54–58, doi:10.1016/j.vetmic.2017.04.007.

- East, M.L.; Moestl, K.; Benetka, V.; Pitra, C.; Höner, O.P.; Wachter, B.; Hofer, H. Coronavirus Infection of Spotted Hyenas in the Serengeti Ecosystem. *Vet Microbiol* 2004, 102, 1–9, doi:10.1016/j.vetmic.2004.04.012.
- Erles, K.; Brownlie, J. Sequence Analysis of Divergent Canine Coronavirus Strains Present in a UK Dog Population. *Virus Res* 2009, 141, 21–25, doi:10.1016/j.virusres.2008.12.009.
- Erles, K.; Toomey, C.; Brooks, H.W.; Brownlie, J. Detection of a Group 2 Coronavirus in Dogs with Canine Infectious Respiratory Disease. *Virology* 2003, 310, 216–223, doi:10.1016/s0042-6822(03)00160-0.
- Escutenaire, S.; Isaksson, M.; Renström, L.H.M.; Klingeborn, B.; Buonavoglia, C.; Berg, M.; Belák, S.; Thorén, P. Characterization of Divergent and Atypical Canine Coronaviruses from Sweden. *Arch Virol* 2007, 152, 1507–1514, doi:10.1007/s00705-007-0986-1.
- Keenan, K.P.; Jervis, H.R.; Marchwicki, R.H.; Binn, L.N. Intestinal Infection of Neonatal Dogs with Canine Coronavirus 1-71: Studies by Virologic, Histologic, Histochemical, and Immunofluorescent Techniques. *Am J Vet Res* 1976, 37, 247–256.
- Lednický, J.A.; Tagliamonte, M.S.; White, S.K.; Blohm, G.M.; Alam, M.M.; Iovine, N.M.; Salemi, M.; Mavian, C.; Morris, J.G. Isolation of a Novel Recombinant Canine Coronavirus From a Visitor to Haiti: Further Evidence of Transmission of Coronaviruses of Zoonotic Origin to Humans. *Clin Infect Dis* 2022, 75, e1184–e1187, doi:10.1093/cid/ciab924.
- Licitra, B.N.; Duhamel, G.E.; Whittaker, G.R. Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins. *Viruses* 2014, 6, 3363–3376, doi:10.3390/v6083363.
- Molnar, B.; Duchamp, C.; Möstl, K.; Diehl, P.-A.; Betschart, B. Comparative Survey of Canine Parvovirus, Canine Distemper Virus and Canine Enteric Coronavirus Infection in Free-Ranging Wolves of Central Italy and South-Eastern France. *Eur J Wildl Res* 2014, 60, 613–624, doi:10.1007/s10344-014-0825-0.
- Olarte-Castillo, X.A.; Frazier, L.E.; Gomes Noll, J.C.; Choi, A.; Whittaker, G.R. Rethinking the Drivers of Coronavirus Virulence and Pathogenesis; toward an Understanding of the Dynamic World of Mutations, Indels, and Recombination within the Alphacoronaviruses. *mBio* 2025, 16, e0192125, doi:10.1128/mbio.01921-25.
- Pratelli, A.; Elia, G.; Martella, V.; Tinelli, A.; Decaro, N.; Marsilio, F.; Buonavoglia, D.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. M Gene Evolution of Canine Coronavirus in Naturally Infected Dogs. *Vet Rec* 2002, 151, 758–761.
- Pratelli, A.; Martella, V.; Elia, G.; Tempesta, M.; Guarda, F.; Capucchio, M.T.; Carmichael, L.E.; Buonavoglia, C. Severe Enteric Disease in an Animal Shelter Associated with Dual Infections by Canine Adenovirus Type 1 and Canine Coronavirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001, 48, 385–392, doi:10.1046/j.1439-0450.2001.00466.x.
- Pratelli, A. The Evolutionary Processes of Canine Coronaviruses. *Adv Virol* 2011, 2011, 562831, doi:10.1155/2011/562831.
- Pratelli, A.; Decaro, N.; Tinelli, A.; Martella, V.; Elia, G.; Tempesta, M.; Cirone, F.; Buonavoglia, C. Two Genotypes of Canine Coronavirus Simultaneously Detected in the Fecal Samples of Dogs with Diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004, 42, 1797–1799, doi:10.1128/JCM.42.4.1797-1799.2004.
- Pratelli, A.; Tempesta, M.; Elia, G.; Martella, V.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. The Knotty Biology of Canine Coronavirus: A Worrying Model of Coronaviruses' Danger. *Res Vet Sci* 2022, 144, 190–195, doi:10.1016/j.rvsc.2021.11.014.
- Regan, A.D.; Millet, J.K.; Tse, L.P.V.; Chillag, Z.; Rinaldi, V.D.; Licitra, B.N.; Dubovi, E.J.; Town, C.D.; Whittaker, G.R. Characterization of a Recombinant Canine Coronavirus with a Distinct Receptor-Binding (S1) Domain. *Virology* 2012, 430, 90–99, doi:10.1016/j.virol.2012.04.013.
- Roseto, A.; Lema, F.; Cavalieri, F.; Dianoux, L.; Sitbon, M.; Ferchal, F.; Lasneret, J.; Peries, J. Electron Microscopy Detection and Characterization of Viral Particles in Dog Stools. *Arch Virol* 1980, 66, 89–93, doi:10.1007/BF01314977.
- Stavisky, J.; Pinchbeck, G.; Gaskell, R.M.; Dawson, S.; German, A.J.; Radford, A.D. Cross Sectional and Longitudinal Surveys of Canine Enteric Coronavirus Infection in Kennelled Dogs: A Molecular Marker for Biosecurity. *Infect Genet Evol* 2012, 12, 1419–1426, doi:10.1016/j.meegid.2012.04.010.
- Tyrrell, D.A.; Almeida, J.D.; Cunningham, C.H.; Dowdle, W.R.; Hofstad, M.S.; McIntosh, K.; Tajima, M.; Zakstelskaya, L.Y.; Easterday, B.C.; Kapikian, A.; et al. Coronaviridae. *Intervirology* 1975, 5, 76–82, doi:10.1159/000149883.
- Vlasova, A.N.; Diaz, A.; Damtie, D.; Xiu, L.; Toh, T.-H.; Lee, J.S.-Y.; Saif, L.J.; Gray, G.C. Novel Canine Coronavirus Isolated from a Hospitalized Patient With Pneumonia in East Malaysia. *Clin Infect Dis* 2022, 74, 446–454, doi:10.1093/cid/ciab456.

- Wang, Y.; Ma, G.; Lu, C.; Wen, H. Detection of Canine Coronaviruses Genotype I and II in Raised Canidae Animals in China. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2006, 119, 35–39.
- Whittaker, G.R.; André, N.M.; Millet, J.K. Improving Virus Taxonomy by Recontextualizing Sequence-Based Classification with Biologically Relevant Data: The Case of the Alphacoronavirus 1 Species. *mSphere* 2018, 3, e00463-17, doi:10.1128/mSphereDirect.00463-17.

## **VIRUS DEL CIMURRO**

### **Definizione**

Il cimurro (*canine distemper*) è una malattia virale del cane e di altri animali selvatici altamente contagiosa e spesso fatale, caratterizzata da segni respiratori, gastrointestinali e nervosi (Elia et al. 2006). Le prime segnalazioni attendibili di cimurro nei cani risalgono al 1735 in Sud America, in seguito all'introduzione del virus del morbillo con l'arrivo dei naviganti dall'Europa. Le successive epidemie di morbillo che hanno interessato le popolazioni indigene sudamericane hanno probabilmente facilitato la trasmissione del morbillo e l'adattamento del virus ai cani (Wilkes, 2022). Nel nostro continente, la malattia fu segnalata per la prima volta in Spagna nel 1761, dove probabilmente era stata introdotta attraverso le rotte di navigazione, e da lì si ritiene che si sia diffusa, probabilmente con le stesse dinamiche di diffusione, in tutto il mondo (Blancou, 2004; Karki et al., 2022), ivi compreso nel Nord America (Kennedy et al., 2019; Uhl et al., 2019). I primi studi sul cimurro, nel 1905, sono riferiti ad Henri Joseph Carré, per cui la malattia in passato è stata anche definita “malattia di Carré” (Carré, 1905; Appel e Robson, 1973). Delle malattie infettive del cane, il cimurro è probabilmente tra le più note da maggior tempo ed ancora oggi temuta. Il virus del cimurro (canine distemper virus, CDV) risulta tra i più documentati patogeni che interessano un ampio spettro d'ospite, capaci di adattamenti e ripetuti salti di specie. Un esempio è rappresentato da uno specifico lineage di CDV, il lineage Artico (Arctic-like), isolato per la prima volta alla fine degli anni '80, quando sono stati segnalati un ceppo virale (PDV-2) identificato nel 1988 nelle foche del lago Bajkal in Siberia (Russia) (Visser et al., 1990) ed un ceppo (GR88) rilevato, nello stesso anno, da una popolazione di cani da slitta nella Groenlandia settentrionale (Blixenkrone-Möller et al., 1992). Da questa area si è poi rapidamente diffuso in altre regioni e continenti lontani dall'ecosistema artico.

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Il virus del cimurro è stato tassonomicamente incluso nella specie denominata *Morbillivirus canis* (famiglia *Paramyxoviridae*, genere *Morbillivirus*) (Colina et al., 2024). Il genere include il virus del morbillo di umani e primati non umani, il virus della peste dei piccoli ruminanti di pecore e capre, il virus del morbillo delle foche e dei cetacei, ed anche il virus della peste bovina degli artiodattili, quest'ultimo ormai estinto (Wilkes, 2022).

Il CDV è un virus con envelope ed un genoma a singolo filamento di RNA (ssRNA) di circa 15.690 nucleotidi, che codifica per sei proteine strutturali e due proteine non strutturali: le proteine strutturali includono l'RNA polimerasi (L), associata alla proteina del nucleocapside (N) e ad una fosfoproteina (P), la proteina della matrice (M) e le due proteine che compongono l'-envelope, l'emoagglutinina (H) e la proteina di fusione (F) (Martella et al., 2008; Lanszki et al., 2022; Wilkes, 2022). Tra queste, la glicoproteina H è la proteina più variabile dell'-envelope e media il legame del virus ai recettori della cellula ospite durante le prime fasi dell'infezione (Martella et al., 2008; von Messling et al., 2001). In funzione di questa variabilità, i ceppi di CDV sono stati quindi raggruppati e messi in relazione tra loro secondo “lineage”, ciascuno

definito sulla base di un'identità di sequenza della proteina del gene H maggiore del 95% (*Sarute et al., 2014*). Ad oggi si riconoscono almeno 18 lineage, nominati principalmente in relazione all'area geografica dei ceppi di origine: America 1-America 5, Asia 1-Asia 4, India-1/Asia-5, Europe/South America 1, South America 2 e South America 3, Europe wildlife, Arctic, Rockborn-like, Africa 1 ed Africa 2 (*Karki et al., 2022*).

Ceppi di CDV sono stati segnalati in tutto il mondo, in cani ed in oltre 20 famiglie di carnivori e non-carnivori, secondo lineage che riflettono l'origine geografica e supportano la definizione dell'epidemiologia del virus. Essendo il CDV ampiamente diffuso tra specie animali diverse, si suppone che vi siano continue e costanti dinamiche di trasmissione che coinvolgono queste specie, senza una netta distinzione o definizione di un unico reservoir, sebbene alcuni lineage sembra che abbiano una maggiore diffusione, o quantomeno vengano più comunemente identificati, tra gli animali selvatici (ad esempio l'Europe wildlife) mentre altri nei cani (Europe/South America 1 o Arctic) che convivono negli stessi territori. In Italia sono stati segnalati tre lineage di CDV: Il primo ad essere rilevato, sia nei cani domestici che nei carnivori selvatici, è stato l'Europe/South America 1 mentre, degli altri due, il lineage Europe wildlife è stato isolato prevalentemente nella fauna selvatica e solo sporadicamente nei cani domestici, a differenza dell'Arctic che, viceversa, è stato segnalato principalmente nei cani e meno frequentemente nella fauna selvatica (*Mira et al., 2018; Guercio et al., 2023*).

### **Patogenesi**

Il CDV infetta le specie ospiti e si diffonde nei tessuti attraverso l'interazione con recettori cellulari, di cui alcuni noti (SLAM, nectin-4) e altri ancora non definiti. Dopo un periodo di incubazione variabile tra 1 e 4 settimane, la viremia iniziale determina una febbre transitoria che raggiunge il picco 3-6 giorni dopo l'infezione (*Beineke et al., 2009*). Attraverso il circolo, l'infezione si diffonde a tutti i tessuti linfoidi, determinando un'immunosoppressione generalizzata. A questa fase segue una seconda viremia, 6-9 giorni dopo l'infezione, con un secondo picco febbrile e l'infezione delle cellule epiteliali, in particolare dell'apparato respiratorio, gastrointestinale e tegumentario; in ultimo, sono infettate le cellule del sistema nervoso centrale. Dai tessuti epiteliali il virus viene poi eliminato attraverso tutte le secrezioni ed escrezioni corporee (*Beineke et al., 2009; Rendon-Marin et al., 2019*). Per tale motivo, CDV si trasmette facilmente tra gli ospiti suscettibili attraverso il contatto diretto con fluidi orali, respiratori e oculari e/o essudati e feci (*Guercio et al., 2023; Candela et al., 2025*).

### **Segni clinici e Lesioni**

Alla febbre bifasica seguono segni clinici correlati alle lesioni prodotte dall'infezione virale, che si associano a risentimento generale come letargia e perdita di appetito. La diffusione dell'infezione ai tessuti linfoidi determina immunosoppressione generalizzata e conseguente linfopenia (*Schobesberger et al., 2005; Sykes, 2010*), oltre a favorire le infezioni batteriche secondarie, che esacerbano i segni clinici. L'infezione delle cellule epiteliali conduce alla comparsa di segni clinici a carico della cute, quali ipercheratosi del naso

e dei cuscinetti plantari (definita in letteratura come “*hard pad disease*”) (Martella et al., 2008; Outerbridge, 2013), dell’apparato respiratorio, quali scolo oculo-congiuntivale, tosse, polmonite interstiziale e bronchiolite necrotizzante (Chludzinski et al., 2022), e dell’apparato gastroenterico, quali vomito e diarrea (Grant e Troy, 2007). All’ulteriore progressione del virus al SNC seguono segni neurologici quali convulsioni, segni cerebellari e vestibolari, paraparesi, tetraparesi e mioclono, movimenti ritmici di masticazione e salivazione a vuoto (i cosiddetti “*chewing gum fits*”): questi ultimi due segni sono stati per lungo tempo considerati patognomonici di questa malattia (Grant e Troy, 2007).

### **Diagnosi**

Per quanto alcuni segni clinici possano apparire come fortemente suggestivi del sospetto di cimurro, la diagnosi clinica necessita della conferma attraverso esami di laboratorio. I test di laboratorio si basano principalmente su prove dirette (test immunocromatografici e/o prove di RT-PCR o Real Time RT-PCR) su campioni di feci o di tessuti d’organo (Elia et al., 2006; Mira et al., 2018). Sono anche disponibili coniugati fluorescenti per le prove di immunofluorescenza diretta (Fairchild et al., 1967).

Le prove di laboratorio indirette si basano sulla determinazione degli anticorpi anti-CDV: la sieroneutralizzazione è considerata il *gold standard* tra queste prove, sebbene richieda un laboratorio ben attrezzato; sono disponibili in commercio alcuni test da potere allestire nella pratica ambulatoriale, comunemente utilizzati per determinare il titolo anticorpale, utile alla gestione della profilassi vaccinale (Meazzi et al., 2022; Ad et al., 2023).

Per le finalità di ricerca e per la determinazione del lineage di appartenenza sono stati messi a punto protocolli di biologia molecolare per lo studio della sequenza del gene H e di discriminazione con i ceppi vaccinali (Demeter et al., 2007, 2010).

### **Profilassi e Controllo**

La profilassi si basa quasi esclusivamente sull’igiene degli ambienti e sulla gestione degli animali. Essendo il CDV un virus a RNA provvisto di envelope, la sua resistenza nell’ambiente esterno risulta limitata, come anche quella ai comuni disinfettanti (sali quaternari, ipoclorito di sodio). Pertanto, una razionale gestione dei cani malati, attraverso opportune pratiche di isolamento che evitano il contatto con i loro aerosol e fluidi corporei, insieme ad opportune operazioni di pulizia e disinfezione degli ambienti, possono contribuire a limitare la diffusione dell’infezione.

La strategia più efficace per la prevenzione del cimurro è la vaccinazione. Nel corso degli anni sono stati prodotti e resi disponibili in commercio diversi vaccini allestiti con ceppi del lineage America I o Rockborn-like. Mentre i ceppi del lineage America I sono stati adattati in vitro su cellule embrionate di pollo (come, ad esempio, i comuni ceppi Onderstepoort), i ceppi del lineage Rockborn sono stati adattati su linee cellulari di origine canina: questi ultimi ceppi, seppure maggiormente immunogeni, sono stati associati ad episodi di encefalite post-vaccinale. Solo recentemente sono stati immessi in commercio vaccini ricombinanti con il

canarypoxvirus, più indicati per gli animali selvatici che possono risultare suscettibili ai ceppi vaccinali utilizzati per il cane (Marenzoni, 2023).

### Terapia

Il trattamento medico è esclusivamente sintomatico e di supporto, attraverso la somministrazione di soluzioni elettrolitiche, antiinfiammatori ed anticonvulsivanti, vitamina A ed antibiotici (Marenzoni, 2023).

### Bibliografia

- Ad, Y.; Halperin, I.M.; Olstad, E.C.; Gershwin, L.J.; Sullivan, L.; Reagan, K.L. Clinical Assessment of a Point-of-Care Assay to Determine Protective Vaccinal Antibody Titers to Canine Viral Diseases. *Vet J* 2023, 298–299, 106017, doi:10.1016/j.tvjl.2023.106017.
- Appel, M.; Robson, D.S. A Microneutralization Test for Canine Distemper Virus. *Am J Vet Res* 1973, 34, 1459–1463.
- Beineke, A.; Puff, C.; Seehusen, F.; Baumgärtner, W. Pathogenesis and Immunopathology of Systemic and Nervous Canine Distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 2009, 127, 1–18, doi:10.1016/j.vetimm.2008.09.023.
- Blancou, J. Dog Distemper: Imported into Europe from South America? *Hist Med Vet* 2004, 29, 35–41.
- Blixenkron-Möller, M.; Svansson, V.; Appel, M.; Krogsrud, J.; Have, P.; Orvell, C. Antigenic Relationships between Field Isolates of Morbilliviruses from Different Carnivores. *Arch Virol* 1992, 123, 279–294, doi:10.1007/BF01317264.
- Candela, M.G.; Wipf, A.; Ortega, N.; Huertas-López, A.; Martínez-Carrasco, C.; Perez-Cutillas, P. Tracking the Spatial and Functional Dispersion of Vaccine-Related Canine Distemper Virus Genotypes: Insights from a Global Scoping Review. *Viruses* 2025, 17, 1045, doi:10.3390/v17081045.
- Carré, H. 1905. Sur la maladie des jeunes chiens. *Comptes rendu de l'Académie des Sciences*, 140, 689–690.
- Chludzinski, E.; Klemens, J.; Ciurkiewicz, M.; Geffers, R.; Pöpperl, P.; Stoff, M.; Shin, D.-L.; Herrler, G.; Beineke, A. Phenotypic and Transcriptional Changes of Pulmonary Immune Responses in Dogs Following Canine Distemper Virus Infection. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 10019, doi:10.3390/ijms231710019.
- Colina, S.E.; Williman, M.M.; Tizzano, M.A.; Serena, M.S.; Echeverría, M.G.; Metz, G.E. Morbillivirus Canis Infection Induces Activation of Three Branches of Unfolded Protein Response, MAPK and Apoptosis. *Viruses* 2024, 16, 1846, doi:10.3390/v16121846.
- Demeter, Z.; Lakatos, B.; Palade, E.A.; Kozma, T.; Forgách, P.; Rusvai, M. Genetic Diversity of Hungarian Canine Distemper Virus Strains. *Vet Microbiol* 2007, 122, 258–269, doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.001.
- Demeter, Z.; Palade, E.A.; Hornyák, A.; Rusvai, M. Controversial Results of the Genetic Analysis of a Canine Distemper Vaccine Strain. *Vet Microbiol* 2010, 142, 420–426, doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.017.
- Elia, G.; Decaro, N.; Martella, V.; Cirone, F.; Lucente, M.S.; Lorusso, E.; Di Trani, L.; Buonavoglia, C. Detection of Canine Distemper Virus in Dogs by Real-Time RT-PCR. *J Virol Methods* 2006, 136, 171–176, doi:10.1016/j.jviromet.2006.05.004.
- Fairchild, G.A.; Wyman, M.; Donovan, E.F. Fluorescent Antibody Technique as a Diagnostic Test for Canine Distemper Infection: Detection of Viral Antigen in Epithelial Tissues of Experimentally Infected Dogs. *Am J Vet Res* 1967, 28, 761–768.
- Grant, D.C.; Troy, G.C. Canine Infectious Diseases. In: *Canine Internal Medicine Secrets*. Eds. Stanley I. Rubin, Anthony P. Carr; Mosby, 2007; pp. 394–422. doi: 10.1016/B978-1-56053-629-1.50072-8.
- Guercio, A.; Mira, F.; Di Bella, S.; Gucciardi, F.; Lastra, A.; Purpari, G.; Castronovo, C.; Pennisi, M.; Di Marco Lo Presti, V.; Rizzo, M.; et al. Biomolecular Analysis of Canine Distemper Virus Strains in Two Domestic Ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Sci* 2023, 10, 375, doi:10.3390/vetsci10060375.
- Karki, M.; Rajak, K.K.; Singh, R.P. Canine Morbillivirus (CDV): A Review on Current Status, Emergence and the Diagnostics. *Virusdisease* 2022, 33, 309–321, doi:10.1007/s13337-022-00779-7.
- Kennedy, J.M.; Earle, J.A.P.; Omar, S.; Abdullah, H.; Nielsen, O.; Roelke-Parker, M.E.; Cosby, S.L. Canine and Phocine Distemper Viruses: Global Spread and Genetic Basis of Jumping Species Barriers. *Viruses* 2019, 11, 944, doi:10.3390/v11100944.

- Lanszki, Z.; Lanszki, J.; Tóth, G.E.; Cserkés, T.; Csorba, G.; Görföl, T.; Csathó, A.I.; Jakab, F.; Kemenesi, G. Detection and Sequence Analysis of Canine Morbillivirus in Multiple Species of the Mustelidae Family. *BMC Vet Res* 2022, 18, 450, doi:10.1186/s12917-022-03551-7.
- Marenzoni, M.L. Cimurro. In: *Malattie infettive degli animali. Point Vétérinaire Italie*: Milano, Italy, 2023; pp. 659-665.
- Martella, V.; Elia, G.; Buonavoglia, C. Canine Distemper Virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008, 38, 787–797, vii–viii, doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.007.
- Meazzi, S.; Filipe, J.; Fiore, A.; Di Bella, S.; Mira, F.; Dall’Ara, P. Agreement between In-Clinics and Virus Neutralization Tests in Detecting Antibodies against Canine Distemper Virus (CDV). *Viruses* 2022, 14, 517, doi:10.3390/v14030517.
- Mira, F.; Purpari, G.; Di Bella, S.; Vicari, D.; Schirò, G.; Di Marco, P.; Macaluso, G.; Battilani, M.; Guercio, A. Update on Canine Distemper Virus (CDV) Strains of Arctic-like Lineage Detected in Dogs in Italy. *Vet Ital* 2018, 54, 225–236, doi:10.12834/VetIt.1455.7862.2.
- Outerbridge, C.A. Cutaneous Manifestations of Internal Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013, 43, 135–152, doi:10.1016/j.cvsm.2012.09.010.
- Rendon-Marin, S.; da Fontoura Budaszewski, R.; Canal, C.W.; Ruiz-Saenz, J. Tropism and Molecular Pathogenesis of Canine Distemper Virus. *Virology* 2019, 16, 30, doi:10.1186/s12985-019-1136-6.
- Sarute, N.; Delgado, M.V.; Carrau, L.; Benech, A.; Francia, L.; Pérez, R.; Panzera, Y. First Genome Sequence of a Canine Distemper Virus Strain from South America. *Genome Announc* 2014, 2, e01009-14, doi:10.1128/genomeA.01009-14.
- Schobesberger, M.; Summerfield, A.; Doherr, M.G.; Zurbriggen, A.; Griot, C. Canine Distemper Virus-Induced Depletion of Uninfected Lymphocytes Is Associated with Apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005, 104, 33–44, doi:10.1016/j.vetimm.2004.09.032.
- Sykes, J.E. Immunodeficiencies Caused by Infectious Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010, 40, 409–423, doi:10.1016/j.cvsm.2010.01.006.
- Uhl, E.W.; Kelderhouse, C.; Buikstra, J.; Blick, J.P.; Bolon, B.; Hogan, R.J. New World Origin of Canine Distemper: Interdisciplinary Insights. *Int J Paleopathol* 2019, 24, 266–278, doi:10.1016/j.ijpp.2018.12.007.
- Visser, I.K.; Kumarev, V.P.; Orvell, C.; de Vries, P.; Broeders, H.W.; van de Bildt, M.W.; Groen, J.; Teppema, J.S.; Burger, M.C.; UytdeHaag, F.G. Comparison of Two Morbilliviruses Isolated from Seals during Outbreaks of Distemper in North West Europe and Siberia. *Arch Virol* 1990, 111, 149–164, doi:10.1007/BF01311050.
- von Messling, V.; Zimmer, G.; Herrler, G.; Haas, L.; Cattaneo, R. The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytotoxicity. *J Virol* 2001, 75, 6418–6427, doi:10.1128/JVI.75.14.6418-6427.2001.
- Wilkes, R.P. Canine Distemper Virus in Endangered Species: Species Jump, Clinical Variations, and Vaccination. *Pathogens* 2022, 12, 57, doi:10.3390/pathogens12010057.

## **VIRUS EMERGENTI POTENZIALMENTE RILEVANTI NELL'INTERFACCIA UOMO-CANE**

Gli esseri umani coesistono con gli animali in vari modi, in stretta interdipendenza con l'ambiente. L'evoluzione della relazione con gli animali, storicamente fondata sulla produzione, il cibo ed il sostentamento, oggi vede anche legami basati sulla compagnia ed il benessere, in particolare con gli animali da compagnia. L'interfaccia di connessione e condivisione tra esseri umani, animali ed ambiente può essere fonte di infezioni che potrebbero avere, o che concretamente hanno, un impatto sulla salute pubblica. Queste malattie, quelle trasmissibili dagli animali all'uomo, sono definite zoonosi e si diffondono attraverso il contatto diretto o indiretto (ad esempio, il cibo, l'acqua e l'ambiente) (*WHO, Animal-human interface for health*).

In questo contesto, anche l'interfaccia tra cane, uomo e ambiente acquisisce un esempio di interdipendenza che, se da un lato apporta notevoli reciproci benefici dall'altro potrebbe esporre a fonti di infezione, alcune delle quali di non trascurabile rilevanza. Un esempio tra tutti è la rabbia, che può colpire sia i cani domestici che gli animali selvatici ed è trasmessa all'uomo attraverso la saliva degli animali infetti (*WHO, Animal-human interface for health*). A fianco di infezioni così rilevanti, per cui si stanno compiendo grandi sforzi per eradicarle, se ne possono annoverare numerose altre che sollevano diversi interrogativi relativamente al ruolo del cane: nella trasmissione diretta o indiretta all'uomo; nella diffusione in ambienti condivisi con altre specie animali; come potenziale ospite intermedio di agenti infettivi delle stesse famiglie con elevato potenziale rischio di riassortimenti o ricombinazioni.

Un esempio eclatante è rappresentato dalla recente pandemia COVID-19, durante la quale si è disquisito a lungo sui rischi della stretta convivenza tra cani e persone, in riferimento alla suscettibilità del cane al SARS-CoV-2 e della possibile trasmissione dello stesso (*Decaro et al., 2021*). Permangono ancora molti interrogativi sul potenziale patogeno o di trasmissione di alcuni agenti virali tra specie animali, tali da fare apparire queste malattie "neglette" o più probabilmente ancora poco studiate nel mondo animale e, in particolare, nel cane. Tra questi, possono essere annoverati alcuni tra i più noti agenti di malattia gastroenterica acuta di origine non batterica dell'uomo, quali rotavirusi o norovirusi (*Franco e Greenberg, 2012*). Ad esempio, ceppi di rotavirus del cane (genotipo A, sierotipo G3) sono stati identificati in casi umani di grave enterite acuta, suggerendo la possibilità che questi ceppi, descritti nel cane, possano indurre forme cliniche gravi nell'uomo (*De Grazia et al., 2007; Luchs et al., 2012; Wu et al., 2012*). Meno chiari appaiono invece le demarcazioni di specie e di trasmissione interspecie dei norovirus, dati gli occasionali rilievi nell'uomo e nel cane di ceppi virali tra loro strettamente correlati (come, ad esempio, quelli del genogruppo IV) (*Azevedo et al., 2024*) oppure il riscontro nell'uomo di anticorpi verso i norovirus del cane (*Mesquita et al., 2013*), elementi che pongono interrogativi che necessitano di ulteriori approfondimenti.

Ancora meno documentati appaiono il ruolo e la rilevanza di altri virus nel cane, notoriamente patogeni per la specie umana, ed ancor meno la significatività del cane nella loro diffusione diretta o indiretta, in ambienti condivisi. Tra questi, gli astrovirus sono stati occasionalmente descritti nel cane, ma la loro associazione inequivocabile con segni clinici o lesioni enteriche appare ancora da definire (*Martella et al., 2011*;

*Mihalov-Kovács et al., 2017*). Inoltre, l'ampia diffusione tra diverse specie animali di astrovirus caratterizzati da una stretta correlazione genetica, suggerisce la necessità di definire le barriere di specie ospiti e le opportunità di ricombinazione di questi virus. Ancora indefinita rimane, infine, la specificità del cane come ospite del virus dell'epatite E, uno dei più rilevanti ed emergenti patogeni dell'uomo a livello mondiale, causa di oltre tre milioni di casi clinici ogni anno (*WHO, Hepatitis E*). Sebbene la presenza di anticorpi per il virus dell'epatite E nei cani dimostri un'esposizione al virus, il suo potenziale patogeno e il ruolo del cane come ospite sono ancora oggetto di approfondimento (*Bernardini et al., 2022; Kenney et al., 2019*).

Lo studio di queste infezioni virali e delle malattie correlate può contribuire ad acquisire nuovi dati, elevando il cane a potenziale modello di studio. Sono molteplici gli esempi di virus rilevanti per l'uomo e la cui diffusione è imprescindibilmente correlata con l'ambiente, rendendo necessario quindi un approccio multi disciplinare per il loro studio (*Fauziah et al., 2024*). In questo scenario, il cane potrebbe rappresentare un utile modello di studio soprattutto epidemiologico. Un esempio in tal senso è rappresentato dal rilievo nel cane degli anticorpi verso il virus della West Nile (*Purpari et al., 2012*) o il virus dell'encefalite delle zecche (*Topp et al., 2023*), che conferma l'importanza di questo animale domestico come sentinella per il rilievo precoce o il monitoraggio di virus che possono rappresentare potenziali minacce per la salute umana. Pertanto, verranno qui di seguito descritte alcune tra le caratteristiche principali di virus considerati emergenti, quali norovirus ed altri calicivirus, rotavirus, astrovirus e virus dell'epatite E, allo scopo di introdurre le conoscenze scientifiche utili per il presente studio.

- 
- Azevedo, L.S. de; Silva, V.C.M.; Guiducci, R.; Guadagnucci, S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Lopes, R.D.; da Costa, A.C.; Cunha, L.; Lemos, M.F.; et al. Emerging Zoonotic Risks: Detection of the Human Norovirus GII.4 Sydney[P31] Strain in a Domestic Dog in Brazil. *Acta Trop* 2024, 260, 107449, doi:10.1016/j.actatropica.2024.107449.
- Bernardini, A.; Pacini, M.I.; Fonti, N.; Forzan, M.; Marchetti, V.; Mazzei, M. Serological, Virological Investigation and Hepatic Injury Evaluation for Hepatitis E Virus in Hunting Dogs. *Pathogens* 2022, 11, 1123, doi:10.3390/pathogens11101123.
- De Grazia, S.; Martella, V.; Giammanco, G.M.; Gòmara, M.I.; Ramirez, S.; Cascio, A.; Colomba, C.; Arista, S. Canine-Origin G3P[3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1091–1093, doi:10.3201/eid1307.070239.
- Decaro, N.; Balboni, A.; Bertolotti, L.; Martino, P.A.; Mazzei, M.; Mira, F.; Pagnini, U. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats: Facts and Speculations. *Front Vet Sci* 2021, 8, 619207, doi:10.3389/fvets.2021.619207.
- Fauziah, I.; Nugroho, H.A.; Yanthi, N.D.; Tiffarent, R.; Saputra, S. Potential Zoonotic Spillover at the Human-Animal Interface: A Mini-Review. *Vet World* 2024, 17, 289–302, doi:10.14202/vetworld.2024.289-302.
- Franco, M.A.; Greenberg, H.B. Rotaviruses, Noroviruses, and Other Gastrointestinal Viruses. *Goldman's Cecil Medicine* 2012, 2144–2147, doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00388-2.
- Kenney, S.P. The Current Host Range of Hepatitis E Viruses. *Viruses* 2019, 11, 452, doi:10.3390/v11050452.
- Luchs, A.; Cilli, A.; Morillo, S.G.; Carmona, R. de C.C.; Timenetsky, M. do C.S.T. Rare G3P[3] Rotavirus Strain Detected in Brazil: Possible Human-Canine Interspecies Transmission. *J Clin Virol* 2012, 54, 89–92, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.025.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Buonavoglia, C. Astroviruses in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011, 41, 1087–1095, doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.001.
- Mesquita, J.R.; Costantini, V.P.; Cannon, J.L.; Lin, S.; Nascimento, M.S.J.; Vinjé, J. Presence of Antibodies against Genogroup VI Norovirus in Humans. *Virol J* 2013, 10, 176, doi:10.1186/1743-422X-10-176.

- Mihalov-Kovács, E.; Martella, V.; Lanave, G.; Bodnar, L.; Fehér, E.; Marton, S.; Kemenesi, G.; Jakab, F.; Bányai, K. Genome Analysis of Canine Astroviruses Reveals Genetic Heterogeneity and Suggests Possible Inter-Species Transmission. *Virus Res* 2017, 232, 162–170, doi:10.1016/j.virusres.2016.12.005.
- Purpari, G.; Savini, G.; Monaco, F.; Calistri, P.; Gennaro, A.D.; Cannella, V.; Vitale, F.; Mira, F.; Bella, C.D.; Guercio, A.; et al. Importance of Dogs as Sentinels of West Nile Virus Activity in Urban and Suburban Areas. *International Journal of Infectious Diseases* 2012, 16, e270, doi:10.1016/j.ijid.2012.05.923.
- Topp, A.-K.; Springer, A.; Mischke, R.; Rieder, J.; Feige, K.; Ganter, M.; Nagel-Kohl, U.; Nordhoff, M.; Boelke, M.; Becker, S.; et al. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Wild and Domestic Animals in Northern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 2023, 14, 102220, doi:10.1016/j.ttbdis.2023.102220.
- WHO, Animal-human interface for health. <https://www.who.int/myanmar/activities/animal--human-interface-for-health>.
- WHO, Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>.
- Wu, F.-T.; Bányai, K.; Lin, J.-S.; Wu, H.-S.; Hsiung, C.A.; Huang, Y.-C.; Hwang, K.-P.; Jiang, B.; Gentsch, J.R. Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12, 170–173, doi:10.1089/vbz.2011.0708.

## **NOROVIRUS – CALICIVIRUS**

I calicivirus sono agenti infettivi considerati tra le principali cause di malattie trasmesse da alimenti nell'uomo (EFSA, Malattie zoonotiche veicolate da alimenti), capaci di infettare anche molte specie animali, compreso il cane. Tra questi virus comuni all'uomo ed al cane, la famiglia *Caliciviridae* include quelli appartenenti ai generi *Norovirus* e *Sapovirus*.

I norovirus sono stati identificati nel 1972, da feci di persone raccolte durante un focolaio di gastroenterite verificatosi nel 1968 a Norwalk, USA (*Kapikian et al., 1972*). Il focolaio fu segnalato, pertanto, come “gastroenterite di Norwalk” ed i virus osservati al microscopio descritti come “Norwalk virus”, in relazione al luogo di origine. Solo successivamente questi virus sono stati distinti nel genere *Norovirus* (*Martella et al., 2011*). I norovirus sono ormai riconosciuti come la causa principale delle epidemie di gastroenterite nel mondo, sia nei bambini che negli adulti, una malattia talvolta grave per soggetti vulnerabili (bambini piccoli ed anziani), oltre ad essere una comune causa di ricovero ospedaliero per gastroenterite (*Glass et al., 2009*). Si stima che i norovirus siano ogni anno causa di più di 1 milione di ricoveri ospedalieri e fino a 200.000 decessi nei bambini di età inferiore ai 5 anni (*Patel et al., 2009*).

Similmente, i sapovirus sono stati rilevati per la prima volta in campioni di feci diarroiche umane nel 1976 nel Regno Unito, tramite microscopia elettronica (*Madeley & Cosgrove, 1976*). Successivamente, il virus identificato fu riconosciuto come un nuovo agente patogeno della gastroenterite. Tuttavia, il ceppo più ampiamente studiato per le sue caratteristiche e quindi riconosciuto come prototipo del genere *Sapovirus* proveniva da un'altra epidemia nel 1982 a Sapporo, in Giappone (*Nakata et al., 2000; Oka et al., 2015*) e, per tale motivo, tali virus sono stati per lungo tempo definiti come “Sapporo-like viruses”. Come i norovirus, i sapovirus causano nell'uomo sintomi gastroenterici, quali vomito e diarrea, seppure comunemente autolimitanti e di gravità inferiore ai norovirus.

Anche nel cane, sia norovirus che sapovirus, sono stati associati ad episodi di gastroenterite, frequentemente in coinfezione con altri virus enterici. Di seguito, verranno separatamente trattati.

### **NOROVIRUS NEL CANE**

#### **Eziologia ed Epidemiologia**

I norovirus (NoV) sono virus rotondi, di piccole dimensioni (30-35 nm), privi di envelope, con un genoma a RNA a singolo filamento (ssRNA), della lunghezza di circa 7.000-8.500 paia di basi, che include 3 distinti frame di lettura aperti (open reading frames, ORFs): la ORF1 codifica per 6 proteine non strutturali, tra cui la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp); la ORF2 codifica la principale proteina componente del capsido (VP1); la ORF3 codifica una piccola proteina basica (VP2) che è stata associata alla stabilità del capsido (*Martella et al., 2011; Bodnar et al., 2017*).

I NoV sono geneticamente e antigenicamente altamente eterogenei, la cui evoluzione è guidata dall'accumulo di mutazioni puntiformi e dalla ricombinazione del genoma, che generano una notevole

diversità. Il sito preferenziale per la ricombinazione dei NoV è la regione di giunzione tra le ORF1 e ORF2 (Martella et al., 2011). Questa variabilità si riflette anche sulla classificazione dei NoV che si basa sulla sequenza completa degli amminoacidi che codificano per la proteina capsidica VP1 e riconosce almeno 7 genogruppi (da GI a GVII) e 40 genotipi (Vinjé, 2015; Bodnar et al., 2017). I genogruppi GI, GII e GIV dei NoV infettano gli esseri umani; tra questi, i ceppi GII sono i più diffusi a livello mondiale (Green, 2007). Nel cane sono stati descritti almeno 4 genotipi da tre genogruppi distinti, ovvero GIV.2, GVI.1 e GVI.2, e GVII (Bodnar et al., 2017). L'evidenza di NoV nei cani appartenenti a genogruppi comuni a quelli dei norovirus patogeni per l'uomo (specificamente GIV) ha quindi sollevato preoccupazioni per la salute pubblica, riguardo alla potenziale trasmissione interspecie ed alle intersezioni evolutive a causa delle strette interazioni sociali tra esseri umani ed animali domestici (Martella et al., 2011; Bodnar et al., 2017). A tal sostegno, sono stati identificati sia anticorpi contro i NoV umani (GII.4 e GIV.1) nei sieri dei cani, come anche di quelli verso i NoV dei cani (GVI) nei sieri umani, suggerendo l'esposizione a NoV omologhi ed eterologhi (Mesquita et al., 2013, 2014; Di Martino et al., 2017). L'esposizione dei cani ai NoV umani GII e GIV è stata anche dimostrata dal rilievo del genoma di questi in campioni animali (Summa et al., 2012; Caddy et al., 2015; Charoenkul et al., 2020; Matamoros et al., 2023; Azevedo et al., 2024), nonostante alcuni autori abbiano recentemente ipotizzato la possibilità che alcune caratteristiche del genoma possano potenzialmente limitare questa trasmissione interspecie (Ford-Siltz et al., 2019).

I norovirus nel cane sono stati identificati occasionalmente in diverse aree geografiche, suggerendo un'ampia diffusione di questi ceppi virali. Recentemente, al pari di altri virus enterici, i norovirus del cane sono stati anche identificati in acque reflue domestiche (Lizasoain et al., 2015).

### **Patogenesi e segni clinici**

La patogenicità dei NoV del cane non è stata determinata attraverso infezioni sperimentali in animali gnotobiotici o privi di patogeni specifici (SPF), pertanto i dati disponibili si riferiscono alle infezioni naturali descritte da parte di vari autori (Martella et al., 2011). Verosimilmente, la via di infezione è quella oro-fecale; l'eliminazione del virus è stata documentata fino a 3 settimane in cuccioli guariti pochi giorni dopo i segni clinici enterici (Martella et al., 2008). La maggior parte dei cani positivi a norovirus mostravano coinfezioni con altri virus, principalmente CPV-2. Tuttavia, il numero ridotto di casi descritti non consente di determinare segni o lesioni patognomiche o specificamente riferibili al norovirus. Inoltre, norovirus sono stati rilevati anche in cani adulti ed asintomatici (Stamelou et al., 2022).

### **Diagnosi**

Il norovirus non è comunemente incluso nel panel diagnostico di cani che mostrano segni clinici o lesioni a carico dell'apparato gastroenterico. Oltre alla microscopia elettronica, un metodo riservato a pochi laboratori attrezzati, il rilievo di NoV nel cane avviene comunemente attraverso prove di RT-PCR o Real Time RT-PCR. Molti protocolli sono stati sviluppati utilizzando la regione RdRp come target; l'analisi di sequenza di questa regione consente una iniziale genotipizzazione dei ceppi rilevati, che necessita del

sequenziamento del gene che codifica per la proteina capsidica, per una maggiore accuratezza. Presso alcuni laboratori impegnati nella ricerca in medicina veterinaria sono stati sviluppati dei test per il rilievo degli anticorpi verso NoV, alcuni dei quali utili a discriminare gli anticorpi verso specifici genotipi di NoV sia umani che del cane.

## SAPOVIRUS NEL CANE

### **Eziologia, Epidemiologia, Diagnosi**

I sapovirus sono virus rotondi, di piccole dimensioni (30-38 nm), privi di envelope, con un genoma a RNA a singolo filamento (ssRNA), della lunghezza di circa 7.100-7.700 paia di basi, che include 2 distinti frame di lettura aperti (open reading frames, ORFs): la ORF1 codifica per una grande poliproteina contenente le 6 proteine non strutturali e per la proteina capsidica VP1; la ORF2 codifica per la proteina strutturale minore VP2 (Oka et al., 2015).

La regione codificante la proteina capsidica VP1 è la regione più diversificata del genoma e sulla base delle divergenze in questa regione i sapovirus sono suddivisi in 5 genogruppi (GI-GV), a cui si aggiungono altri 9 genogruppi ancora in via di proposta. Attualmente, i sapovirus umani noti appartengono ai genogruppi GI, GII, GIV e GV (Oka et al., 2015). Gli studi disponibili sui sapovirus del cane sono rari, mostrando tassi di positività variabile tra l'1% ed il 2% dei cani in esame. Alcuni degli animali infetti erano asintomatici e l'infezione era associata con altri virus enterici del cane. Non è stata possibile una chiara definizione del genogruppo di appartenenza, seppure ci sia convergenza nel considerare i sapovirus del cane come appartenenti ad uno dei nuovi genogruppi, in ogni caso separati da quelli dell'uomo (Li et al., 2011; Soma et al., 2015; Bodnar et al., 2016; Stamelou et al., 2022; Matamoros et al., 2023).

La diagnosi della presenza dell'RNA di sapovirus nel cane, nei pochi studi disponibili, si basa su prove di RT-PCR che utilizzano una coppia di primers che ha come target un frammento della regione RdRp comune ai norovirus ed ai sapovirus (Jiang et al., 1999) o su metodi SYBR-green Real Time RT-PCR.

### **Bibliografia**

- Azevedo, L.S. de; Silva, V.C.M.; Guiducci, R.; Guadagnucci, S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Lopes, R.D.; da Costa, A.C.; Cunha, L.; Lemos, M.F.; et al. Emerging Zoonotic Risks: Detection of the Human Norovirus GII.4 Sydney[P31] Strain in a Domestic Dog in Brazil. *Acta Trop* 2024, 260, 107449, doi:10.1016/j.actatropica.2024.107449.
- Bodnar, L.; Di Martino, B.; Di Profio, F.; Melegari, I.; Lanave, G.; Lorusso, E.; Cavalli, A.; Elia, G.; Bányai, K.; Marsilio, F.; et al. Detection and Molecular Characterization of Sapoviruses in Dogs. *Infect Genet Evol* 2016, 38, 8–12, doi:10.1016/j.meegid.2015.11.034.
- Bodnar, L.; Lorusso, E.; Di Martino, B.; Catella, C.; Lanave, G.; Elia, G.; Bányai, K.; Buonavoglia, C.; Martella, V. Identification of a Novel Canine Norovirus. *Infect Genet Evol* 2017, 52, 75–81, doi:10.1016/j.meegid.2017.04.020.
- Caddy, S.L.; de Rougemont, A.; Emmott, E.; El-Attar, L.; Mitchell, J.A.; Hollinshead, M.; Belliot, G.; Brownlie, J.; Le Pendu, J.; Goodfellow, I. Evidence for Human Norovirus Infection of Dogs in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2015, 53, 1873–1883, doi:10.1128/JCM.02778-14.
- Charoenkul, K.; Nasamran, C.; Janetanakit, T.; Tangwangvivat, R.; Bunpapong, N.; Boonyapisitsopa, S.; Suwannakarn, K.; Theamboonler, A.; Chuchaona, W.; Poovorawan, Y.; et al. Human Norovirus Infection in Dogs, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2020, 26, 350–353, doi:10.3201/eid2602.191151.

- Di Martino, B.; Di Profio, F.; Melegari, I.; Sarchese, V.; Massirio, I.; Palermo, G.; Romito, G.; Lorusso, E.; Lanave, G.; Bodnar, L.; et al. Seroprevalence for Norovirus Genogroup II, IV and VI in Dogs. *Vet Microbiol* 2017, 203, 68–72, doi:10.1016/j.vetmic.2017.03.006.
- EFSA, Malattie zoonotiche veicolate da alimenti. <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>.
- Ford-Siltz, L.A.; Mullis, L.; Sanad, Y.M.; Tohma, K.; Lepore, C.J.; Azevedo, M.; Parra, G.I. Genomics Analyses of GIV and GVI Noroviruses Reveal the Distinct Clustering of Human and Animal Viruses. *Viruses* 2019, 11, 204, doi:10.3390/v11030204.
- Glass, R.I.; Parashar, U.D.; Estes, M.K. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009, 361, 1776–1785, doi:10.1056/NEJMra0804575.
- Green, K.Y. Caliciviridae: the noroviruses: specific virus families. In: *Fields Virology*, fifth ed. Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007; pp. 949–979.
- Jiang, X.; Huang, P.W.; Zhong, W.M.; Farkas, T.; Cubitt, D.W.; Matson, D.O. Design and Evaluation of a Primer Pair That Detects Both Norwalk- and Sapporo-like Caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999, 83, 145–154, doi:10.1016/s0166-0934(99)00114-7.
- Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Dolin, R.; Thornhill, T.S.; Kalica, A.R.; Chanock, R.M. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-Nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J Virol* 1972, 10, 1075–1081, doi:10.1128/JVI.10.5.1075-1081.1972.
- Li, L.; Pesavento, P.A.; Shan, T.; Leutenegger, C.M.; Wang, C.; Delwart, E. Viruses in Diarrhoeic Dogs Include Novel Kobuviruses and Sapoviruses. *J Gen Virol* 2011, 92, 2534–2541, doi:10.1099/vir.0.034611-0.
- Lizasoain, A.; Tort, L.F.L.; García, M.; Gómez, M.M.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P.; Cristina, J.; Berois, M.; Colina, R.; Victoria, M. Sewage Surveillance Reveals the Presence of Canine GVII Norovirus and Canine Astrovirus in Uruguay. *Arch Virol* 2015, 160, 2839–2843, doi:10.1007/s00705-015-2571-3.
- Madeley, C.R.; Cosgrove, B.P. Letter: Caliciviruses in Man. *Lancet* 1976, 1, 199–200, doi:10.1016/s0140-6736(76)91309-x.
- Martella, V.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Elia, G.; Radogna, A.; D’Abramo, M.; Desario, C.; Cavalli, A.; Corrente, M.; Camero, M.; et al. Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus. *Emerg Infect Dis* 2008, 14, 1306–1308, doi:10.3201/eid1408.080062.
- Martella, V.; Pinto, P.; Buonavoglia, C. Canine Noroviruses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011, 41, 1171–1181, doi:10.1016/j.cvsm.2011.08.002.
- Matamoros, D.J.P.; Worsfold, C.S.; Campos, R.C.; Acuña, H.M.B.; Chacón, E.C.; Sánchez, C.F.J. Molecular Characterization of Norovirus and Sapovirus Detected in Animals and Humans in Costa Rica: Zoo-Anthropozoonotic Potential of Human Norovirus GII.4. *Open Vet J* 2023, 13, 74–89, doi:10.5455/OVJ.2023.v13.i1.8.
- Mesquita, J.R.; Delgado, I.; Costantini, V.; Heenemann, K.; Vahlenkamp, T.W.; Vinjé, J.; Nascimento, M.S.J. Seroprevalence of Canine Norovirus in 14 European Countries. *Clin Vaccine Immunol* 2014, 21, 898–900, doi:10.1128/CVI.00048-14.
- Mesquita, J.R.; Costantini, V.P.; Cannon, J.L.; Lin, S.; Nascimento, M.S.J.; Vinjé, J. Presence of Antibodies against Genogroup VI Norovirus in Humans. *Viol J* 2013, 10, 176, doi:10.1186/1743-422X-10-176.
- Nakata, S.; Honma, S.; Numata, K.K.; Kogawa, K.; Ukae, S.; Morita, Y.; Adachi, N.; Chiba, S. Members of the Family Caliciviridae (Norwalk Virus and Sapporo Virus) Are the Most Prevalent Cause of Gastroenteritis Outbreaks among Infants in Japan. *J Infect Dis* 2000, 181, 2029–2032, doi:10.1086/315500.
- Oka, T.; Wang, Q.; Katayama, K.; Saif, L.J. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2015, 28, 32–53, doi:10.1128/CMR.00011-14.
- Patel, M.M.; Hall, A.J.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Noroviruses: A Comprehensive Review. *J Clin Virol* 2009, 44, 1–8, doi:10.1016/j.jcv.2008.10.009.
- Soma, T.; Nakagomi, O.; Nakagomi, T.; Mochizuki, M. Detection of Norovirus and Sapovirus from Diarrheic Dogs and Cats in Japan. *Microbiol Immunol* 2015, 59, 123–128, doi:10.1111/1348-0421.12223.
- Stamelou, E.; Giantsis, I.A.; Papageorgiou, K.V.; Petridou, E.; Davidson, I.; Polizopoulou, Z.S.; Papa, A.; Kritas, S.K. First Report of Canine Astrovirus and Sapovirus in Greece, Hosting Both Asymptomatic and Gastroenteritis Symptomatic Dogs. *Viol J* 2022, 19, 58, doi:10.1186/s12985-022-01787-1.

Summa, M.; von Bonsdorff, C.-H.; Maunula, L. Pet Dogs--a Transmission Route for Human Noroviruses? *J Clin Virol* 2012, 53, 244–247, doi:10.1016/j.jcv.2011.12.014.

Vinje, J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol* 2015, 53, 373–381, doi:10.1128/JCM.01535-14.

## **ROTAVIRUS**

I rotavirus (RoV) sono la causa principale di diarrea grave e disidratante nei bambini di età inferiore ai 5 anni a livello globale: si stima che ogni anno oltre 25 milioni di visite ambulatoriali e più di 2 milioni di ricoveri ospedalieri siano attribuibili alle infezioni da rotavirus (*WHO, Rotavirus*). In Italia, i dati di letteratura indicano che alle infezioni da rotavirus sono attribuite una percentuale variabile dal 17% al 69% circa delle ospedalizzazioni per gastroenterite acuta e l'84% delle ospedalizzazioni per gastroenterite di origine virale (*Istituto Superiore di Sanità, EpiCentro. Rotavirus – aspetti epidemiologici*). I rotavirus causano enterite, da moderata a grave, anche in altre specie animali, tra cui principalmente bovini, suini ed equini, specie giovani dopo lo svezzamento.

Nel cane, invece, il rilievo di rotavirus nei casi di diarrea appare ancora sporadico, probabilmente perché non viene comunemente ricercato in quanto il suo ruolo nel determinismo di questi eventi clinici è considerato di minore importanza rispetto ad altri virus a tropismo enterico. I primi rilievi di RoV nel cane risalgono ai primi anni '80, principalmente attraverso indagini di microscopia elettronica in campioni fecali diarroici (*Tzipori, 1976; Pollock e Carmichael, 1979; McNulty et al., 1980; Roseto et al., 1980*). L'avvento delle indagini di biologia molecolare nella ricerca veterinaria ha ampliato le opportunità di rilievo e di studio dei rotavirus anche nel cane, permettendo di integrare le informazioni sulle correlazioni di questi virus nelle diverse specie animali, uomo compreso. Similmente ad altre specie animali, anche nel cane i RoV determinano manifestazioni cliniche enteriche, seppure con un decorso subclinico o di lieve entità.

## **ROTAVIRUS NEL CANE**

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Il nome rotavirus origina dal tipico aspetto di ruota che si rileva quando li si osserva alla microscopia elettronica dopo una colorazione negativa. I rotavirus (RoV), tassonomicamente inclusi nella specie *Rotavirus alphagastroenteritidis* (RVA) e precedentemente noti come rotavirus di gruppo A o specie A, hanno un diametro di circa 75 nm, forma icosaedrica e possiedono un triplo capsido (*Díaz Alarcón et al., 2025*). Hanno un genoma di RNA a doppio filamento (dsRNA), segmentato, che consiste di 11 segmenti che codificano sei proteine strutturali virali (da VP1 a VP4, VP6 e VP7) e sei proteine non strutturali (da NSP1 a NSP6) (*Guglielmini et al., 2011; Pesavento et al., 2006*).

Le proteine strutturali VP7 e VP2 compongono la superficie esterna del capsido e, pertanto, inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti (*Díaz Alarcón et al., 2025; Omar et al., 2025*). Pertanto, le caratteristiche degli antigeni di neutralizzazione maggiore G (glicoproteina) e minore P (proteasi-sensibile), espressi da queste due proteine, costituiscono la base del sistema di genotipizzazione duale (G/P) utilizzato per la classificazione dei rotavirus (*Matthijnssens et al., 2011; Omar et al., 2025*): globalmente sono stati descritti 42 G e 58 P genotipi. I ceppi descritti nel cane appartengono al sierotipo G3, comune anche in altre specie animali domestiche quali gatti, suini, conigli e cavalli (*Díaz Alarcón et al., 2025*). Nello specifico, i

ceppi identificati nel cane appartengono al genotipo G3P[3] (*Martella et al., 2001a, 2001b; Luchs et al., 2012; Azevedo et al., 2023; Chamsai et al., 2024*). I genotipi di RoV più comuni negli esseri umani a livello mondiale sono G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] (*Dóro et al., 2014*). Ceppi di rotavirus G3P[3], tipici del cane, sono stati associati a casi clinici di enterite umana (*De Grazia et al., 2007; Tsugawa et al., 2008; Grant et al., 2011; Wu et al., 2012; Papp et al., 2015*), ponendo l'attenzione sulla possibilità di trasmissione dal cane e di manifestazione clinica anche nell'uomo. A tal proposito, a causa della natura segmentata del genoma virale, sono possibili fenomeni di riassortimento di uno o più segmenti, alla base della diversità genetica dei RoV e della possibilità di trasmissione interspecie tra animali o tra questi e l'uomo e dell'emergere di nuove varianti virulente (*Watanabe et al., 2001; Donato et al., 2014; Díaz Alarcón et al., 2022*).

### **Patogenesi e segni clinici**

Le descrizioni di rotavirus nel cane sono molto limitate e, pertanto, i dati disponibili. Le prime indagini sierologiche hanno evidenziato la presenza di anticorpi verso i rotavirus in molti dei cani adulti indagati (*Mochizuki et al., 1986*). L'infezione nel cane determina una forma enterica subclinica, associata talvolta ad anoressia e vomito, per lo più nei cuccioli di età inferiore a 2 settimane di età, più raramente nei cani di età superiore (*Pollock e Carmichael, 1990*). L'elevata positività sierologica a fronte dell'esiguo numero di manifestazioni cliniche suggerisce che la malattia è clinicamente poco rilevante nel cane, contrariamente a quanto osservato nei suini e nei bovini (*Pratelli et al., 1999*).

L'infezione da rotavirus nel cane mostra caratteri comuni a quelli di altre specie animali, con una localizzazione del virus nel tratto digerente del piccolo intestino e la conseguente replicazione che causa atrofia dei villi e sostituzione delle cellule epiteliali cilindriche con cellule cuboidi, alla base delle alterazioni funzionali causa della diarrea (*Pollock e Carmichael, 1990*).

### **Diagnosi**

Probabilmente in conseguenza della poca rilevanza che viene attribuita al rotavirus, questo non è comunemente incluso nel panel diagnostico di cani che mostrano segni clinici o lesioni a carico dell'apparato gastroenterico in cuccioli di poche settimane di età. Inoltre, le co-infezioni con altri virus enterici evidenziate in letteratura supportano l'opportunità di eseguire esami specifici anche per il rilievo del rotavirus. Seppure esistano dei test cromatografici rapidi ad uso ambulatoriale per la ricerca del rotavirus nelle feci del cane, test più specifici richiedono laboratori di analisi e di ricerca specializzati. Questi saggi si basano su prove di microscopia elettronica dopo colorazione negativa, isolamento su monostrati cellulari permissivi (come, ad esempio, la linea cellulare MA-104, derivata da cellule epiteliali del rene di scimmia rhesus), prove di identificazione e caratterizzazione basati su tecniche di biologia molecolare (RT-PCR, Real Time RT-PCR, RFLP-PCR), sequenziamento ed analisi delle sequenze per la determinazione del genotipo, oppure indagini sierologiche.

## Bibliografia

- Azevedo, L.S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Viana, E.; França, Y.; Medeiros, R.S.; Guiducci, R.; Morillo, S.G.; Primo, D.; Lopes, R.D.; et al. Full Genotype Characterization of Brazilian Canine G3P[3] Strains during a 10-Year Survey (2012–2021) of Rotavirus Infection in Domestic Dogs and Cats. *Arch Virol* 2023, 168, 176, doi:10.1007/s00705-023-05807-5.
- Chamsai, E.; Charoenkul, K.; Udom, K.; Jairak, W.; Chaiyawong, S.; Amonsin, A. Genetic Characterization and Evidence for Multiple Reassortments of Rotavirus A G3P[3] in Dogs and Cats in Thailand. *Front Vet Sci* 2024, 11, 1415771, doi:10.3389/fvets.2024.1415771.
- De Grazia, S.; Martella, V.; Giammanco, G.M.; Gòmara, M.I.; Ramirez, S.; Cascio, A.; Colomba, C.; Arista, S. Canine-Origin G3P[3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1091–1093, doi:10.3201/eid1307.070239.
- Díaz Alarcón, R.G.; Liotta, D.J.; Miño, S. Zoonotic RVA: State of the Art and Distribution in the Animal World. *Viruses* 2022, 14, 2554, doi:10.3390/v14112554.
- Díaz Alarcón, R.G.; Salvatierra, K.; Gómez Quintero, E.; Liotta, D.J.; Parreño, V.; Miño, S.O. Complete Genome Classification System of Rotavirus Alphagastroenteritidis: An Updated Analysis. *Viruses* 2025, 17, 211, doi:10.3390/v17020211.
- Donato, C.M.; Manuelpillai, N.M.; Cowley, D.; Roczo-Farkas, S.; Buttery, J.P.; Crawford, N.W.; Kirkwood, C.D. Genetic Characterization of a Novel G3P[14] Rotavirus Strain Causing Gastroenteritis in 12 Year Old Australian Child. *Infect Genet Evol* 2014, 25, 97–109, doi:10.1016/j.meegid.2014.04.009.
- Dóro, R.; László, B.; Martella, V.; Leshem, E.; Gentsch, J.; Parashar, U.; Bányai, K. Review of Global Rotavirus Strain Prevalence Data from Six Years Post Vaccine Licensure Surveillance: Is There Evidence of Strain Selection from Vaccine Pressure? *Infect Genet Evol* 2014, 28, 446–461, doi:10.1016/j.meegid.2014.08.017.
- Grant, L.; Esona, M.; Gentsch, J.; Watt, J.; Reid, R.; Weatherholtz, R.; Santosham, M.; Parashar, U.; O'Brien, K. Detection of G3P[3] and G3P[9] Rotavirus Strains in American Indian Children with Evidence of Gene Reassortment between Human and Animal Rotaviruses. *J Med Virol* 2011, 83, 1288–1299, doi:10.1002/jmv.22076.
- Guglielmi K., Matthijnsens J., Dormitzer P., Ciarlet M., Patton J. Genus Rotavirus: Type Species A. In: Fauquet C., Mayo M., Maniloff J., Desselberger U., Ball A., editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press; Amsterdam, The Netherlands: 2011. pp. 484–499.
- Istituto Superiore di Sanità, EpiCentro. Rotavirus – aspetti epidemiologici. <https://www.epicentro.iss.it/rotavirus/epidemiologia>
- Luchs, A.; Cilli, A.; Morillo, S.G.; Carmona, R. de C.C.; Timenetsky, M. do C.S.T. Rare G3P[3] Rotavirus Strain Detected in Brazil: Possible Human-Canine Interspecies Transmission. *J Clin Virol* 2012, 54, 89–92, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.025.
- Martella, V.; Pratelli, A.; Elia, G.; Decaro, N.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Isolation and Genetic Characterization of Two G3P5A[3] Canine Rotavirus Strains in Italy. *J Virol Methods* 2001a, 96, 43–49, doi:10.1016/s0166-0934(01)00312-3.
- Martella, V.; Pratelli, A.; Greco, G.; Gentile, M.; Fiorente, P.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Nucleotide Sequence Variation of the VP7 Gene of Two G3-Type Rotaviruses Isolated from Dogs. *Virus Res* 2001b, 74, 17–25, doi:10.1016/s0168-1702(00)00230-6.
- Matthijnsens, J.; Ciarlet, M.; McDonald, S.M.; Attoui, H.; Bányai, K.; Brister, J.R.; Buesa, J.; Esona, M.D.; Estes, M.K.; Gentsch, J.R.; et al. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011, 156, 1397–1413, doi:10.1007/s00705-011-1006-z.
- McNulty, M.S.; Curran, W.L.; McFerran, J.B.; Collins, D.S. Viruses and Diarrhoea in Dogs. *Vet Rec* 1980, 106, 350–351, doi:10.1136/vr.106.15.350.
- Mochizuki, M.; Minami, K.; Sakamoto, H. Seroepizootiologic Studies on Rotavirus Infections of Dogs and Cats. *Nihon Juigaku Zasshi* 1986, 48, 957–964, doi:10.1292/jvms1939.48.957.
- Omar, A.H.; Pellegrini, F.; Catella, C.; Diakoudi, G.; Salvaggiulo, A.; Casalino, G.; Circella, E.; D'Amico, F.; Schiavitto, M.; Camarda, A.; et al. Complete Genome Sequencing of a G3P[14] Rabbit Rotavirus. *Animals (Basel)* 2025, 15, 1548, doi:10.3390/ani15111548.
- Papp, H.; Mihalov-Kovács, E.; Dóro, R.; Marton, S.; Farkas, S.L.; Giammanco, G.M.; De Grazia, S.; Martella, V.; Bányai, K. Full-Genome Sequencing of a Hungarian Canine G3P[3] Rotavirus A Strain

- Reveals High Genetic Relatedness with a Historic Italian Human Strain. *Virus Genes* 2015, 50, 310–315, doi:10.1007/s11262-014-1163-8.
- Pesavento, J.B.; Crawford, S.E.; Estes, M.K.; Prasad, B.V.V. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, 309, 189–219, doi:10.1007/3-540-30773-7\_7.
- Pollock, R.V.; Carmichael, L. Canine Viral Enteritis. *Recent Developments. Mod Vet Pract* 1979, 60, 375–380.
- Pollock, R.V.H.; Carmichael, L.E. Canine viral enteritis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. Greene C.E. (Ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1990. pp.268-287
- Pratelli, A; Buonavoglia, D; Martella, V; Cavalli, A; Lavazza, A; Buonavoglia, C. Enteriti virali del cane: risultati di un'indagine virologica. *Veterinaria*. 1999 Dec; 13(6): 57-63.
- Roseto, A.; Lema, F.; Cavalieri, F.; Dianoux, L.; Sitbon, M.; Ferchal, F.; Lasneret, J.; Peries, J. Electron Microscopy Detection and Characterization of Viral Particles in Dog Stools. *Arch Virol* 1980, 66, 89–93, doi:10.1007/BF01314977.
- Tsugawa, T.; Hoshino, Y. Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analyses Reveal Human Rotavirus G3P[3] Strains Ro1845 and HCR3A Are Examples of Direct Virion Transmission of Canine/Feline Rotaviruses to Humans. *Virology* 2008, 380, 344–353, doi:10.1016/j.virol.2008.07.041.
- Tzipori, S. Human Rotavirus in Young Dogs. *Med J Aust* 1976, 2, 922–923, doi:10.5694/j.1326-5377.1976.tb115512.x.
- Watanabe, M.; Nakagomi, T.; Koshimura, Y.; Nakagomi, O. Direct Evidence for Genome Segment Reassortment between Concurrently-Circulating Human Rotavirus Strains. *Arch Virol* 2001, 146, 557–570, doi:10.1007/s007050170162.
- WHO. Rotavirus. <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards/vaccines-quality/rotavirus>.
- Wu, F.-T.; Bányai, K.; Lin, J.-S.; Wu, H.-S.; Hsiung, C.A.; Huang, Y.-C.; Hwang, K.-P.; Jiang, B.; Gentsch, J.R. Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12, 170–173, doi:10.1089/vbz.2011.0708.

## ASTROVIRUS

Gli astrovirus sono virus a RNA a singolo filamento a polarità positiva, identificati per la prima volta nell'uomo nel 1975, quando furono isolati dalle feci di bambini affetti da vomito e diarrea lieve (*Appleton & Higgins, 1975*). Nello stesso anno è stato coniato il termine astrovirus (AstV), per descrivere i piccoli virus rotondi con un caratteristico aspetto a stella ("*astron*" in greco significa stella) osservati nelle feci di neonati con gastroenterite (*Madeley & Cosgrove, 1975*). Gli studi epidemiologici su questo virus hanno dimostrato che gli astrovirus umani (HAstV) "classici", che includono otto sierotipi distinti (HAstV-1-8), sono una delle principali cause di gastroenterite virale pediatrica nel mondo; a questi si aggiungono altri clade che includono ceppi HAstV definiti "non classici", "atipici" o "animal-like", tra cui i ceppi Melborune e Virginia/Human-mink-ovine (VA/HMO), geneticamente distinti dai precedenti e maggiormente correlati agli astrovirus animali (*Hargest et al., 2021; Lanave et al., 2022*). Diversamente dagli AstV classici, i virus umani VA possono causare infezioni sistemiche che coinvolgono il tratto respiratorio ed il sistema nervoso centrale (SNC) (*Hargest et al., 2021*).

Sebbene inizialmente rilevati nelle feci dei bambini, gli AstV sono stati poi riscontrati anche nelle feci di un'ampia varietà di specie di mammiferi, tra cui cani, gatti, bovini e suini, così come in specie aviarie domestiche ed altri uccelli acquatici selvatici (*Bosch et al., 2014*). Già alla fine degli anni '70, sono stati descritti AstV prima nelle feci di ruminanti domestici (*Snodgrass & Gray, 1977; Woode & Bridger, 1978*) e, successivamente, in molte altre specie animali, dove generalmente replicano nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue, inducendo una diarrea di tipo lieve. Più recentemente, similmente agli AstV umani, anche tra gli AstV animali è stato osservato un tropismo non limitato al tratto gastro-enterico ma esteso anche al fegato ed al rene, in alcuni volatili, ed al SNC ed all'apparato respiratorio, in alcuni mammiferi (*Reuter et al., 2018; Janowski, 2021*). Questo diverso potenziale tropismo tissutale apre la via verso future ricerche sperimentali (*Janowski, 2021*).

## ASTROVIRUS NEL CANE

### **Eziologia ed Epidemiologia**

Inizialmente, la famiglia *Astroviridae* era costituita da un singolo genere, *Astrovirus*, definito sulla base dei primi studi basati sulla morfologia del virione. In seguito, sono stati stabiliti due generi, in relazione alla specie ospite di origine, i *Mamastrovirus* (MAstV) e gli *Avastrovirus* (AAstV), che infettano rispettivamente specie di mammiferi e uccelli (*Bosch et al., 2014*). Gli astrovirus del cane, precedentemente inclusi nella specie *Mamastrovirus 5*, sono stati più recentemente inclusi nella specie virale *Mamastrovirus canis* (genere *Mamastrovirus*, famiglia *Astroviridae*) (*ICTV, 2024*).

Si tratta di virus di piccole dimensioni (circa 25-35 nm), di forma arrotondata, privi di envelope, con un genoma a RNA di circa 6.400-7.300 paia di basi, contenente 3 ORF, di cui due (ORF1a e ORF1b),

all'estremità 5', che codificano per proteine non strutturali e l'altra (ORF2), all'estremità 3', che codifica per la proteina capsidica (*Martella et al., 2011a*).

Nel corso della fine degli anni '90, i casi descritti di astrovirosi nel cane risultano sporadici e limitati alla diagnosi attraverso la microscopia elettronica (*Toffan et al., 2009*). Anche in Italia le descrizioni di astrovirus nel cane sono limitate. I primi casi sono stati descritti in cani con diarrea, guariti dopo 5-7 giorni, introdotti a scopo commerciale dai paesi dell'est Europa nel 2005 (*Toffan et al., 2009*). Altri casi in Italia sono stati successivamente descritti nel 2011, quando è stato evidenziato un certo grado di eterogeneità tra i virus identificati; alcuni di questi sono stati anche isolati su monostrati cellulari MDCK (*Martella et al., 2011b*). Studi successivi hanno confermato che (i) gli astrovirus dei cani, come quelli umani, mostrano un certo grado di eterogeneità, (ii) circolano, in Italia come in altri paesi Europei, dei ceppi virulenti anche verso cani adulti e (iii) che è ipotizzabile una trasmissione interspecie (*Martella et al., 2012; Mihalov-Kovács et al., 2017*). Da un altro studio effettuato in Italia, da campioni fecali di 39 cani con un quadro compatibile con enterite virale, collezionati nel nord della Sardegna nel 2013-2014, il 20,5% dei campioni è risultato positivo ad AstV, di cui la maggior parte (6/8) in co-infezione con altri virus enterici (*Zobba et al., 2021*).

### **Patogenesi e Segni clinici**

Le descrizioni di astrovirosi nel cane sono molto limitate e, pertanto, i dati disponibili. Gli insuccessi nell'isolamento del virus hanno ulteriormente limitato le possibilità di studio. I rari studi sierologici indicano una sieroprevalenza maggiore in cani di età superiore ai 3 mesi di età, probabilmente in relazione al declino degli anticorpi di origine materna (*Martella et al., 2011a, 2011b*). Gli AstV sono stati identificati sia in casi clinici di enterite da lieve a moderata, spesso in associazione ad altri virus enterici (principalmente, CPV-2) sia in cani asintomatici, non consentendo una conclusiva associazione tra la positività diagnostica ed i segni di enterite. Gli AstV sono stati segnalati prevalentemente, ma non esclusivamente, nei cuccioli, sebbene siano stati documentati casi clinici di enterite associata all'infezione da AstV anche in soggetti adulti (*Martella et al., 2012*). I segni clinici ad oggi documentati sono esclusivamente enterici, caratterizzati da diarrea acquosa solitamente autolimitante, sebbene l'eliminazione fecale del virus possa proseguire oltre la remissione dei segni clinici (*Martella et al., 2012*). L'eliminazione del virus protratta dopo l'infezione acuta e la sua resistenza intrinseca negli ambienti potrebbero facilitarne la diffusione (*Martella et al., 2011b*).

Questi studi sono stati eseguiti selezionando campioni di feci di cani con segni clinici di enterite o asintomatici. In altre specie di mammiferi domestici, gli AstV sono stati rilevati in altri organi ed apparati, quali quello respiratorio o il sistema nervoso centrale, verosimilmente associati a segni clinici respiratori o neurologici, suggerendo quindi un differente tropismo tissutale. Sono stati difatti associati a segni respiratori in bovini (*Gaudino et al., 2023*) e suini (*Rahe et al., 2023*) e neurologici in ruminanti (*Giannitti et al., 2019; Kauer et al., 2019*), in suini (*Boros et al., 2017*) e visoni (*Lu et al., 2022*). Ad oggi, nel cane non risultano ricercati gli AstV in tessuti diversi da quello del tratto gastrointestinale.

## Diagnosi

Il rilievo di astrovirus nel cane si basa su prove di microscopia elettronica dopo colorazione negativa e prove di biologia molecolare (RT-PCR, Real Time RT-PCR). I tentativi di isolamento del virus sono apparsi ad oggi infruttuosi, seppure in rari casi abbiano dato esito positivo su linea cellulare Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) (Martella *et al.*, 2011a). La genotipizzazione e lo studio si basa su analisi di sequenziamento del genoma virale, attraverso il sequenziamento della regione RdRp, come nella maggior parte degli studi, o con maggiore accuratezza attraverso il sequenziamento dell'ORF2.

## Bibliografia

- Appleton, H.; Higgins, P.G. Letter: Viruses and Gastroenteritis in Infants. *Lancet* 1975, 1, 1297, doi:10.1016/s0140-6736(75)92581-7.
- Boros, Á.; Albert, M.; Pankovics, P.; Bíró, H.; Pesavento, P.A.; Phan, T.G.; Delwart, E.; Reuter, G. Outbreaks of Neuroinvasive Astrovirus Associated with Encephalomyelitis, Weakness, and Paralysis among Weaned Pigs, Hungary. *Emerg Infect Dis* 2017, 23, 1982–1993, doi:10.3201/eid2312.170804.
- Bosch, A.; Pintó, R.M.; Guix, S. Human Astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 2014, 27, 1048–1074, doi:10.1128/CMR.00013-14.
- Gaudino, M.; Salem, E.; Ducatez, M.F.; Meyer, G. Identification of Astrovirus in the Virome of the Upper and Lower Respiratory Tracts of Calves with Acute Signs of Bronchopneumonia. *Microbiol Spectr* 2023, 11, e0302623, doi:10.1128/spectrum.03026-23.
- Giannitti, F.; Caffarena, R.D.; Pesavento, P.; Uzal, F.A.; Maya, L.; Fraga, M.; Colina, R.; Castells, M. The First Case of Bovine Astrovirus-Associated Encephalitis in the Southern Hemisphere (Uruguay), Uncovers Evidence of Viral Introduction to the Americas From Europe. *Front Microbiol* 2019, 10, 1240, doi:10.3389/fmicb.2019.01240.
- Hargest, V.; Davis, A.E.; Tan, S.; Cortez, V.; Schultz-Cherry, S. Human Astroviruses: A Tale of Two Strains. *Viruses* 2021, 13, 376, doi:10.3390/v13030376.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2024. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202402630&taxon\\_name=Mamastrovirus%20canis](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202402630&taxon_name=Mamastrovirus%20canis)
- Janowski, A.B. Beyond the Gastrointestinal Tract: The Emerging and Diverse Tissue Tropisms of Astroviruses. *Viruses* 2021, 13, 732, doi:10.3390/v13050732.
- Kauer, R.V.; Koch, M.C.; Hierweger, M.M.; Werder, S.; Boujon, C.L.; Seuberlich, T. Discovery of Novel Astrovirus Genotype Species in Small Ruminants. *PeerJ* 2019, 7, e7338, doi:10.7717/peerj.7338.
- Lanave, G.; Loconsole, D.; Centrone, F.; Catella, C.; Capozza, P.; Diakoudi, G.; Parisi, A.; Suffredini, E.; Buonavoglia, A.; Camero, M.; et al. Astrovirus VA1 in Patients with Acute Gastroenteritis. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 864–869, doi:10.1111/tbed.13979.
- Lu, R.-G.; Li, S.-S.; Hu, B.; Li, H.-Y.; Tian, H.; Liu, W.-Q.; Yan, X.-J.; Liu, H.; Bai, X. The First Evidence of Shaking Mink Syndrome-Astrovirus Associated Encephalitis in Farmed Minks, China. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 3979–3984, doi:10.1111/tbed.14693.
- Madeley, C.R.; Cosgrove, B.P. Letter: 28 Nm Particles in Faeces in Infantile Gastroenteritis. *Lancet* 1975, 2, 451–452, doi:10.1016/s0140-6736(75)90858-2.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Catella, C.; Larocca, V.; Pinto, P.; Losurdo, M.; Corrente, M.; Lorusso, E.; Bányai, K.; Decaro, N.; et al. Enteric Disease in Dogs Naturally Infected by a Novel Canine Astrovirus. *J Clin Microbiol* 2012, 50, 1066–1069, doi:10.1128/JCM.05018-11.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Buonavoglia, C. Astroviruses in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011a, 41, 1087–1095, doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.001.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Lorusso, E.; Mari, V.; Camero, M.; Bellacicco, A.; Losurdo, M.; Pinto, P.; Desario, C.; Bányai, K.; et al. Detection and Characterization of Canine Astroviruses. *J Gen Virol* 2011b, 92, 1880–1887, doi:10.1099/vir.0.029025-0.
- Mihalov-Kovács, E.; Martella, V.; Lanave, G.; Bodnar, L.; Fehér, E.; Marton, S.; Kemenesi, G.; Jakab, F.; Bányai, K. Genome Analysis of Canine Astroviruses Reveals Genetic Heterogeneity and Suggests Possible Inter-Species Transmission. *Virus Res* 2017, 232, 162–170, doi:10.1016/j.virusres.2016.12.005.

- Rahe, M.C.; Michael, A.; Piñeyro, P.E.; Groeltz-Thrush, J.; Derscheid, R.J. Porcine Astrovirus 4 Detection in Lesions of Epitheliotropic Viral Infection in the Porcine Respiratory Tract. *Transbound Emerg Dis* 2023, 2023, 9113355, doi:10.1155/2023/9113355.
- Reuter, G.; Pankovics, P.; Boros, Á. Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals. *Clin Microbiol Rev* 2018, 31, e00040-18, doi:10.1128/CMR.00040-18.
- Snodgrass, D.R.; Gray, E.W. Detection and Transmission of 30 Nm Virus Particles (Astroviruses) in Faeces of Lambs with Diarrhoea. *Arch Virol* 1977, 55, 287–291, doi:10.1007/BF01315050.
- Toffan, A.; Jonassen, C.M.; De Battisti, C.; Schiavon, E.; Kofstad, T.; Capua, I.; Cattoli, G. Genetic Characterization of a New Astrovirus Detected in Dogs Suffering from Diarrhoea. *Vet Microbiol* 2009, 139, 147–152, doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.031.
- Woode, G.N.; Bridger, J.C. Isolation of Small Viruses Resembling Astroviruses and Caliciviruses from Acute Enteritis of Calves. *J Med Microbiol* 1978, 11, 441–452, doi:10.1099/00222615-11-4-441.
- Zobba, R.; Visco, S.; Sotgiu, F.; Pinna Parpaglia, M.L.; Pittau, M.; Alberti, A. Molecular Survey of Parvovirus, Astrovirus, Coronavirus, and Calicivirus in Symptomatic Dogs. *Vet Res Commun* 2021, 45, 31–40, doi:10.1007/s11259-020-09785-w.

## VIRUS DELL'EPATITE E

Il virus dell'epatite E (HEV) è un agente patogeno causa di epidemie e di casi sporadici localizzati di epatite acuta, considerato un problema di salute pubblica in tutto il mondo (*Tene et al., 2025*). A livello mondiale si stima infatti che ogni anno HEV causi oltre tre milioni di casi clinici (*WHO, Hepatitis E*), risultando la causa più comune o la seconda più comune di epatite virale acuta tra gli adulti in gran parte dell'Asia, del Medio Oriente e dell'Africa (*Purcell & Emerson, 2008; Kamar et al., 2012*). In Italia è stato osservato un trend positivo di incidenza a partire dal 2020; nel corso del 2024, sono stati segnalati 70 casi di epatite E, principalmente verificatisi nelle regioni Abruzzo e Lombardia (*SEIEVA-ISS*).

Il virus appartiene alla famiglia *Hepeviridae*, di cui fanno parte due sottofamiglie, *Orthohepevirinae* (in grado di infettare mammiferi e uccelli) e *Parahepevirinae*, e cinque generi (*Avihepevirus, Chirohepevirus, Paslahepevirus, Rocahepevirus* e *Piscihepevirus*) (*ICTV, 2024*). Il virus dell'epatite E è incluso nella specie *Paslahepevirus balayani*, che comprende otto genotipi (da HEV-1 a HEV-8) con una distribuzione mondiale molto eterogenea e un'ampia gamma di ospiti (*Tene et al., 2025*): i genotipi HEV-1/-4 e HEV-7 causano l'epatite negli esseri umani, mentre HEV-3 e HEV-4 sono presenti più frequentemente negli animali, tra cui maiali domestici, cinghiali, cervi e conigli (*Priemer et al., 2019; Zahmanova et al., 2023*). Il genotipo HEV-3 è quello maggiormente diffuso in Europa (*Izopet et al., 2019*). Dei genotipi HEV-1/-4 si riconoscono 24 sub-genotipi (cinque (a-e), due (a-b), dieci (a-j) e sette (a-g) rispettivamente per ciascun genotipo) (*Lu et al., 2006*).

L'HEV è un virus di piccole dimensioni (27-34 nm), privo di envelope, con un genoma a RNA a singolo filamento (ssRNA) di circa 7.200 paia di basi che codifica per tre ORF: la ORF1 codifica una proteina contenente motivi e domini funzionali, la ORF2 codifica la proteina del capsido virale e la ORF3 codifica una piccola proteina coinvolta nella morfogenesi e nel rilascio del virione (*Kamar et al., 2012*).

La sua trasmissione avviene attraverso un ciclo oro-fecale; sono comunemente considerate fonti di infezione l'ingestione di cibi non cotti o di acque contaminate. Il virus nell'uomo può essere causa di epatite acuta e, nei pazienti immunosoppressi, la malattia può progredire in epatite cronica e cirrosi.

## HEV NEL CANE

I dati sull'HEV nel cane sono limitati ed abbastanza recenti. Il crescente interesse nei confronti di questo virus, in relazione alla sua rilevanza nell'uomo, ha probabilmente contribuito ad estendere gli studi anche ad altre specie animali diverse da quelle maggiormente note (suidi e conigli), includendo in questi studi anche il cane ed altri carnivori.

Le indagini sierologiche hanno quindi determinato la presenza di anticorpi anti-HEV, evidenziando tassi di sieropositività variabile, sulla base dei quali sono state avanzate varie ipotesi, come l'ingestione di avanzi di cucina oppure di alimenti crudi di origine animale contaminati (*Arankalle et al., 2001; Liu et al., 2009; Liang et al., 2014; McElroy et al., 2015*). Questi dati sono quindi suggestivi dell'esposizione del cane a questo virus.

Sono invece limitati gli studi che si basano sulla ricerca diretta dell'RNA del virus, nessuno dei quali ha identificato l'RNA di HEV in campioni di intestino o nel contenuto intestinale dei cani (Liu *et al.*, 2009; Veronesi *et al.*, 2021; Caballero-Gómez *et al.*, 2022; Azevedo *et al.*, 2024; Ferrara *et al.*, 2024; Shun *et al.*, 2024).

Diversamente dal cane, recentemente è stato descritto il rilievo di HEV in carnivori selvatici, come le volpi e lupi. In questi animali, che condividono con il cane un comune spettro di patogeni di origine virale, il rilievo di HEV è stato associato alla probabile ingestione di prede come ratti o suidi, più comunemente serbatoio di HEV del genotipo 3 (Bodewes *et al.*, 2013; Lanszki *et al.*, 2020; Sarchese *et al.*, 2021).

### Diagnosi

Le indagini nel cane hanno attualmente solo una finalità di ricerca. A tal fine, in letteratura sono disponibili protocolli di RT-PCR e Real Time RT-PCR ad ampio spettro, in grado di identificare tutti i genotipi di HEV (“pan-orthohepeviruses” o “pan-hepevirus”) e, attraverso l'esame di sequenza, determinare a quale genotipo appartenga il ceppo in esame. Parte di questi protocolli sono stati comunemente utilizzati anche per la ricerca di HEV nelle matrici alimentari, quali mitili, muscoli e prodotti carnei.

### Bibliografia

- Arankalle, V.A.; Joshi, M.V.; Kulkarni, A.M.; Gandhe, S.S.; Chobe, L.P.; Rautmare, S.S.; Mishra, A.C.; Padbidri, V.S. Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus Antibodies in Different Indian Animal Species. *J Viral Hepat* 2001, 8, 223–227, doi:10.1046/j.1365-2893.2001.00290.x.
- Azevedo, L.S. de; Silva, V.C.M.; Guiducci, R.; Guadagnucci, S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Lopes, R.D.; da Costa, A.C.; Cunha, L.; Lemos, M.F.; et al. Emerging Zoonotic Risks: Detection of the Human Norovirus GII.4 Sydney[P31] Strain in a Domestic Dog in Brazil. *Acta Trop* 2024, 260, 107449, doi:10.1016/j.actatropica.2024.107449.
- Bodewes, R.; van der Giessen, J.; Haagmans, B.L.; Osterhaus, A.D.M.E.; Smits, S.L. Identification of Multiple Novel Viruses, Including a Parvovirus and a Hepevirus, in Feces of Red Foxes. *J Virol* 2013, 87, 7758–7764, doi:10.1128/JVI.00568-13.
- Caballero-Gómez, J.; Rivero-Juarez, A.; Jurado-Tarifa, E.; Jiménez-Martín, D.; Jiménez-Ruiz, E.; Castro-Scholten, S.; Ulrich, R.G.; López-López, P.; Rivero, A.; García-Bocanegra, I. Serological and Molecular Survey of Hepatitis E Virus in Cats and Dogs in Spain. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 240–248, doi:10.1111/tbed.14437.
- Ferrara, G.; Pagnini, U.; Improda, E.; Ciarcia, R.; Parisi, A.; Fiorito, F.; Della Valle, G.; Iovane, G.; Montagnaro, S. Detection of Anti-HEV Antibodies but No Molecular Positivity in Dogs in the Campania Region, Southern Italy. *One Health* 2024, 18, 100724, doi:10.1016/j.onehlt.2024.100724.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2024. [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202403665&taxon\\_name=Paslahepevirus%20balayani](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202403665&taxon_name=Paslahepevirus%20balayani)
- Izopet, J.; Tremeaux, P.; Marion, O.; Miguères, M.; Capelli, N.; Chapuy-Regaud, S.; Mansuy, J.-M.; Abravanel, F.; Kamar, N.; Lhomme, S. Hepatitis E Virus Infections in Europe. *J Clin Virol* 2019, 120, 20–26, doi:10.1016/j.jcv.2019.09.004.
- Kamar, N.; Bendall, R.; Legrand-Abravanel, F.; Xia, N.-S.; Ijaz, S.; Izopet, J.; Dalton, H.R. Hepatitis E. *Lancet* 2012, 379, 2477–2488, doi:10.1016/S0140-6736(11)61849-7.
- Lanszki, Z.; Kurucz, K.; Zeghib, S.; Kemenesi, G.; Lanszki, J.; Jakab, F. Identification of Hepatitis E Virus in the Feces of Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). *Animals (Basel)* 2020, 10, 1841, doi:10.3390/ani10101841.
- Liang, H.; Chen, J.; Xie, J.; Sun, L.; Ji, F.; He, S.; Zheng, Y.; Liang, C.; Zhang, G.; Su, S.; et al. Hepatitis E Virus Serosurvey among Pet Dogs and Cats in Several Developed Cities in China. *PLoS One* 2014, 9, e98068, doi:10.1371/journal.pone.0098068.

- Liu, J.; Zhang, W.; Shen, Q.; Yang, S.; Huang, F.; Li, P.; Guo, X.; Yang, Z.; Cui, L.; Zhu, J.; et al. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Pet Dogs in the Jiang-Zhe Area of China. *Scand J Infect Dis* 2009, 41, 291–295, doi:10.1080/00365540902767031.
- Lu, L.; Li, C.; Hagedorn, C.H. Phylogenetic Analysis of Global Hepatitis E Virus Sequences: Genetic Diversity, Subtypes and Zoonosis. *Rev Med Virol* 2006, 16, 5–36, doi:10.1002/rmv.482.
- McElroy, A.; Hiraide, R.; Bexfield, N.; Jalal, H.; Brownlie, J.; Goodfellow, I.; Caddy, S.L. Detection of Hepatitis E Virus Antibodies in Dogs in the United Kingdom. *PLoS One* 2015, 10, e0128703, doi:10.1371/journal.pone.0128703.
- Priemer, G.; Cierniak, F.; Wolf, C.; Ulrich, R.G.; Groschup, M.H.; Eiden, M. Co-Circulation of Different Hepatitis E Virus Genotype 3 Subtypes in Pigs and Wild Boar in North-East Germany, 2019. *Pathogens* 2022, 11, 773, doi:10.3390/pathogens11070773.
- Purcell, R.H.; Emerson, S.U. Hepatitis E: An Emerging Awareness of an Old Disease. *J Hepatol* 2008, 48, 494–503, doi:10.1016/j.jhep.2007.12.008.
- Sarchese, V.; Fruci, P.; Palombieri, A.; Di Profio, F.; Robetto, S.; Ercolini, C.; Orusa, R.; Marsilio, F.; Martella, V.; Di Martino, B. Molecular Identification and Characterization of a Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) Strain Detected in a Wolf Faecal Sample, Italy. *Animals (Basel)* 2021, 11, 3465, doi:10.3390/ani11123465.
- Shun, E.H.-K.; Situ, J.; Tsoi, J.Y.-H.; Wu, S.; Cai, J.; Lo, K.H.-Y.; Chew, N.F.-S.; Li, Z.; Poon, R.W.-S.; Teng, J.L.-L.; et al. Rat Hepatitis E Virus (Rocahepevirus Ratti) Exposure in Cats and Dogs, Hong Kong. *Emerg Microbes Infect* 2024, 13, 2337671, doi:10.1080/22221751.2024.2337671.
- Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) - Istituto Superiore di Sanità (ISS). <https://www.epicentro.iss.it/epatite/dati-seieva#e>
- Tene, S.D.; Diouara, A.A.M.; Sané, S.; Coundoul, S. Hepatitis E Virus (HEV) Infection in the Context of the One Health Approach: A Systematic Review. *Pathogens* 2025, 14, 704, doi:10.3390/pathogens14070704.
- Veronesi, R.; Morach, M.; Hübschke, E.; Bachofen, C.; Stephan, R.; Nüesch-Inderbilen, M. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Dogs in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 2021, 68, 8–11, doi:10.1111/zph.12779.
- WHO, Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- Zahmanova, G.; Takova, K.; Tordova, V.; Koynarski, T.; Lukov, L.L.; Minkov, I.; Pishmisheva, M.; Kotsev, S.; Tsachev, I.; Baymakova, M.; et al. The Re-Emergence of Hepatitis E Virus in Europe and Vaccine Development. *Viruses* 2023, 15, 1558, doi:10.3390/v15071558.

## PREMESSA ALLO STUDIO

In uno scenario globale di continui cambiamenti, determinati dai cambiamenti climatici, dalle attività sociali ed economiche umane, dagli spostamenti individuali o di massa a notevoli distanze ed in tempi rapidi, che coinvolgono sia le persone che gli animali e che incidono sulla diffusione di agenti patogeni noti o emergenti, si assiste ad un costante assottigliamento dei confini dell'interfaccia uomo-animale in relazione all'ambiente in cui questi co-esistono. Il modificato e rilevante ruolo sociale del cane, la crescente stretta convivenza tra questo e l'uomo, la necessità di gestione igienico-sanitaria dei cani urbanizzati privi di proprietario e quindi le necessità correlate alla tutela della sanità pubblica, aggiungono ulteriori elementi di assottigliamento e fragilità di questa linea di separazione, rendendo necessari ulteriori elementi di valutazione per lo sviluppo di nuove strategie di intervento.

Infatti, anche nella interfaccia uomo-animale, compresa la relazione con il cane, si è sviluppata una crescente necessità di un approccio integrato ed unificato, in particolare per le malattie a carattere zoonotico o emergenti (*Bowser & Anderson, 2018*). Da qui la possibilità di riconsiderare il cane come un potenziale modello di studio secondo questo approccio e la necessità di comprendere meglio l'epidemiologia ed il potenziale di trasmissione degli agenti infettivi di origine virale, sia di quelli classici – che hanno mostrato nel tempo un più ampio spettro d'ospite e nuovi mezzi di diffusione e trasmissione – sia di altri emergenti e potenzialmente rilevanti nell'interfaccia cane-uomo. Secondo questo approccio, il cane potrebbe essere considerato sia una sentinella di agenti patogeni in relazione all'ambiente e ai cambiamenti sociali, che un potenziale modello di studio evolucionistico di questi in relazione ad altre specie animali o all'ambiente in cui si diffondono. In tal senso, un esempio recente è stato offerto durante la pandemia COVID-19, quando è emersa la necessità di comprendere la significatività dell'infezione da SARS-CoV-2 nel cane, la potenzialità di trasmissione all'uomo od altre specie animali, oltre che la validità di questo come modello di studio dell'infezione virale nell'uomo (*Decaro et al., 2021; Piewbang et al., 2024*).

I recenti mutamenti sociopolitico globali, come ad esempio le rotte migratorie umane e la fuga dalle aree di conflitto, insieme agli spostamenti globali sempre più rapidi ed a lunga distanza o il sempre più frequente commercio/trasporto di animali domestici, hanno ulteriormente posto attenzione su nuovi potenziali *driver* di trasporto e diffusione di virus. In tal senso, un esempio recente è rappresentato dai rischi paventati a seguito del conflitto in Ucraina, uno tra i territori con il maggior numero di casi di rabbia nei cani (1718 casi totali segnalati in animali domestici e selvatici nel 2024, di cui il 62,8% in animali domestici (*WHO*). La presenza di un elevato numero di cani vaganti in larga parte dei territori colpiti dal conflitto (*WHO, 2023*) unitamente al trasporto di cani di proprietà al seguito dei rifugiati verso nazioni ufficialmente indenni dalla malattia (*Cobby & Eisler, 2024*) ha imposto l'immediato intervento delle autorità sanitarie per l'attuazione di strategie di sorveglianza e controllo (*FAO, 2022*). Anche la Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari (DGSAF) del Ministero della Salute italiano ha tempestivamente disposto misure e raccomandazioni da rispettare al fine di prevenire e controllare eventuali rischi per la salute sia dei profughi

che dei loro animali al seguito, oltre che delle persone sul territorio nazionale (*Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari*).

A tal fine, nella presente tesi dottorale si è deciso di indagare la diffusione e le caratteristiche di agenti infettivi di origine virale a tropismo enterico o epatico, classici ed emergenti, per approfondire le conoscenze epidemiologiche e il loro ruolo nel determinismo dei quadri clinici, studiando i genotipi e le caratteristiche del genoma dei ceppi individuati, con particolare interesse verso quei virus emergenti e potenzialmente rilevanti nell'interfaccia uomo-animale o che possano offrire elementi di studio comparativo con i virus correlati d'interesse nella specie umana.

- 
- Bowser, N.H.; Anderson, N.E. Dogs (*Canis Familiaris*) as Sentinels for Human Infectious Disease and Application to Canadian Populations: A Systematic Review. *Vet Sci* 2018, 5, 83, doi:10.3390/vetsci5040083.
- Cobby, T.R.; Eisler, M.C. Risk of Rabies Reintroduction into the European Union as a Result of the Russo-Ukrainian War: A Quantitative Disease Risk Analysis. *Zoonoses Public Health* 2024, 71, 515–525, doi:10.1111/zph.13135.
- Decaro, N.; Balboni, A.; Bertolotti, L.; Martino, P.A.; Mazzei, M.; Mira, F.; Pagnini, U. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats: Facts and Speculations. *Front Vet Sci* 2021, 8, 619207, doi:10.3389/fvets.2021.619207.
- Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari - Ufficio 3 - del Ministero della Salute. nota prot. n.5252 del 28/02/2022 e n. 7257 del 21 marzo 2021.
- FAO. The conflict in Ukraine and animal health. 2022. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/271f126d-a60d-4eaa-934b-b4d322ef4ec3/content>
- Piewbang, C.; Poonsin, P.; Lohavicharn, P.; Punyathi, P.; Kedsangsakonwut, S.; Kasantikul, T.; Techangamsuwan, S. Natural SARS-CoV-2 Infection in Dogs: Determination of Viral Loads, Distributions, Localizations, and Pathology. *Acta Trop* 2024, 249, 107070, doi:10.1016/j.actatropica.2023.107070.
- WHO, <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/queries>
- WHO. Eliminating rabies: Ukraine's journey from crisis to control. 2023. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/eliminating-rabies-ukraine-journey-from-crisis-to-control>

## CAPITOLO II

### SCOPO DELLO STUDIO

Sulla base di queste premesse, lo scopo del progetto è stato lo studio di virus classici (CPV-2, CAdV-1 e -2, CDV, CCoV) ed emergenti (NoV ed altri calicivirus, RoV, HEV, AstV) a tropismo enterico o epatico del cane e dell'epidemiologia genomica dei ceppi circolanti in Italia tra gennaio 2023 e febbraio 2025, attraverso:

1. la raccolta di campioni prelevati da cani (di proprietà e/o da rifugi/canili/ospedali veterinari ovvero i c.d. "multi-host settlements") e delle informazioni anamnestiche e cliniche correlate, per la definizione delle variabili e dei co-fattori individuali ed ambientali;
2. lo studio della diversità genomica dei ceppi circolanti sul territorio e le analisi filogenetiche, con individuazione dei clusters e loro caratterizzazione in relazione all'origine geografica e temporale, tenendo conto del contesto nazionale ed internazionale;
3. lo studio delle correlazioni tra virus del cane e quelli potenzialmente rilevanti per altre specie animali e, in particolare, per l'uomo;
4. la selezione e l'eleggibilità di nuovi modelli di studio dei virus secondo un approccio One Health.

Ci si prefigge quindi di pervenire alla definizione di nuove informazioni sull'epidemiologia ed il ruolo dei virus enterici ed epatici del cane, aggiornando i dati sui ceppi circolanti, valutando le correlazioni genomiche tra i virus della stessa specie ed i virus circolanti o potenzialmente rilevanti nella specie umana, ottenendo risorse biologiche utili per studi comparativi.

## **MATERIALE E METODI**

### **Disegno dello studio**

Per questa ricerca sono stati condotti:

- (i) uno studio prospettico, basato sull'analisi dei campioni ricevuti nel periodo da gennaio 2023 a febbraio 2025 durante l'ordinaria attività diagnostica dei laboratori del Dipartimento Attività Diagnostiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" (I.Z.S. della Sicilia);
- (ii) uno studio retrospettivo, basato sull'analisi di una collezione di genomi mantenuti a -80°C presso gli stessi laboratori. L'analisi riguardava le sequenze dei virus archiviate presso gli stessi laboratori e quelle depositate dagli stessi nei database di dominio pubblico (GenBank del National Center for Biotechnology Information, NCBI; DNA DataBank of Japan (DDBJ); European Nucleotide Archive (ENA), ed i relativi dati associati.

I campioni disponibili per lo studio sono stati raccolti durante le attività medico-cliniche di medici veterinari pubblici o liberi professionisti del territorio regionale o nazionale. I campioni analizzati sono stati collezionati da cani che mostravano segni clinici o lesioni *post-mortem* per cui è stato avanzato il sospetto di malattia gastro-enterica di probabile origine infettiva che rendeva necessari approfondimenti diagnostici, sia anatomo-patologici che di laboratorio. Ciascun campione, a cui sono stati associati i metadati identificativi ed anamnestici relativi, è stato identificato con un codice univoco corrispondente al numero di registrazione, sostituito nell'elaborato con un numero progressivo corrispondente a ciascun cane.

La selezione dei campioni su cui effettuare le analisi del presente studio è stata operata tenendo conto dei seguenti criteri di inclusione:

- (i) segni clinici/lesioni d'organo: i campioni analizzati provenivano esclusivamente da cani che mostravano segni clinici o lesioni *post-mortem* di malattia gastro-enterica di probabile origine infettiva;
- (ii) origine dei campioni: per lo studio prospettico erano inclusi i campioni collezionati da cani provenienti dal territorio della regione Sicilia; per lo studio retrospettivo sono stati inclusi anche alcuni campioni provenienti dal territorio nazionale;
- (iii) rappresentatività temporale: i campioni considerati per lo studio prospettico sono stati raccolti nel periodo di svolgimento delle attività del dottorato e sottoposti al set di test previsti e sviluppati per le specifiche indagini di laboratorio, mentre lo studio retrospettivo è stato svolto per offrire informazioni di *background* e con una maggiore profondità temporale ma utilizzando un set esami limitato alla maggior parte di virus target (CPV-2, CAdV-1 e 2, CCoV, CDV, NoV, RoV).

Tutti i campioni sono stati prelevati dai medici veterinari di riferimento seguendo le raccomandazioni fornite dall'Istituto per la raccolta e l'invio del materiale biologico da sottoporre ad indagine diagnostica. I campioni

pervenuti sono stati quindi stoccati a temperature controllate (-20°C i campioni e -80°C i genomi) fino all'inizio delle analisi e successivamente alle stesse, per garantire ulteriori studi o impieghi futuri.

### Estrazione del genoma totale e virus target

I genomi totali sono stati estratti a partire dai surnatanti ottenuti come descritto in Purpari et al. (2018) e purificati utilizzando i kit commerciali DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen S.p.A., Hilden, Germania) e QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen S.p.A.), rispettivamente per l'estrazione del DNA e dell'RNA, secondo le istruzioni fornite dal produttore. I campioni di DNA ed RNA sono stati quindi conservati a -80°C, fino ai successivi utilizzi.

I virus target delle indagini molecolari effettuate per questo studio sono qui di seguito elencati:

- Canine parvovirus type 2 (CPV-2)
- Canine adenovirus type 1 and 2 (CAAdV-1 and -2)
- Canine distemper virus (CDV)
- Canine coronavirus (CCoV)
- Norovirus (NoV)
- Calicivirus
- Rotavirus (RoV)
- Astrovirus (AstV)
- Hepatitis E virus (HEV).

### Screening dei virus

La presenza dei virus target nei campioni in esame è stata indagata attraverso un set di prove di biologia molecolare (PCR, RT-PCR o Real Time RT-PCR), messe a punto utilizzando i primer qui di seguito descritti:

<b>Canine parvovirus type 2*:</b>			
<b>Target</b>	gene VP2		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	VP2-850-Forward	GAGCATTGGGCTTACCA	<i>Touihri et al., 2009</i>
	VP2-1550-Reverse	GCAAGATGCATCAGGATC	

\*questo protocollo ed i relativi primers consentono di amplificare un frammento di DNA comune al CPV-2 del tipo di origine, alle sue varianti (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) ed al virus della panleucopenia felina (FPV).

<b>Canine adenovirus type 1 and 2:</b>			
<b>Target</b>	gene E3		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	HA1	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC	<i>Hu et al., 2001</i>
	HA2	CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT	

<b>Canine distemper virus:</b>			
<b>Target</b>	gene P		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)		
<b>Primers (5'→3')</b>	DMV-1	ATGTTTATGATCACAGCGGT	<i>Barrett et al., 1993</i>
	DMV-2	ATTGGGTTGCACCACTTGTC	

<b>Canine coronavirus:</b>			
<b>Target</b>	gene M		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)		
<b>Primers (5'→3')</b>	CCV1	TCCAGATATGTAATGTTCGG	<i>Pratelli et al., 1999</i>
	CCV2	TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	

<b>Norovirus:</b>			
<b>Target</b>	regione RdRp		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific)		
<b>Primers (5'→3')</b>	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYY	<i>Vennema et al., 2002</i>
	JV13I	TCATCATCACCATAGAAIGAG	

<b>Calicivirus:</b>			
<b>Target</b>	regione RdRp		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific)		
<b>Primers (5'→3')</b>	p290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	<i>Jiang et al., 1999</i>
	p289	TGACAATGTAATCATCACCATA	

<b>Rotavirus:</b>	
<b>Target</b>	gene NSP3
<b>Test di PCR/genoma</b>	Real Time RT-PCR/RNA

<b>Kit di amplificazione</b>	<sup>1</sup> Taq DNA Polymerase PCR Buffer (Invitrogen); <sup>1</sup> RANDOM Primers (Invitrogen); <sup>1</sup> MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)		
<b>Primers (5'→3')</b>	NVP3-FDeg NVP3-R1	ACCATCTWCACRTRACCCTC GGTCACATAACGCCCTATA 6-FAM-	<i>Freeman et al., 2008</i>
<b>Sonda</b>	NVP3-Probe	ATGAGCACAATAGTTAAAAGCT AACACTGTCAA-MGB	

<sup>1</sup>Reagenti usati per la retrotrascrizione dell'RNA.

#### Astrovirus:

<b>Target</b>	regione RdRp		
<b>Test di PCR/genoma</b>	heminested RT-PCR /RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	<sup>1</sup> SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific); <sup>2</sup> GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1</sup> For1 <sup>1</sup> For1 <sup>2</sup> For2 <sup>2</sup> For2 <sup>1,2</sup> Rev	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA CGKTAYGATGGKACKATHCC AGGTAYGATGGKACKATHCC GGYTTKACCCACATNCCRAA	<i>Chu et al., 2008</i>

<sup>1</sup>Kit e primers utilizzati per la prima reazione (RT-PCR); <sup>2</sup>Kit e primers utilizzati per la seconda reazione (nested-PCR).

#### Hepatitis E virus:

<b>Target</b>	regione RdRp		
<b>Test di PCR/genoma</b>	heminested RT-PCR /RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1,2</sup> HEV-F4228 <sup>1</sup> HEV-R4598 <sup>2</sup> HEV-R4565	ACYTTYTGTGCIYYTITTTGGTCCITGGTT GCCATGTTCCAGAYGGTGTTC CCGGGTTCCRCIGAGTGTTCCTTCCA	<i>Drexler et al., 2012</i>

Primers utilizzati <sup>1</sup>per la prima reazione (RT-PCR) e <sup>2</sup>per la seconda reazione (nested-PCR).

I risultati sono stati riportati come frequenze di rilevamento (valore percentuale) e, per alcuni, con i relativi intervalli di confidenza (IC 95%) calcolati utilizzando il metodo binomiale esatto (Clopper-Pearson).

#### Analisi di sequenza

I campioni di DNA risultati positivi alla ricerca del genoma target di CPV-2, sono stati sottoposti a due ulteriori saggi di PCR per l'amplificazione della sequenza quasi completa del gene codificante la proteina capsidica VP2 e della sequenza quasi completa del genoma di CPV-2, che include le sequenze dei geni codificanti le proteine non strutturali (NS1 ed NS2) e le proteine strutturali (VP1 e VP2).

Le sequenze parziali del gene VP2 e del genoma quasi completo di CPV-2 sono state ottenute attraverso due separati set di prove di PCR, messe a punto a partire dai protocolli ed utilizzando i primers qui di seguito descritti:

<b>Target</b>	gene VP2 di CPV-2		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1,2</sup> p1	ATGAGTGATGGAGCAGTTC	<i>Battilani et al., 2019</i>
	<sup>1</sup> VPR	TTTCTAGGGTGCTAGTTGAG	
	<sup>2</sup> 41-FOX2	GCCCTTGTGTAGACGC	
	<sup>2</sup> 353	CCTGGATTAACCAAACCTCC	

Primers utilizzati <sup>1</sup>per la fase di amplificazione e <sup>2</sup>per il sequenziamento del gene VP2 di CPV-2.

<b>Target</b>	sequenza quasi completa di CPV-2		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1,2</sup> NS-Fext	GACCGTTACTGACATTCGCTTC	<i>Pérez et al., 2014</i>
	<sup>1,2</sup> NS-Rext	GAAGGGTTAGTTGGTTCTCC	
	<sup>2</sup> 2161F	TTGGCGTTACTCACAAAGACGTGC	
	<sup>2</sup> 4823R	ACCAACCACCCACACCATAACAAC	
	<sup>1,2</sup> NS-Fint	GTTGAAACCACAGTGACGACAG	
	<sup>1,2</sup> NS-Rint	CATCATCCAGTCTTCAGGTG	
	<sup>2</sup> R2	TTTTGAATCCAATCTCCTTCTGGAT	
	<sup>2</sup> 3475R	GTTGGTGTGCCACTAGTCCAGTA	

I campioni di DNA risultati positivi alla ricerca del genoma target di CA<sub>AdV</sub>, sono stati sottoposti a due ulteriori saggi per l'amplificazione della sequenza completa dei geni codificanti le proteine capsidiche Hexon e Fiber, attraverso due separati set di prove di PCR, messe a punto a partire dai protocolli ed utilizzando i primers qui di seguito descritti:

<b>Target</b>	gene Hexon di CA <sub>AdV</sub>		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1,2</sup> CA <sub>AdV</sub> -Hexon-For1	GAAGTTTGCCGACCCTGTC	<i>Balboni et al., 2017</i>
	<sup>1,2</sup> CA <sub>AdV</sub> -Hexon-Rev1	ACTATGGCTCGCAGCTCTTC	
	<sup>2</sup> CA <sub>AdV</sub> -Hexon-For2	CTGATGCCTWTAAATACACACCTGA	
	<sup>2</sup> CA <sub>AdV</sub> -Hexon-Rev2	GACCTGAATATGGAACGAGCA	

Primers utilizzati <sup>1</sup>per la fase di amplificazione e <sup>2</sup>per il sequenziamento del gene Hexon di CA<sub>AdV</sub>.

<b>Target</b>	gene Fiber di CAdV		
<b>Test di PCR/genoma</b>	PCR/DNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega)		
<b>Primers (5'→3')</b>	<sup>1,2</sup> CAdV-Fiber-For1	ATGTGGTCTCTCCCACAGC	<i>Balboni et al., 2017</i>
	<sup>1,2</sup> CAdV-Fiber-Rev1	ACTTTTCCTGAAGGCGGYAG	
	<sup>2</sup> CAdV-Fiber-For2	ACCATATAACTCTAAGTGCTGGGAG	
	<sup>2</sup> CAdV-Fiber-Rev3	TATGGGAAAGTCCAGGTCCA	

Primers utilizzati <sup>1</sup>per la fase di amplificazione e <sup>2</sup>per il sequenziamento del gene Fiber di CAdV.

I campioni di RNA risultati positivi alla ricerca del genoma target di CCoV sono stati sottoposti ad ulteriori saggi di RT-PCR: due saggi per la genotipizzazione di CCoV (genotipi e sub genotipi CCoV-I, CCoV-IIa, CCoV-IIb) attraverso l'amplificazione di un frammento della sequenza dei geni di matrice (M) e spike (S); ulteriori due saggi sono stati quindi impiegati per ottenere le sequenze parziali del gene S dei ceppi di CCoV-I e CCoV-IIa. Questi saggi sono stati messi a punto a partire dai primer qui di seguito descritti:

<b>Target</b>	gene M di CCoV (genotipizzazione)			
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA			
<b>Kit di amplificazione</b>	QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)			
<b>Primers (5'→3')</b>	CCoV-I	CCoV1a CCoV2	GTGCTTCCTCTTGAAGGTACA TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	<i>Pratelli et al., 2004</i>
	CCoV-II	Can1F CCoV2	TAACATTGCTCTCAGGGAATTTG TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	

<b>Target</b>	gene S di CCoV (genotipizzazione)			
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA			
<b>Kit di amplificazione</b>	QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)			
<b>Primers (5'→3')</b>	CCoV-I	EL1F EL1R	CAAGTTGACCGTCTTATTACTG GTAG TCATATACGTACCATTATAGCT GAAGA	<i>Pratelli et al., 2004</i>
	CCoV-IIa	S5 S6	TGCATTTGTGTCTCAGACTT CCAAGGCCATTTTACATAAG	
	CCoV-IIb	CEPol-1 TGSP-2	TCTACAATTATGGCTCTATCAC TAATCACCTAAMACCACATCTG	<i>Erles &amp; Brownlie, 2008</i>

<b>Target</b>	gene S di CCoV-I (sequenziamento)		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		

<b>Kit di amplificazione</b>	SuperScript® IV One-Step RT-PCR system (ThermoFisher Scientific)		
<b>Primers (5'→3')</b>	PolEnd 1060dR	CTAAGGAAGGGTAAGTTGCTCA ATCAGCAGATGCTTGRGGACA	<i>Ntafis et al., 2013</i>
<b>Target</b>	gene S di CCoV-IIa (sequenziamento)		
<b>Test di PCR/genoma</b>	RT-PCR/RNA		
<b>Kit di amplificazione</b>	SuperScript® IV One-Step RT-PCR system (ThermoFisher Scientific)		
<b>Primers (5'→3')</b>	20179 INS-R-dg	GGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAG GCTGTAACATAKTCRTCATTCCAC	<i>Decaro et al., 2010</i>

I prodotti di amplificazione ottenuti dai saggi di PCR/RT-PCR classica (PCR, RT-PCR ed heminested RT-PCR) per lo screening dei virus in esame e per il sequenziamento di CPV-2, CAdV e CCoV, sono stati purificati utilizzando il kit commerciale Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences) ed inviati alla BMR Genomics srl (Padova, Italia) per il sequenziamento diretto di tipo Sanger, utilizzando i primers esterni ed i primers addizionali interni (specificamente quelli descritti per le PCR di sequenziamento di CPV-2).

Le sequenze ricevute sono state visualizzate e verificate utilizzando i software Chromas 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd, Australia) e BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), assemblate ed analizzate utilizzando i software Geneious Prime 2022.0.2 (Biomatters, USA) e BioEdit 7.2.5. Le matrici di identità di sequenza sono state generate attraverso il software BioEdit 7.2.5.

Le sequenze nucleotidiche assemblate sono state inoltrate a BLASTn (*Zhang et al., 2000*) per ricercare le sequenze maggiormente correlate nei database di dominio pubblico e per la creazione dei set di sequenze (dataset) necessari alle successive analisi di filogenesi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ultimo accesso il 4 agosto 2025). La discriminazione tra il tipo (CPV-2 di origine/FPV) e le varianti di CPV-2 (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) è stata basata sull'analisi del residuo amminoacidico 426 della sequenza del gene VP2 (*Martella et al., 2005*). La determinazione dei ceppi vaccinali di CPV-2 è stata basata sulla comparazione con sequenze note dei ceppi vaccinali (*Schirò et al., 2023*). Per tale scopo e ad integrazione delle sequenze dei ceppi vaccinali disponibili, è stata prodotta la sequenza di un ceppo vaccinale (Parvovirus canino vivo ricombinante ceppo 630a) di più recente immissione in commercio.

### Analisi filogenetica

Per valutare le relazioni con le sequenze correlate e precedentemente depositate nei database di dominio pubblico, le sequenze ottenute sono state allineate con quelle raggruppate nei *dataset* ottenuti da GenBank, utilizzando i software Geneious Prime 2022.0.2 e BioEdit 7.2.5. Da GenBank sono stati anche raccolti i metadati associati per potere descrivere la data di collezione dei campioni, la specie ospite/matrice e la nazione di origine, e potere annotare questi dati alle sequenze. Ciascun dataset di sequenze prodotto è stato sottoposto ad analisi filogenetica con metodo Maximum Likelihood, utilizzando il software MEGA X (Kumar et al., 2018) ed il più appropriato modello evolutivo (di sostituzione), determinato attraverso la funzione “*Find Best DNA/Protein Models (ML)*” e selezionando quello con il più basso criterio di

informazione Bayesiana (Bayesian Information Criterion, BIC). L'affidabilità dei *clades* dedotti dalla filogenesi è stata quindi valutata eseguendo l'analisi di bootstrap su 1000 repliche. Per annotare ed editare gli alberi filogenetici sono stati utilizzati i software MEGA X e FigTree v.1.4.4 (Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### Bibliografia

- Balboni, A.; Dondi, F.; Agnoli, C.; Verin, R.; Gruarin, M.; Morini, M.; Battilani, M. Novel Sequence Variants of Viral Hexon and Fibre Genes in Two Dogs with Canine Adenovirus Type 1-Associated Disease. *Vet J* 2017, 223, 73–75, doi:10.1016/j.tvjl.2017.05.011.
- Barrett, T.; Visser, I.K.; Mamaev, L.; Goatley, L.; van Bresseem, M.F.; Osterhaust, A.D. Dolphin and Porpoise Morbilliviruses Are Genetically Distinct from Phocine Distemper Virus. *Virology* 1993, 193, 1010–1012, doi:10.1006/viro.1993.1217.
- Battilani, M.; Modugno, F.; Mira, F.; Purpari, G.; Di Bella, S.; Guercio, A.; Balboni, A. Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus Type 2 in Italy from 1994 to 2017: Recurrence of the CPV-2b Variant. *BMC Vet Res* 2019, 15, 393, doi:10.1186/s12917-019-2096-1.
- Chu, D.K.W.; Poon, L.L.M.; Guan, Y.; Peiris, J.S.M. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *J Virol* 2008, 82, 9107–9114, doi:10.1128/JVI.00857-08.
- Decaro, N.; Mari, V.; Elia, G.; Addie, D.D.; Camero, M.; Lucente, M.S.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Recombinant Canine Coronaviruses in Dogs, Europe. *Emerg Infect Dis* 2010, 16, 41–47, doi:10.3201/eid1601.090726.
- Drexler, J.F.; Seelen, A.; Corman, V.M.; Fumie Tateno, A.; Cottontail, V.; Melim Zerbinati, R.; Gloza-Rausch, F.; Klose, S.M.; Adu-Sarkodie, Y.; Oppong, S.K.; et al. Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *J Virol* 2012, 86, 9134–9147, doi:10.1128/JVI.00800-12.
- Erles, K.; Brownlie, J. Sequence Analysis of Divergent Canine Coronavirus Strains Present in a UK Dog Population. *Virus Res* 2009, 141, 21–25, doi:10.1016/j.virusres.2008.12.009.
- Freeman, M.M.; Kerin, T.; Hull, J.; McCaustland, K.; Gentsch, J. Enhancement of Detection and Quantification of Rotavirus in Stool Using a Modified Real-Time RT-PCR Assay. *J Med Virol* 2008, 80, 1489–1496, doi:10.1002/jmv.21228.
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999, 41, 95–98.
- Hu, R.L.; Huang, G.; Qiu, W.; Zhong, Z.H.; Xia, X.Z.; Yin, Z. Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. *Vet Res Commun* 2001, 25, 77–84, doi:10.1023/a:1006417203856.
- Jiang, X.; Huang, P.W.; Zhong, W.M.; Farkas, T.; Cubitt, D.W.; Matson, D.O. Design and Evaluation of a Primer Pair That Detects Both Norwalk- and Sapporo-like Caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999, 83, 145–154, doi:10.1016/s0166-0934(99)00114-7.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018, 35, 1547–1549, doi:10.1093/molbev/msy096.
- Martella, V.; Decaro, N.; Elia, G.; Buonavoglia, C. Surveillance Activity for Canine Parvovirus in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005, 52, 312–315, doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00875.x.
- Ntafis, V.; Mari, V.; Decaro, N.; Papanastassopoulou, M.; Pardali, D.; Rallis, T.S.; Kanellos, T.; Buonavoglia, C.; Xylouri, E. Canine Coronavirus, Greece. Molecular Analysis and Genetic Diversity Characterization. *Infect Genet Evol* 2013, 16, 129–136, doi:10.1016/j.meegid.2013.01.014.
- Pérez, R.; Calleros, L.; Marandino, A.; Sarute, N.; Iraola, G.; Grecco, S.; Blanc, H.; Vignuzzi, M.; Isakov, O.; Shomron, N.; et al. 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* 2014, 9, e111779, doi:10.1371/journal.pone.0111779.
- Pratelli, A.; Tempesta, M.; Greco, G.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Development of a Nested PCR Assay for the Detection of Canine Coronavirus. *J Virol Methods* 1999, 80, 11–15, doi:10.1016/s0166-0934(99)00017-8.

- Pratelli, A.; Decaro, N.; Tinelli, A.; Martella, V.; Elia, G.; Tempesta, M.; Cirone, F.; Buonavoglia, C. Two Genotypes of Canine Coronavirus Simultaneously Detected in the Fecal Samples of Dogs with Diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004, 42, 1797–1799, doi:10.1128/JCM.42.4.1797-1799.2004.
- Purpari, G.; Mira, F.; Di Bella, S.; Di Pietro, S.; Giudice, E.; Guercio, A. Investigation on canine parvovirus circulation in dogs from Sicily (Italy) by biomolecular assay. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2018, 68(1), 80–94.
- Schirò, G.; Mira, F.; Decaro, N.; Desario, C.; Chiaramonte, G.; Di Bella, S.; Cannella, V.; Purpari, G.; Ventriglia, G.; Randazzo, V.; et al. Persistence of DNA from Canine Parvovirus Modified-Live Virus in Canine Tissues. *Vet Res Commun* 2023, 47, 567–574, doi:10.1007/s11259-022-10008-7.
- Touihri, L.; Bouzid, I.; Daoud, R.; Desario, C.; El Goulli, A.F.; Decaro, N.; Ghorbel, A.; Buonavoglia, C.; Bahloul, C. Molecular Characterization of Canine Parvovirus-2 Variants Circulating in Tunisia. *Virus Genes* 2009, 38, 249–258, doi:10.1007/s11262-008-0314-1.
- Vennema, H.; de Bruin, E.; Koopmans, M. Rational Optimization of Generic Primers Used for Norwalk-like Virus Detection by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Clin Virol* 2002, 25, 233–235, doi:10.1016/s1386-6532(02)00126-9.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J Comput Biol* 2000, 7, 203–214, doi:10.1089/10665270050081478.

## RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Lo studio prospettico, basato sull'analisi dei campioni ricevuti nel periodo da gennaio 2023 a febbraio 2025 e relativi ad un campione totale di 51 cani (Tabella 1), ha prodotto i risultati qui di seguito riportati e discussi. Con l'eccezione del campione (tampone rettale) del cane id. 26, tutti i campioni analizzati (campioni di tessuto d'organo: intestino, fegato, polmone) sono stati collezionati *post-mortem*. Da questi ultimi n=50 cani, è stato possibile analizzare tutti e tre i tessuti d'organo oggetto d'esame collezionati da n=14 soggetti, mentre per i restanti 36 cani sono stati effettuati test diagnostici su n=32 campioni di fegato e n=20 campioni di polmoni. I campioni relativi al tratto/contenuto intestinale (tampone rettale/intestini) erano rappresentativi di 49 dei 51 cani oggetto d'esame. Maggiori dettagli relativi ai campioni analizzati sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Dettagli dei cani presi in esame nello studio prospettico.

<b>Id.</b>	<b>data</b>	<b>Età</b>	<b>Razza</b>	<b>Origine</b>	<b>Prov</b>	<b>Segni clinici/lesioni</b>
1	05/01/2023	Adulto	meticcio	randagio	SR	morte improvvisa
2	10/01/2023	Adulto	meticcio	canile sanitario	PA	stato comatoso; epatomegalia
3	26/01/2023	< 2 m	meticcio	di proprietà	TP	morte improvvisa
4	22/02/2023	< 2 m	Cirneco dell'Etna	di proprietà	PA	morte improvvisa
5	21/04/2023	4 mesi	meticcio	di proprietà	PA	sospetto avvelenamento; enterite
6	21/04/2023	4 mesi	meticcio	di proprietà	PA	sospetto avvelenamento; enterite
7	11/05/2023	40 giorni	meticcio	randagio	SR	enterite; disidratazione
8	11/05/2023	40 giorni	meticcio	randagio	SR	enterite; disidratazione
9	17/05/2023	giovane	meticcio	randagio	SR	enterite catarrale; disidratazione
10	22/05/2023	5 giorni	Border Collie	di proprietà	TP	mortalità neonatale
11	31/05/2023	2 mesi	n.d.	di proprietà	CT	versamento siero-emorragico addominale
12	05/06/2023	Adulto	Dobermann	di proprietà	RG	morte improvvisa
13	27/06/2023	8 giorni	n.d.	di proprietà	PA	mortalità neonatale
14	03/07/2023	3 mesi	Chihuahua	di proprietà	PA	enterite e degenerazione epatica
15	26/07/2023	3 mesi	meticcio	canile sanitario	RG	enterite emorragica
16	26/07/2023	3 mesi	meticcio	canile sanitario	RG	enterite emorragica
17	26/07/2023	2 mesi	meticcio	canile sanitario	RG	enterite emorragica
18	31/08/2023	2 mesi	meticcio	canile sanitario	PA	morte improvvisa
19	31/08/2023	2 mesi	meticcio	canile sanitario	PA	morte improvvisa
20	09/10/2023	4 mesi	meticcio	canile sanitario	PA	diarrea emorragica
21	11/10/2023	Adulto	meticcio	canile sanitario	PA	ittero
22	30/10/2023	2 mesi	Maltese	di proprietà	PA	vomito, diarrea emorragica
23	30/10/2023	1 mese	Shih Tzu	di proprietà	PA	vomito, diarrea emorragica
24	02/11/2023	Adulto	n.d.	di proprietà	RG	enterite catarrale
25	09/11/2023	Adulto	meticcio	canile sanitario	PA	epatomegalia-ritenzione fetale
26	11/12/2023	2 mesi	meticcio	canile sanitario	PA	gastroenterite emorragica

27	18/12/2023	2 mesi	Boston Terrier	di proprietà	ME	morte improvvisa/diarrea e vomito
28	05/02/2024	2 mesi	Cavalier King Charles spaniel	di proprietà	RG	enterite
29	13/02/2024	3 mesi	meticcio	canile sanitario	PA	emorragie al fegato
30	08/02/2024	2 mesi e 1/2	meticcio	di proprietà	ME	mortalità neonatale
31	19/02/2024	2 mesi	meticcio	randagio	RG	gastroenterite
32	19/02/2024	2 mesi	meticcio	randagio	RG	gastroenterite
33	27/02/2024	4 mesi	meticcio	di proprietà	EN	gastroenterite/sospetto avvelenamento
34	19/04/2024	4 anni	Chihuahua	di proprietà	TP	morte improvvisa
35	09/05/2024	8 mesi	pastore australiano	di proprietà	PA	gastroenterite emorragica
36	17/05/2024	6 mesi	meticcio	randagio	SR	enterite, polmonite
37	26/06/2024	2 mesi	Chihuahua	di proprietà	RG	gastrite
38	02/07/2024	7 anni	pastore tedesco	di proprietà	PA	morte improvvisa
39	02/07/2024	2 mesi	meticcio	randagio	TP	enterite emorragica; disidratazione
40	15/10/2024	3 mesi	meticcio	randagio	PA	diarrea emorragica; disidratazione
41	15/10/2024	3 mesi	meticcio	randagio	PA	diarrea emorragica; disidratazione
42	15/10/2024	3 mesi	meticcio	randagio	PA	diarrea emorragica; disidratazione
43	15/10/2024	3 mesi	meticcio	randagio	PA	diarrea emorragica; disidratazione
44	18/11/2024	2 mesi	meticcio	randagio	CT	versamento siero-emorragico addominale
45	22/11/2024	giovane	meticcio	canile sanitario	PA	melena
46	04/12/2024	40 giorni	meticcio	canile sanitario	PA	gastroenterite emorragica e broncopolmonite
47	07/01/2025	2 mesi	meticcio	canile sanitario	RG	enterite catarrale
48	09/01/2025	adulto	meticcio	canile sanitario	TP	cachessia e gastroenterite emorragica
49	09/01/2025	adulto	meticcio	canile sanitario	TP	cachessia e gastroenterite emorragica
50	10/01/2025	2 mesi	meticcio	canile sanitario	RG	enterite emorragica e polmonite; versamento siero-emorragico
51	24/02/2025	1 anno	meticcio	canile sanitario	RG	enterite emorragica

n.d.: dato non disponibile.

I cani di cui sono stati testati i campioni erano prevalentemente soggetti di età inferiore ad un anno di vita (41/51), di cui 22 cani di età uguale o inferiore ai 2 mesi di età (43,14%; IC 95%: 29,35-57,75%), 14 cani di età compresa tra i 2 ed i 6 mesi (27,45%; IC 95%: 15,89-41,74%) e 5 cani di età compresa tra gli 8 ed i 12 mesi (9,8%; IC 95%: 3,26-21,41%). Dieci cani (19,61%; IC 95%: 9,82-33,12%) avevano un'età superiore all'anno di vita, di cui uno (id. 38) aveva 7 anni di età.

Dei cani testati, 36 erano meticci, 12 di razza (prevalentemente di taglia piccola, eccetto 4 soggetti di taglia media), mentre di 3 cani non erano disponibili dati identificativi relativi alla razza. Una percentuale leggermente maggiore dei cani (60,78%) erano soggetti non di proprietà, tra cui cani randagi vaganti oppure introdotti in canile sanitario per cure o sterilizzazione, rispetto alla restante parte (39,22%) che era rappresentata da 20 cani di proprietà.

Circa la metà dei cani (45,1%) provenivano dalla provincia di Palermo, mentre gli altri cani provenivano dalle provincie di Ragusa (23,5%), Trapani (11,8%), Siracusa (9,8%), Messina e Catania (3,9%), Enna (2%) e nessun cane è stato campionato dalle provincie di Agrigento e Caltanissetta.

Dei n=51 cani in esame, n=12 (23,53%) sono risultati negativi alla ricerca di ciascuno dei virus ricercati, mentre nel restante numero di cani (n=39; 76,47%; IC 95%: 62,51-87,21%) sono state individuate infezioni singole (CPV/FPV=17; CCoV=4; CAdV-1=1) o multiple (CPV/CCoV=10; CPV/AstV=5; CCoV/AstV=1; CPV/CCoV/AstV=1), confermando la correlazione tra la presenza di uno o più agenti virali nei campioni di cani ed i sintomi/lesioni di malattia gastro-enterica.

Sono stati registrati risultati positivi nell'80,49% (33/41) dei cani di età inferiore all'anno di età e nel 60% (6/10) dei cani di età superiore all'anno: considerando i soggetti risultati positivi (n=39) in rapporto a queste due classi di età, un più elevato tasso di positività (84,61%; IC 95%: 69,47-94,14%) è stata osservato nei cani di età inferiore all'anno di età rispetto ai cani adulti (15,39%; IC 95%: 5,86-30,53%). Questi risultati riflettono una maggiore suscettibilità dei cani giovani a contrarre infezioni virali rispetto agli adulti, plausibilmente attribuibile ad una mancanza o insufficiente immunità protettiva.

I cani positivi erano rappresentati per la maggior parte da cani randagi/accolti nei canili sanitari (27/39; 69,23%; IC 95%: 52,43-82,98%), tra i quali i tassi di positività interessavano l'87,09% (27/31) dei cani appartenenti a questa categoria, mentre il 30,77% (12/39; IC 95%: 17,02-47,57%) dei cani risultava di proprietà e, tra loro, il 60% (12/20) dei cani ha dato esito positivo ai test. Il tasso di positività maggiore registrato per i cani randagi riflette la diffusione ambientale e tra i cani vaganti di questi virus, specie in un territorio dove il fenomeno del randagismo risulta marcato. Pertanto, questo potrebbe essere considerato come un soddisfacente campione di osservazione per la valutazione della diffusione dei virus in relazione all'ambiente ed ai territori in esame, sottolineando che la totalità di questi cani provenivano da contesti urbani e che, insieme ai cani di proprietà, questi cani risultano conviventi a più o meno stretto contatto con l'uomo. I principali risultati ottenuti sono riassunti e schematizzati nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Sintesi dei principali risultati dello studio prospettico.

<b>Id</b>	<b>CPV-2</b>	<b>CAdV-1</b>	<b>CAdV-2</b>	<b>CDV</b>	<b>CCoV</b>	<b>NoV</b>	<b>Caliciv.</b>	<b>RoV</b>	<b>AstV</b>	<b>HEV</b>
<b>1</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>2</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>3</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>4</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
<b>5</b>	<b>CPV-2b</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
<b>6</b>	<b>CPV-2b</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
<b>7</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>POS</b>	neg	neg	neg	neg	neg
<b>8</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>9</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<b>10</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
<b>11</b>	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>POS</b>	neg	neg		neg	neg
<b>12</b>	neg	neg	neg	neg	<b>POS</b>	n.e.	n.e.		neg	neg
<b>13</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg

14	neg	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
15	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
16	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
17	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
18	neg	neg	neg	neg	<b>POS</b>	neg	neg		<b>POS</b>	neg
19	neg	neg	neg	neg	<b>POS</b>	neg	neg		neg	neg
20	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>POS</b>	neg	neg		neg	neg
21	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	n.e.	n.e.		neg	neg
22	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
24	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
25	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg	neg	neg	neg
26	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
27	neg	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
28	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
29	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
30	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
31	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
32	<b>CPV-2c</b>	<b>POS</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
33	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
34	<b>CPV-2b</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
35	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
36	<b>CPV-2</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		<b>POS</b>	neg
37	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
38	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
39	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
40	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-IIa</b>	neg	neg		neg	neg
41	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
42	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-IIa</b>	neg	neg		neg	neg
43	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
44	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		<b>POS</b>	neg
45	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
46	<b>FPV</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
47	<b>CPV-2c</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
48	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
49	<b>CPV-2</b>	neg	neg	neg	<b>CCoV-I</b>	neg	neg		neg	neg
50	neg	<b>POS</b>	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg
51	<b>CPV-2</b>	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg

I risultati dello studio prospettico vengono qui di seguito dettagliati ed argomentati, comparandoli con quelli derivati dallo studio retrospettivo, basato su un numero variabile di cani in funzione dei campioni disponibili presso il laboratorio e dei target virali in esame (CPV-2: 346 cani; CCoV: 284; CadV-1 e 2: 291; Norovirus: 268; Rotavirus: 170). I dati vengono quindi analizzati e discussi, suddividendo la trattazione in due paragrafi

separati, includono rispettivamente (i) la trattazione relativa ai virus classici a tropismo enterico ed epatico e (ii) quella relativa ai virus emergenti potenzialmente rilevanti nell'interfaccia uomo-cane.

## VIRUS A TROPISMO ENTERICO ED EPATICO CLASSICI

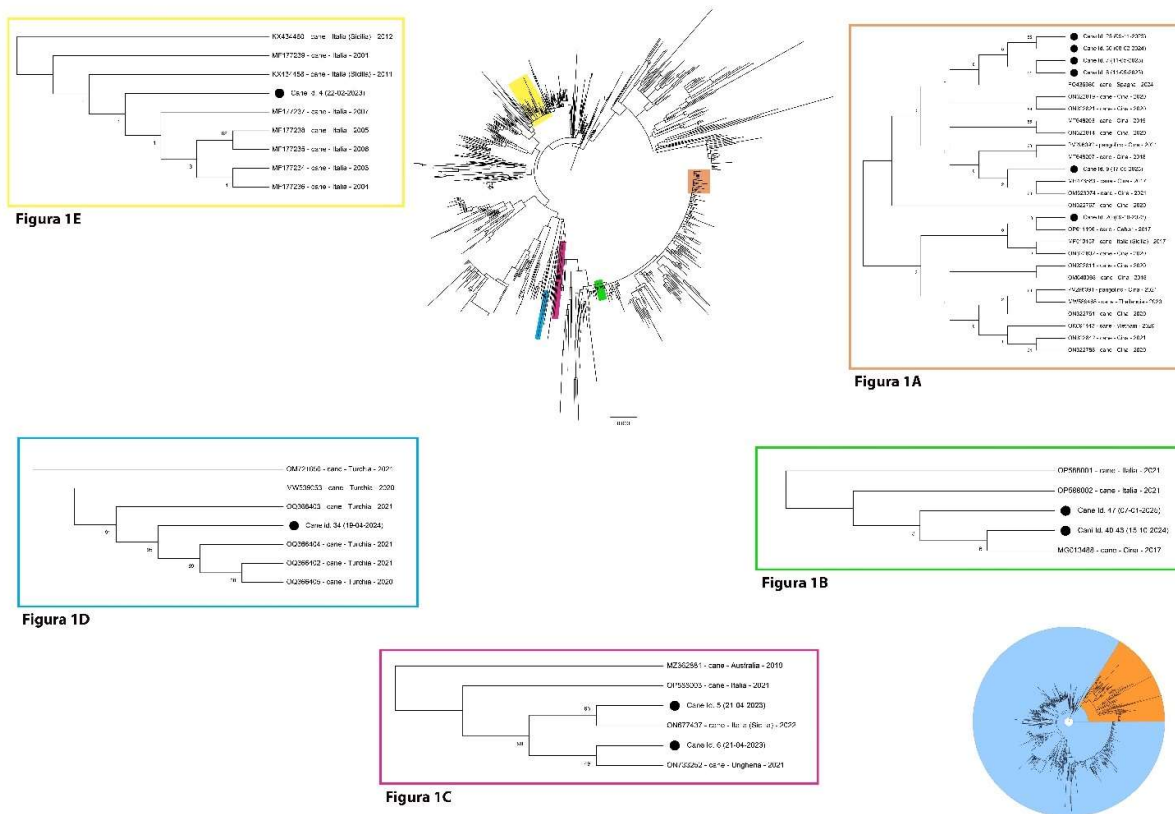
### Canine parvovirus type 2 (CPV-2)

Il test di screening per la ricerca del DNA di *Protoparvovirus carnivoran1* ha dato esito positivo nei campioni collezionati da 33/51 cani (64,70%). La determinazione del tipo virale (CPV-2/virus della panleucopenia felina, FPV) e delle varianti di CPV-2 (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c), basato sull'analisi di sequenza del genoma e dei residui amminoacidici che li discriminano, ha distinto i 33 ceppi virali individuati come appartenenti al genotipo originario CPV-2 (n=3; 9,09%), al genotipo FPV (n=1, 3,03%) ed alle varianti CPV-2b (n=3; 9,09%) e CPV-2c (n=26; 78,79%). La determinazione dei tassi di positività per genotipo e riferita al numero totale dei cani testati (n=51) ha prodotto i seguenti valori: CPV-2= 5,88% (3/51), FPV= 1,96% (1/51), CPV-2b= 5,88% (3/51) e CPV-2c= 50,98% (26/51).

La variante CPV-2c è stata pertanto quella maggiormente individuata durante il periodo di studio da tutte le provincie in esame, potendosi definire quindi la variante attualmente più diffusa nel territorio. La variante CPV-2b, osservata nel 5,88% dei cani in esame, è stata individuata ad aprile 2023 in due cani (id. 5 e 6) di origine dallo stesso luogo di prelievo ed in un cane (id. 34) approdato ad aprile 2024 sulle coste della provincia di Trapani al seguito dei proprietari, dichiaratisi partiti dalle coste della Tunisia. Questi risultati riflettono la continua dinamicità dello scenario epidemiologico, condizionato da molti aspetti, tra cui quello della gestione dei cani (in particolare dei cani randagi) e della loro movimentazione, delle note caratteristiche intrinseche di resistenza del virus e quindi il suo trasporto passivo, o anche da alcune ipotizzate caratteristiche di maggiore virulenza di alcune varianti, come la CPV-2c, o di riduzione/fallimenti della protezione vaccinale. Tutti questi aspetti potrebbero favorire la fitness evolutiva e la diffusione di questo virus, come anche di alcune varianti rispetto ad altre. In particolare, l'analisi di sequenza dei ceppi della variante CPV-2c ha evidenziato elevati gradi di identità nucleotidica con i ceppi di CPV-2c classici (sequenza del gene VP2: 99,94% con i ceppi 56/00, primo ceppo CPV-2c descritto in letteratura (*Buonavoglia et al., 2001*), e CPV\_IZSSI\_2323\_11, descritto in Sicilia nel 2011 (*Mira et al., 2019a*)), descritti a partire dal 2000 in Italia (*Buonavoglia et al., 2001; Decaro & Buonavoglia 2012*) e poi rapidamente diffusisi in tutto il mondo (*Decaro et al., 2007; Miranda et al., 2016*), in 2 delle 26 sequenze di CPV-2c.

Per tutti gli altri ceppi di CPV-2c (n=24) è stata rilevata un'elevata identità nucleotidica con ceppi di questa variante ma di più recente individuazione (nel 2008) (*Franzo et al., 2023*) e di recente descrizione in Europa (dal 2017) (*Mira et al., 2018*), definiti nella letteratura scientifica corrente come "CPV-2c di origine asiatica" o "CPV-2c Asian-like" (*Franzo et al., 2023; Mira et al., 2018*), per evidenziarne l'origine geografica. Le sequenze in esame hanno mostrato il 100% di identità nucleotidica con ceppi individuati nell'ultimo decennio in Asia (Indonesia nel 2013; Thailandia nel 2016 e 2020; Cina nel 2017 e 2019-2023; Vietnam nel 2017-2020; Corea del Sud nel 2017; India nel 2022), in Africa (Nigeria nel 2018; Gabon nel 2019), in Europa (Italia nel 2017 (*Mira et al., 2018*) e nel 2021 (*Mira et al., 2019b*); Spagna nel 2024) ed

America (Canada nel 2018). Difatti, questo *lineage* (CPV-2c Asiatico) ha mostrato una rapida diffusione globale e la progressiva sostituzione dei ceppi circolanti, con una tendenza a diventare il ceppo virale prevalente di CPV-2 nei territori Asiatici dove sono stati condotti studi estensivi (*Chen et al., 2021; Mon et al., 2022; Nguyen et al., 2022*). Similmente, lo studio retrospettivo condotto sui genomi di CPV-2 collezionati in Sicilia tra il 2019 ed il 2022 ha evidenziato importanti cambiamenti nelle frequenze relative delle varianti e dei *lineages* (CPV-2c Europei ed Asiatici), con una progressiva riduzione delle varianti CPV-2a e CPV-2b, diversamente dall'incremento proporzionale della variante CPV-2c, che rimane in ogni caso la variante maggiormente individuata durante l'intero periodo di studio (*Mira et al., 2024*). Inoltre, il progressivo incremento di individuazione della variante di CPV-2c Asiatico ha determinato una definitiva sostituzione della variante di CPV-2c Europea nel 2021 e nel 2022 (*Mira et al., 2024*). L'analisi filogenetica evidenzia la progressiva evoluzione di questo *lineage* e la segregazione delle sequenze sulla base dell'origine geografica e dell'anno di individuazione, piuttosto che sul solo residuo amminoacidico 426 della proteina VP2, classicamente valutato per la definizione della variante di CPV-2 (CPV-2a, CPV-2b o CPV-2c) (*Mira et al., 2024*) (Figura 1). Per l'analisi filogenetica (Figura 1) è stato incluso un numero totale di 12 sequenze quasi complete del genoma di CPV-2 (la sequenza include le ORF 1 e 2), insieme a tutte le sequenze di parvovirus dei carnivori (CPV-2, feline panleukopenia virus – FPV – e mink enteritis virus - MEV) della stessa lunghezza disponibili in GenBank (n=824; download: 08-08-2025): le sequenze di CPV-2 e di FPV/MEV risultano in grandi clades separati tra loro (evidenziati nella figura rispettivamente con lo sfondo blu ed arancione), che dipartono da una radice comune a sottolineare l'origine evolutiva; le sequenze in esame sono segregate in 5 sub-clades separati dell'albero filogenetico (Figura 1), di cui due (Figura 1A e 1B) che includono le sequenze dei ceppi CPV-2c “Asiatici”, altri due (Figura 1C e 1D) che includono i tre ceppi della variante CPV-2b, anche loro appartenenti al lineage “Asiatico”, mentre uno (Figura 1E), che include il ceppo CPV-2c “Europeo”, clusterizza con altri ceppi italiani e circolanti nel primo decennio degli anni 2000. I sub-clades sono stati evidenziati rispetto all'albero filogenetico generale per descriverne la topologia.



**Figura 1.** Albero filogenetico costruito con metodo Maximum-likelihood, modello statistico General Time Reversible, distribuzione Gamma e siti Invariati (GTR+G+I), basato su 837 sequenze quasi complete del genoma di CPV-2 (valori di bootstrap determinati su 1000 replicati; sono mostrati i valori di bootstrap superiori a 60). I clade delle figure 1A-D sono riferiti ai ceppi appartenenti al lineage “Asiatico” di CPV-2, mentre il clade della figura 1E appartiene al gruppo dei CPV-2c “Europei”. La miniatura in basso a destra evidenzia in celeste le sequenze dei CPV-2 ed in arancione quelle di FPV. I ceppi di CPV-2 analizzati in questo studio sono stati contrassegnati dal simbolo (●). Ciascuna sequenza è indicata con: accession number-specie ospite-paese ed anno di identificazione.

I ceppi di CPV-2b individuati dal 2023 al 2025 hanno mostrato caratteristiche differenti tra loro. Un ceppo, individuato in due cani (id. 5 e 6) conviventi nello stesso luogo di origine e campionati ad aprile 2023, ha mostrato elevata omologia (Tabella 3) con ceppi CPV-2b circolanti in Ungheria (2020-2022) ed in Slovacchia (2022), con ceppi individuati in Veneto da cani illegalmente introdotti dall’est-Europa e con ceppi individuati per la prima volta in Sicilia nel 2022 (Schirò *et al.*, 2022), suggerendo una possibile ricorrente introduzione dello stesso ceppo da Paesi dell’est-Europa in Sicilia o la sua diffusione sul territorio regionale dopo il 2022. Questo ceppo mostra i residui amminoacidici che discriminano i ceppi di origine Asiatica da quelli Europei (NS1: 60Val, 545Val, 630Pro; VP2: 5Gly, 267Tyr, 324Ile) ed altri residui raramente riportati in ceppi CPV-2b di origine Asiatica (NS1: 588N; VP2: 370Arg), suggerendo un’origine ed un’evoluzione comune ai ceppi CPV-2c Asiatici (Schirò *et al.*, 2022) e che la sua diffusione possa essere stata facilitata dal trasporto di cani verso territori distanti (Leopardi *et al.*, 2022).

**Tabella 3.** Identità nucleotidiche con ceppi CPV-2b correlati.

<b>Identità (%)</b>	<b>Accession number</b>	<b>Paese ed anno di origine</b>	<b>Bibliografia</b>
100%	ON733252	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
99,94%	ON185542	Ungheria, 2022	Non disponibile
“	ON677437	Italia (Sicilia), 2022	<i>Schirò et al., 2022</i>
“	OR463607	Italia (Sicilia), 2022	<i>Mira et al., 2024</i>
99,89%	OP588003	Italia (Veneto), 2022	<i>Leopardi et al., 2022</i>
“	OQ108903	Ungheria, 2022	Non disponibile
99,83%	OR825360	Slovacchia, 2022	<i>Pelegrinová et al., 2024</i>
“	OQ108899	Ungheria, 2020	Non disponibile

Un altro ceppo, individuato dall’analisi dei campioni del cane id. 34, approdato ad aprile 2024 sulle coste della provincia di Trapani al seguito dei proprietari, ha evidenziato caratteristiche del genoma distinte da quelle dei ceppi circolanti ad oggi in Europa e la correlazione con ceppi virali recentemente descritti in Turchia ed Egitto (2019-2021), e con ceppi descritti precedentemente (2010) in Thailandia (Tabella 4, Figura 1). L’analisi di questo ceppo ha infatti stimato la probabile origine di questo ceppo nel 2007 da ceppi provenienti dal Medio Oriente, correlati con quelli di probabile origine dalla Cina (*Mira et al., 2025*). L’evidenza di un ceppo divergente introdotto in un nuovo territorio attraverso il trasporto del cane sottolinea ancora una volta come la movimentazione degli animali e i fenomeni di migrazione rappresentino un driver di diffusione di CPV-2 su larga scala, come già precedentemente documentato in Italia (*Carrino et al., 2022; Leopardi et al., 2022; Mira et al., 2018; Urbani et al., 2022*), un fenomeno questo che andrebbe ulteriormente monitorato.

**Tabella 4.** Identità nucleotidiche con ceppi CPV-2b correlati.

<b>Identità (%)</b>	<b>Accession number</b>	<b>Paese, ospite ed anno di origine</b>	<b>Bibliografia</b>
99,83%	ON733252	Turchia, cane, 2021	<i>Abayli et al., 2022</i>
“	OM937914	Egitto, gatto, 2019	<i>Ndiana et al., 2022</i>
99,77%	KP715703	Thailandia, cane, 2010	<i>Inthong et al., 2020</i>
“	MW539053	Turchia, cane, 2020	<i>Temizkan et al., 2023</i>
“	OQ366405	Turchia, cane, 2020	<i>Temizkan et al., 2023</i>
“	OQ366402	Turchia, cane, 2021	<i>Temizkan et al., 2023</i>
99,72%	KP715690	Thailandia, cane, 2010	<i>Inthong et al., 2020</i>
“	KP715700	Thailandia, cane, 2010	<i>Inthong et al., 2020</i>
“	KP715712	Thailandia, cane, 2010	<i>Inthong et al., 2020</i>
“	MZ056882	Egitto, cane, 2019	<i>Adly et al., 2024</i>

L’analisi dei campioni del cane id. 46 ha evidenziato un ceppo virale della specie *Protoparvovirus carnivoran1* tipizzato come virus della panleucopenia felina (feline panleukopenia virus, FPV). L’analisi della sequenza parziale del gene VP2 ha infatti evidenziato un’elevata identità nucleotidica con ceppi di FPV identificati nei gatti in Sicilia nel 2019 (identità: 100%; accession number: PP351396) e nel nord-est d’Italia nel 2011 e nel 2017 (identità: 99,57%; accession number: MW847188 e MW847187). Questo raro risultato (rilevato solo nell’1,96% dei cani testati nel periodo 2023-2025 ed in nessuno dei campioni raccolti negli anni precedenti) non appare sorprendente, poiché il rilievo di ceppi di FPV nel cane è stato recentemente documentato, anche se in maniera inusuale, sia in cuccioli/soggetti giovani (1-5 mesi) in Cina

(Wen et al., 2024) che in soggetti subadulti (1 e 3 anni) in Egitto ed Italia centrale (Diakoudi et al., 2022). Il ceppo in questione è stato individuato nell'intestino, fegato e polmone di un cucciolo di circa 40 giorni, randagio nel comune di Palermo, deceduto dopo aver mostrato un grave quadro clinico di gastro-enterite emorragica e di bronco-polmonite. Il FPV è stato l'unico tra i virus oggetto dello studio rilevato in questo soggetto. Per quanto sia stata osservata una associazione tra FPV ed il quadro clinico/anatomo-patologico descritto in questo cucciolo, la disponibilità di ulteriori saggi, come ad esempio esami isto-patologici, avrebbe potuto fornire informazioni aggiuntive al quadro osservato.

Infine, in n=3 cani (id. 36, 49 e 51) sono stati rilevati ceppi virali identificati come il ceppo CPV-2 di origine (Tabella 5), non più circolante sul campo ma contenuto in alcuni vaccini. Dopo la somministrazione di questi vaccini vivi attenuati, i ceppi vaccinali di CPV-2 replicano nei tessuti linfoidei e nella mucosa intestinale, venendo eliminati attraverso le feci (Carmichael et al., 1981; Decaro et al., 2014), similmente ai ceppi di campo. Inoltre, il loro genoma persiste in alcuni tessuti d'organo dopo la somministrazione (Schirò et al., 2023). Attraverso l'analisi di sequenza dei prodotti di amplificazione e la comparazione con le sequenze note è pertanto possibile ricondurre la positività alla prova di PCR utilizzata per questo studio alla presenza di ceppi di origine vaccinale. Questi casi includevano soggetti giovani sottoposti ad accertamenti diagnostici e per cui la causa di decesso è stata ricondotta ad altre cause (chimici, parassitosi, altro), confermando il rilievo di CPV-2 come esclusivamente legato alla recente effettuazione della vaccinazione nei confronti dello stesso virus. Questo approccio consente quindi di evidenziare i ceppi vaccinali di CPV-2 e di descrivere con maggiore precisione l'epidemiologia dei ceppi CPV-2 di campo, risolvendo ogni potenziale misinterpretazione del risultato di laboratorio. La recente immissione in commercio di un vaccino vivo attenuato, allestito con un ceppo di parvovirus del cane ricombinante (ceppo 630a), che mostra una sequenza del gene VP2 sovrapponibile a quella dei ceppi classici CPV-2c, evidenzia ancora una volta la necessità di discriminare, in questo caso, i ceppi CPV-2c di campo da quello vaccinale.

**Tabella 5.** Variazioni amminoacidiche nella sequenza VP2 dei ceppi di CPV-2 di origine vaccinale.

Tipo/ variante	Origine	Nome ceppo/ Isolato	Accession number	Residuo amminoacidico										
				219	297	300	305	316	321	375	386	418	426	
CPV-2		CPV-b	M38245	I	S	A	D	V	N	N	Q	I	N	
CPV-2b	Campo	CPV-411b.us.98	EU659121	-	A	G	Y	-	-	D	-	-	D	
CPV-2c		CPV IZSSI 2323 11	KX434458	-	A	G	Y	-	-	D	-	-	E	
CPV-2			NL-35-D	ON479057	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-
CPV-2		154	ON479058	V	-	-	-	-	-	-	K	-	-	
CPV-2		CPV780916	ON479059	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	
CPV-2	Vaccino	CAG2	ON479060	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	
CPV-2b		SAH	FJ222822	-	A	G	Y	-	K	D	-	-	D	
CPV-2b		CPV39	ON479062	-	-	G	Y	-	-	D	-	-	D	
CPV-2b		CPV-2b Bio 12/B	ON479061	-	A	-	Y	-	-	D	-	-	D	
CPV-2c		630a	---	---	V	A	G	Y	-	-	D	K	-	E
CPV-2		Questo studio	Dog id. 36	---	n.d.	-	-	-	I	-	-	-	-	-
CPV-2			Dog id. 49	---	n.d.	-	-	-	-	-	-	K	-	-
CPV-2	Dog id. 51		---	---	n.d.	-	-	-	-	-	D	-	T	

n.d.: non disponibile

Questi risultati nel loro insieme evidenziano le dinamiche evoluzionistiche del CPV-2, caratterizzato da rate di mutazioni del genoma maggiore rispetto a quello dei classici virus a DNA, che si avvicinano piuttosto a quelle dei virus a RNA: la sua diffusione globale, la sua epidemiologia in continua evoluzione e la disponibilità di un numero consistente di sequenze disponibili portano a ritenere CPV-2 un modello di studio interessante tra i virus del cane. Lo spettro d'ospite esteso al gatto ed ai carnivori selvatici, insieme alle recenti evidenze del virus della panleucopenia felina nel cane, conferiscono al CPV-2 un grado di interesse scientifico di rilievo ancora dopo 45 dalla sua comparsa, anche in relazione all'influenza di nuovi drivers "sociali" di diffusione (globalizzazione, trasporti rapidi e su larga scala, spostamento dei cani al seguito del nucleo familiare con cui convivono, necessità di gestione dei cani vaganti) tali da non far limitare questo crescente interesse scientifico alla sola specie canina ma offrendo maggiori basi scientifiche alle nuove sfide che l'interfaccia uomo-animale oggi vede dover affrontare.

### Bibliografia

- Abayli, H.; Aslan, O.; Tumer, K.C.; Can-Sahna, K.; Tonbak, S. Predominance and First Complete Genomic Characterization of Canine Parvovirus 2b in Turkey. *Arch Virol* 2022, 167, 1831–1840, doi:10.1007/s00705-022-05509-4.
- Adly, M.M.; Elgaml, M.A.; Abdel Khalek, A.F.; Saeed, O.S.; Shalaby, M.A.; Amer, H.M. Molecular Characterization of Full-Length VP2 Gene of Canine Parvovirus Type 2 Strains Circulating in Egypt 2019-2021. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2024, 110, 102190, doi:10.1016/j.cimid.2024.102190.
- Boros, Á.; Albert, M.; Urbán, P.; Herczeg, R.; Gáspár, G.; Balázs, B.; Cságola, A.; Pankovics, P.; Gyenesei, A.; Reuter, G. Unusual "Asian-Origin" 2c to 2b Point Mutant Canine Parvovirus (Parvoviridae) and Canine Astrovirus (Astroviridae) Co-Infection Detected in Vaccinated Dogs with an Outbreak of Severe Haemorrhagic Gastroenteritis with High Mortality Rate in Hungary. *Vet Res Commun* 2022, 46, 1355–1361, doi:10.1007/s11259-022-09997-2.
- Buonavoglia, C.; Martella, V.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Cavalli, A.; Buonavoglia, D.; Bozzo, G.; Elia, G.; Decaro, N.; Carmichael, L. Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001, 82, 3021–3025, doi:10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Carmichael, L.E.; Joubert, J.C.; Pollock, R.V. A Modified Live Canine Parvovirus Strain with Novel Plaque Characteristics. I. Viral Attenuation and Dog Response. *Cornell Vet* 1981, 71, 408–427.
- Carrino, M.; Tassoni, L.; Campalto, M.; Cavicchio, L.; Mion, M.; Corrà, M.; Natale, A.; Beato, M.S. Molecular Investigation of Recent Canine Parvovirus-2 (CPV-2) in Italy Revealed Distinct Clustering. *Viruses* 2022, 14, 917, doi:10.3390/v14050917.
- Chen, B.; Zhang, X.; Zhu, J.; Liao, L.; Bao, E. Molecular Epidemiological Survey of Canine Parvovirus Circulating in China from 2014 to 2019. *Pathogens* 2021, 10, 588, doi:10.3390/pathogens10050588.
- Decaro, N.; Buonavoglia, C. Canine Parvovirus--a Review of Epidemiological and Diagnostic Aspects, with Emphasis on Type 2c. *Vet Microbiol* 2012, 155, 1–12, doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.007.
- Decaro, N.; Crescenzo, G.; Desario, C.; Cavalli, A.; Losurdo, M.; Colaianni, M.L.; Ventrella, G.; Rizzi, S.; Aulicino, S.; Lucente, M.S.; et al. Long-Term Viremia and Fecal Shedding in Pups after Modified-Live Canine Parvovirus Vaccination. *Vaccine* 2014, 32, 3850–3853, doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.050.
- Decaro, N.; Desario, C.; Addie, D.D.; Martella, V.; Vieira, M.J.; Elia, G.; Zicola, A.; Davis, C.; Thompson, G.; Thiry, E.; et al. The Study Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1222–1224, doi:10.3201/eid1308.070505.
- Diakoudi, G.; Desario, C.; Lanave, G.; Salucci, S.; Ndiana, L.A.; Zarea, A.A.K.; Fouad, E.A.; Lorusso, A.; Alfano, F.; Cavalli, A.; et al. Feline Panleukopenia Virus in Dogs from Italy and Egypt. *Emerg Infect Dis* 2022, 28, 1933–1935, doi:10.3201/eid2809.220388.
- Franzo, G.; Mira, F.; Schirò, G.; Canuti, M. Not Asian Anymore: Reconstruction of the History, Evolution, and Dispersal of the "Asian" Lineage of CPV-2c. *Viruses* 2023, 15, 1962, doi:10.3390/v15091962.
- Inthong, N.; Kaewmongkol, S.; Meekhanon, N.; Sirinarumit, K.; Sirinarumit, T. Dynamic Evolution of Canine Parvovirus in Thailand. *Vet World* 2020, 13, 245–255, doi:10.14202/vetworld.2020.245-255.

- Leopardi, S.; Milani, A.; Cocchi, M.; Bregoli, M.; Schivo, A.; Leardini, S.; Festa, F.; Pastori, A.; de Zan, G.; Gobbo, F.; et al. Carnivore Protoparvovirus 1 (CPV-2 and FPV) Circulating in Wild Carnivores and in Puppies Illegally Imported into North-Eastern Italy. *Viruses* 2022, 14, 2612, doi:10.3390/v14122612.
- Mira, F.; Purpari, G.; Lorusso, E.; Di Bella, S.; Gucciardi, F.; Desario, C.; Macaluso, G.; Decaro, N.; Guercio, A. Introduction of Asian Canine Parvovirus in Europe through Dog Importation. *Transbound Emerg Dis* 2018, 65, 16–21, doi:10.1111/tbed.12747.
- Mira, F.; Canuti, M.; Purpari, G.; Cannella, V.; Di Bella, S.; Occhiogrosso, L.; Schirò, G.; Chiamonte, G.; Barreca, S.; Pisano, P.; et al. Molecular Characterization and Evolutionary Analyses of Carnivore Protoparvovirus 1 NS1 Gene. *Viruses* 2019a, 11, 308, doi:10.3390/v11040308.
- Mira, F.; Franzo, G.; Schirò, G.; Vicari, D.; Purpari, G.; Cannella, V.; Giudice, E.; Trapani, M.; Carrozzo, A.; Spene, G.; et al. Introduction of a Divergent Canine Parvovirus Type 2b Strain with a Dog in Sicily, Southern Italy, Through the Mediterranean Sea Route to Europe. *Pathogens* 2025, 14, 108, doi:10.3390/pathogens14020108.
- Mira, F.; Purpari, G.; Di Bella, S.; Colaianni, M.L.; Schirò, G.; Chiamonte, G.; Gucciardi, F.; Pisano, P.; Lastra, A.; Decaro, N.; et al. Spreading of Canine Parvovirus Type 2c Mutants of Asian Origin in Southern Italy. *Transbound Emerg Dis* 2019b, 66, 2297–2304, doi:10.1111/tbed.13283.
- Mira, F.; Schirò, G.; Franzo, G.; Canuti, M.; Purpari, G.; Giudice, E.; Decaro, N.; Vicari, D.; Antoci, F.; Castronovo, C.; et al. Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus Type 2 in Sicily, Southern Italy: A Geographical Island, an Epidemiological Continuum. *Heliyon* 2024, 10, e26561, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26561.
- Miranda, C.; Thompson, G. Canine Parvovirus: The Worldwide Occurrence of Antigenic Variants. *J Gen Virol* 2016, 97, 2043–2057, doi:10.1099/jgv.0.000540.
- Mon, P.P.; Thurain, K.; Charoenkul, K.; Nasamran, C.; Wynn, M.; Tun, T.N.; Amonsin, A. Emergence of Canine Parvovirus Type 2c (CPV-2c) of Asian Origin in Domestic Dogs in Myanmar. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2022, 90–91, 101901, doi:10.1016/j.cimid.2022.101901.
- Ndiana, L.A.; Lanave, G.; Zarea, A.A.K.; Desario, C.; Odigie, E.A.; Ehab, F.A.; Capozza, P.; Greco, G.; Buonavoglia, C.; Decaro, N. Molecular Characterization of Carnivore Protoparvovirus 1 Circulating in Domestic Carnivores in Egypt. *Front Vet Sci* 2022, 9, 932247, doi:10.3389/fvets.2022.932247.
- Nguyen Van, D.; Le, T.D.H.; Maeda, K. Transition of Dominant Canine Parvovirus Genotype from 2b to 2c in Vietnamese Dogs. *Vet Ital* 2022, 58, doi:10.12834/VetIt.2237.13437.2.
- Pelegrinová, A.; Petroušková, P.; Korytár, L.; Ondrejková, A.; Drážovská, M.; Vojtek, B.; Mojžišová, J.; Prokeš, M.; Kostičák, M.; Zákutná, L.; et al. The First Evidence of Asian-like CPV-2b in Slovakia in a Vaccinated Dog with an Acute Fatal Course of Parvovirus Infection: A Case Report. *Vet Res Commun* 2024, 48, 3253–3262, doi:10.1007/s11259-024-10492-z.
- Schirò, G.; Mira, F.; Canuti, M.; Vullo, S.; Purpari, G.; Chiamonte, G.; Di Bella, S.; Cannella, V.; Randazzo, V.; Castronovo, C.; et al. Identification and Molecular Characterization of a Divergent Asian-like Canine Parvovirus Type 2b (CPV-2b) Strain in Southern Italy. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 11240, doi:10.3390/ijms231911240.
- Schirò, G.; Mira, F.; Decaro, N.; Desario, C.; Chiamonte, G.; Di Bella, S.; Cannella, V.; Purpari, G.; Ventriglia, G.; Randazzo, V.; et al. Persistence of DNA from Canine Parvovirus Modified-Live Virus in Canine Tissues. *Vet Res Commun* 2023, 47, 567–574, doi:10.1007/s11259-022-10008-7.
- Temizkan, M.C.; Sevinc Temizkan, S. Canine Parvovirus in Turkey: First Whole-Genome Sequences, Strain Distribution, and Prevalence. *Viruses* 2023, 15, 957, doi:10.3390/v15040957.
- Urbani, L.; Tirolo, A.; Balboni, A.; Troia, R.; Dondi, F.; Battilani, M. Concomitant Infections With Canine Parvovirus Type 2 and Intracellular Tick-Borne Pathogens in Two Puppy Dogs. *Front Vet Sci* 2022, 9, 964177, doi:10.3389/fvets.2022.964177.
- Wen, Y.; Tang, Z.; Wang, K.; Geng, Z.; Yang, S.; Guo, J.; Chen, Y.; Wang, J.; Fan, Z.; Chen, P.; et al. Epidemiological and Molecular Investigation of Feline Panleukopenia Virus Infection in China. *Viruses* 2024, 16, 1967, doi:10.3390/v16121967.

## Canine adenovirus (CAAdV)

La PCR di screening per il CAAdV ha dato esito positivo nei campioni di due cani, id. 32 e 50 (2/51; 3,92%). Tutti gli organi testati di entrambi i cani sono risultati positivi al test molecolare. La prova di PCR utilizzata consente la discriminazione tra CAAdV-1 e CAAdV-2 e, pertanto, tutti i campioni positivi rilevati sono stati tipizzati come adenovirus del cane di tipo 1 (CAAdV-1).

In entrambi i casi, si trattava di cuccioli di circa due mesi di età, meticci, randagi o appena accolti nel canile sanitario, che mostravano principalmente segni gastroenterici da moderati a gravi, oltre a polmonite e versamenti siero-emorragici cavitari in un caso (id. 50). Uno dei due cuccioli (id. 32) mostrava una co-infezione con CPV-2c, mentre il secondo (Id. 50) non mostrava co-infezioni con altri virus ricercati in questo studio.

Recenti studi condotti nel territorio nazionale (*Balboni et al., 2014; Cardillo et al., 2020; Mira et al., 2022*), tra cui uno condotto sul territorio della regione Sicilia, hanno mostrato bassi tassi di positività (2-8%) simili a quello di questo studio (3,9%), evidenziando quindi una bassa prevalenza di CAAdV-1 nella popolazione canina nazionale. La maggior parte dei cani risultati positivi negli studi precedenti hanno mostrato co-infezioni con CAAdV-2, CPV-2 o CCoV, con rari singoli casi di infezioni unicamente determinate da CAAdV-1, similmente a quanto qui osservato.

Per quanto sia rilevato sporadicamente, talvolta come unico agente virale, è possibile ritenere che il CAAdV-1 continui a circolare sul territorio nazionale e ad essere causa o concausa di malattia anche severa nel cane. In questo studio, come in altri precedenti, non è stato possibile determinare l'origine dell'infezione. La presenza della malattia in cani randagi verosimilmente privi di un'immunità protettiva sembra indicare che il virus circoli nella popolazione canina e solo occasionalmente venga rilevato. Per tali motivi, si suggerisce di considerare questo target virale nel panel diagnostico di cani con enterite/malattia epatica, soprattutto se randagi/introdotti in canili o di altre categorie a rischio (ad esempio, soggetti sprovvisti di copertura vaccinale, di importazione, con edema corneale).

Sarebbero da suggerire, inoltre, opportune misure di biosicurezza, da mettere in atto in particolare presso le strutture sanitarie di ricovero e cura, per evitarne la diffusione e trasmissione. La prova di PCR utilizzata consente di ottenere risultati sia da campioni in-vivo (feci, tamponi fecali o rettali, urine) che *post-mortem*. Nello studio sono stati registrati risultati positivi da tutti i tessuti d'organo in esame, verosimilmente per il tropismo del virus nei confronti delle cellule endoteliali vascolari e degli epatociti, sede naturale di replicazione virale (*Decaro et al., 2008*). Questi stessi meccanismi patogenetici potrebbero essere alla base dei versamenti siero-emorragici cavitari osservati nel cane id.50, come delle ecchimosi e petecchie alle sierose, lesioni comunemente descritte nei casi di epatite di Rubarth (*Decaro et al., 2008; Mira et al., 2022*). L'analisi di sequenza del prodotto di PCR utilizzato per lo screening ha confermato la specificità dell'amplificato (frammento del gene E3 e regioni fiancheggianti), mostrando una identità nucleotidica tra i due ceppi in esame del 99,60%. Le stesse sequenze hanno mostrato un'identità del 100-99,40% con ceppi di CAAdV-1 isolati da cani in Giappone nel 1954 (LC557010) (*Ochi et al., 1956*), in Gran Bretagna nel 1996

(NC\_001734) (*Morrison et al., 1997*), in Australia nel 2013 (KT853096, KT853097) (*Wong et al., 2017*), in India nel 2020 (PV743826) (*Syamily et al., 2023*) e da un lupo grigio eurasiatico in Francia nel 2015 (accession number MH048659) (*Dowgier et al., 2018*).

Per uno studio più approfondito dei ceppi virali in esame si è proceduto con il sequenziamento e l'analisi dei geni che codificano per due proteine maggiori (Hexon e Fiber) che compongono il capsido di superficie e determinano la virulenza ed il tropismo del CADV-1. Infatti, alcune differenze aminoacidiche delle sequenze dei geni Hexon e Fiber hanno mostrato variabilità tra i ceppi identificati in differenti specie animali ed aree geografiche (*Balboni et al., 2017; Balboni et al., 2025*). Le sequenze dei geni Hexon e Fiber hanno mostrato, rispettivamente, percentuali di identità nucleotidica variabili tra il 99,96-99,85% ed il 99,88-99,69% con sequenze di riferimento di CADV-1 da cani e da altri carnivori selvatici (volpi, lupi) di diversa origine geografica e temporale, compresi ceppi già individuati in Sicilia (*Mira et al., 2022*) (Tabella 1).

**Tabella 1.** Valori di identità nucleotidica con le sequenze dei geni Fiber ed Hexon dei ceppi di riferimento disponibili in GenBank.

Cane	Gene	Ceppi di campo (% identità – Paese, specie, anno – acc.nr)
<b>id. 32</b>	Fiber	99,75% - Italia (Sicilia), cane, 2017 – MW650928 Italia, cane, 2013 – KP840548 Canada, lupo grigio, 2011 – OK546124 99,69% - Francia, lupo grigio, 2015 – MH048659 Italia, lupo grigio, 2015 - KX545420 Giappone, cane, 1954 - LC557010 Italia (Sicilia), cane, 2017 - MW650923 Gran Bretagna, cane, 1996 - NC_001734 Italia, volpe, 2011 - KP840544 Italia (Sicilia), cane, 2019 – MW650927 Cina, volpe, 2021 - ON164651
	Hexon	99,96% - Italia, lupo, 2015 - KX545420 Giappone, cane, 1954 - LC557010 Italia (Sicilia), cane, 2017 - MW650911 Italia, cane, 2013 - KP840549 99,93% - Italia (Sicilia), cane, 2019 - MW650915 Italia (Sicilia), cane, 2020 - MW650916 Italia, cane, 2013 - KP840547 Gran Bretagna, cane, 1996 - NC_001734
<b>id. 50</b>	Fiber	99,88% - Italia (Sicilia), cane, 2017 - MW650923 99,82% - Italia (Sicilia), cane, 2020 - MW650928 Italia, cane, 2013 - KP840548 Canada, lupo grigio, 2011 - OK546124
	Hexon	99,89% - Giappone, cane, 1954 - LC557010 Italia (Sicilia), cane, 2017 - MW650911 Italia (Sicilia), cane, 2019 - MW650914 99,85% - Italia (Sicilia), cane, 2019 - MW650915 Italia (Sicilia), cane, 2020 - MW650916 Gran Bretagna, cane, 1996 - NC_001734

L'analisi delle sequenze ha evidenziato il profilo amminoacidico e specifiche mutazioni nelle sequenze in esame rispetto ai ceppi di riferimento, sia nella sequenza del gene Hexon che in quella del gene Fiber. In particolare, sono state osservate differenze nei profili amminoacidici del gene Hexon (Tabella 2), nei residui amminoacidici 182Thr/Asn, 388Ser/Asn e 514Val/Ala.

**Tabella 2.** Variazioni nella sequenza aminoacidica delle sequenze Hexon dei ceppi CA<sub>D</sub>V-1 analizzati in questo studio.

Ceppo	Ospite	Paese	Anno	Amminoacido		
				182	388	514
LC557010	Cane	Giappone	1954	Thr	Asn	Val
NC_001734	Cane	Gran Bretagna	1996	-	-	-
KP840547	Cane	Italia	2013	-	Ser	-
KP840549	Cane	Italia	2013	-	Ser	-
KX545420	Lupo grigio	Italia	2015	-	Ser	-
MW650911	Cane	Italia (Sicilia)	2017	-	-	-
MW650914	Cane	Italia (Sicilia)	2019	Asn	-	-
MW650915	Cane	Italia (Sicilia)	2019	-	-	-
MW650916	Cane	Italia (Sicilia)	2020	-	-	-
<b>Cane Id. 32</b>	<b>Cane</b>	<b>Italia (Sicilia)</b>	<b>2024</b>	-	<b>Ser</b>	-
<b>Cane Id. 50</b>	<b>Cane</b>	<b>Italia (Sicilia)</b>	<b>2025</b>	<b>Asn</b>	-	<b>Ala</b>

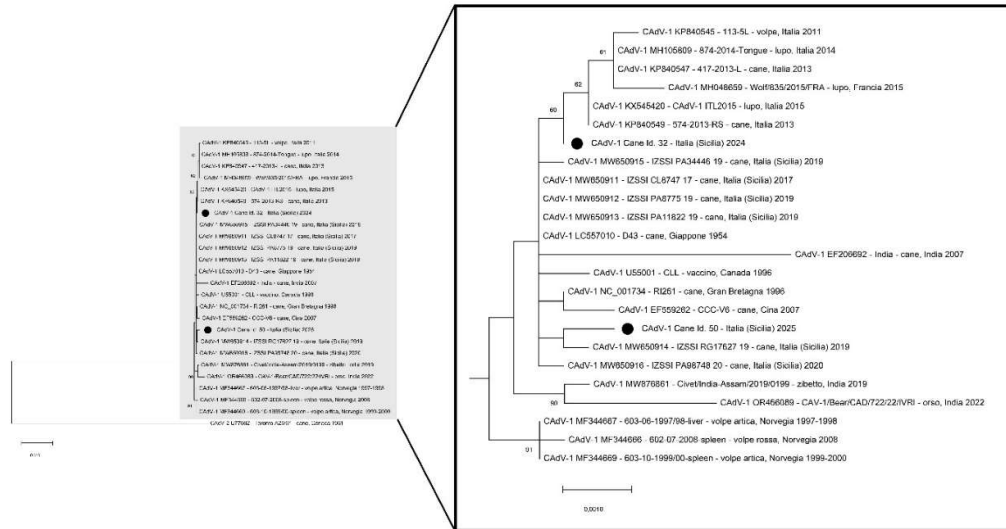
Differenze nei profili amminoacidici del gene Fiber (Tabella 3) sono state osservate nei residui amminoacidici 23Pro/Thr, 110Glu/Asp, 321Thr/Ser, 376Ala/Thr, 388Ile/Val e 487Ala/Val.

**Tabella 3.** Variazioni nella sequenza aminoacidica delle sequenze Fiber dei ceppi CA<sub>D</sub>V-1 analizzati in questo studio.

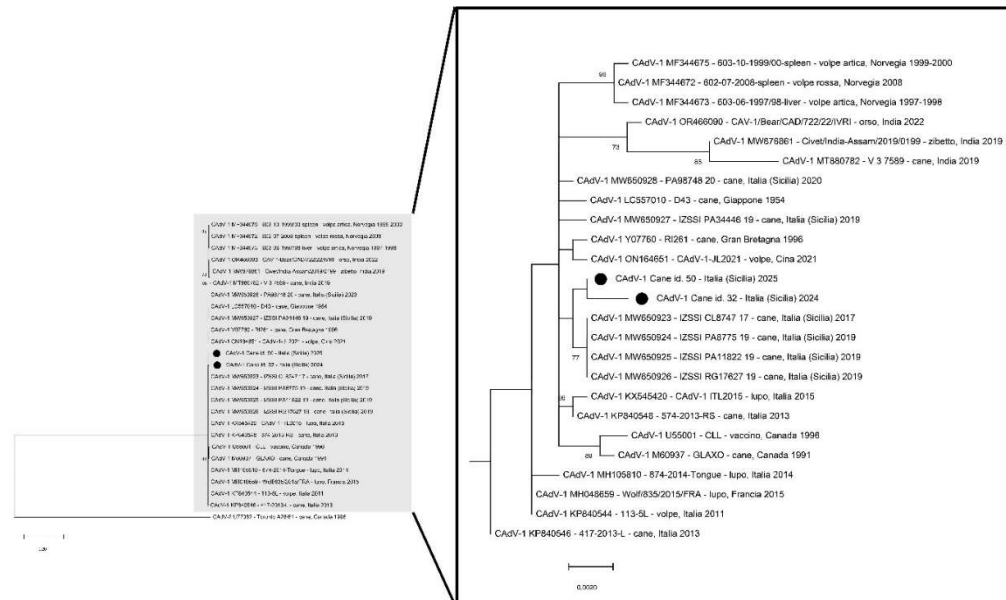
Ceppo	Ospite	Paese	Anno	Amminoacido					
				23	110	321	376	388	487
LC557010	Cane	Giappone	1954	Pro	Glu	Thr	Ala	Ile	Ala
NC_001734	Cane	Gran Bretagna	1996	-	-	-	Thr	-	-
OK546124	Lupo grigio	Canada	2011	-	-	-	-	-	-
KP840544	Cane	Italia	2013	Thr	-	-	-	-	-
KP840548	Cane	Italia	2013	-	Asp	-	-	-	-
MH048659	Lupo grigio	Francia	2015	Thr	-	-	-	-	-
KX545420	Lupo grigio	Italia	2015	-	Asp	-	-	-	-
MW650923	Cane	Italia (Sicilia)	2017	-	-	-	-	-	Val
MW650927	Cane	Italia (Sicilia)	2019	-	-	-	-	Val	-
MW650928	Cane	Italia (Sicilia)	2020	-	-	-	-	-	-
ON164651	Volpe	Cina	2021	-	-	-	Thr	-	-
<b>Cane Id. 32</b>	<b>Cane</b>	<b>Italia (Sicilia)</b>	<b>2024</b>	-	-	<b>Ser</b>	-	-	-
<b>Cane Id. 50</b>	<b>Cane</b>	<b>Italia (Sicilia)</b>	<b>2025</b>	-	-	-	-	-	-

L'analisi filogenetica, effettuata attraverso l'analisi delle sequenze dei geni Hexon (Figura 1A) e Fiber (Figura 1B), è stata condizionata dal ridotto numero di sequenze disponibili e ha mostrato un unico *clade* che raggruppa le sequenze di CA<sub>D</sub>V-1 del cane e dei selvatici, senza una netta distinzione in funzione delle

aree geografiche o dell'epoca temporale di rilievo. È chiara quindi la stretta correlazione dei ceppi virali, privi di una netta distinzione (in funzione dei valori di bootstrap) in funzione dei genotipi considerati.



1A



1B

**Figura 1.** Albero filogenetico costruito con metodo Maximum-likelihood, basato su 25 sequenze del gene Hexon (modello statistico Kimura 2-parameter; Figura 1A) e su 21 sequenze del gene Fiber (modello Hasegawa-Kishino-Yano con siti Invariati; Figura 1B) degli adenovirus del cane di tipo 1 e del CAV-2 come outgroup (valori di bootstrap determinati su 1000 replicati; sono mostrati i valori di bootstrap superiori a 60). I ceppi di CAAdV-1 analizzati in questo studio sono stati contrassegnati dal simbolo (●). Ciascuna sequenza è indicata con: accession number-nome del ceppo virale-specie ospite, paese ed anno di identificazione.

Questi dati mostrano pertanto la circolazione di ceppi virali di CAAdV-1 con un'elevata correlazione, già segnalati in aree geografiche ed in periodi molto distanti tra loro, comuni al cane ed altri carnivori selvatici come il lupo e la volpe, seppure con specifiche mutazioni nelle sequenze delle principali proteine formanti il capsido, in particolare ai residui 182 e 388 del gene Hexon e 23, 110, 388 e 487 del gene Fiber (Mira et al., 2022), che confermano il minimo grado di eterogeneità nel genoma di CAAdV-1. Inoltre, l'elevata correlazione tra i ceppi del cane e dei carnivori selvatici evidenzia quanto lo spettro d'ospite e quindi la condivisione degli stessi spazi abitativi ed ambiente possa incidere sulle dinamiche epidemiologiche di questo virus, un dato utile per la tutela dell'ambiente e della biodiversità di specifici ecosistemi (Balboni et al., 2025).

La profilassi vaccinale, in particolare dove questa è routinariamente praticata, ha consentito di ridurre la casistica dell'epatite infettiva nel cane ma, come evidenziato anche da questo studio, ancora oggi si possono riscontrare casi clinici, anche fatali, associati all'infezione da CAAdV-1, sia in animali domestici (Balboni et al., 2014, 2022; Cardillo et al., 2020) che selvatici (Balboni et al., 2025; Magliocca et al., 2024; Ndiana et al., 2022). Per tali motivi, la vaccinazione contro il CAAdV è considerata una componente "core" nell'immunizzazione dei cani (Ford et al., 2017; Squires et al., 2024), da mantenersi con razionali strategie di richiamo (Dall'Ara, 2024; Mira et al., 2022). Infatti, dopo la vaccinazione con vaccini allestiti con virus vivi attenuati specifici per l'epatite infettiva è stato osservato che l'immunità perdura per un lungo periodo di tempo di 9 anni o più, similmente a quanto osservato dopo l'infezione naturale ed il superamento della malattia (Dall'Ara, 2024).

Questo studio evidenzia (i) la circolazione di CAAdV-1, seppure con bassi tassi di positività, (ii) l'occorrenza di casi di epatite infettiva e di co-infezioni virali con esito infausto, e (iii) definisce le caratteristiche di eterogeneità della sequenza delle proteine maggiori del capsido. Per tale motivo ed a salvaguardia della salute dei cani e dei carnivori selvatici sensibili all'infezione, questo studio sottolinea ancora una volta la necessità di non sottostimare il CAAdV-1 quale causa di infezione a tropismo epatico ed enterico e di attuare strategie integrate di prevenzione e gestione che tengano conto della sua epidemiologia.

### Bibliografia

- Balboni, A.; Dondi, F.; Agnoli, C.; Verin, R.; Gruarin, M.; Morini, M.; Battilani, M. Novel Sequence Variants of Viral Hexon and Fibre Genes in Two Dogs with Canine Adenovirus Type 1-Associated Disease. *Vet J* 2017, 223, 73–75, doi:10.1016/j.tvjl.2017.05.011.
- Balboni, A.; Mollace, C.; Giunti, M.; Dondi, F.; Prosperi, S.; Battilani, M. Investigation of the Presence of Canine Adenovirus (CAAdV) in Owned Dogs in Northern Italy. *Res Vet Sci* 2014, 97, 631–636, doi:10.1016/j.rvsc.2014.10.010.
- Balboni, A.; Magliocca, M.; Urbani, L.; Battilani, M. Canine Adenoviruses in Wildlife: Role in At-Risk Species Conservation and Interface with Domestic Animals. *Pathogens* 2025, 14, 200, doi:10.3390/pathogens14020200.
- Balboni, A.; Terrusi, A.; Urbani, L.; Troia, R.; Stefanelli, S.A.M.; Giunti, M.; Battilani, M. Canine Circovirus and Canine Adenovirus Type 1 and 2 in Dogs with Parvoviral Enteritis. *Vet Res Commun* 2022, 46, 223–232, doi:10.1007/s11259-021-09850-y.
- Cardillo, L.; Piegari, G.; Iovane, V.; Viscardi, M.; Alfano, F.; Cerrone, A.; Pagnini, U.; Montagnaro, S.; Galiero, G.; Pisanelli, G.; et al. Lifestyle as Risk Factor for Infectious Causes of Death in Young Dogs:

- A Retrospective Study in Southern Italy (2015-2017). *Vet Med Int* 2020, 2020, 6207297, doi:10.1155/2020/6207297.
- Dall'Ara, P. Vaccini e vaccinazioni core del cane. In: *Vaccini e Vaccinazioni degli Animali da Compagnia*, seconda edizione; EDRA: Milano, Italy, 2024; pp. 172–175
- Decaro, N.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008, 38, 799–814, viii, doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.006.
- Dowgier, G.; Lahoreau, J.; Lanave, G.; Losurdo, M.; Varello, K.; Lucente, M.S.; Ventriglia, G.; Bozzetta, E.; Martella, V.; Buonavoglia, C.; et al. Sequential Circulation of Canine Adenoviruses 1 and 2 in Captive Wild Carnivores, France. *Vet Microbiol* 2018, 221, 67–73, doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.025.
- Ford, R.B.; Larson, L.J.; McClure, K.D.; Schultz, R.D.; Welborn, L.V. 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *J Am Anim Hosp Assoc* 2017, 53, 243–251, doi:10.5326/JAAHA-MS-6741.
- Magliocca, M.; Taddei, R.; Urbani, L.; Bertasio, C.; Facile, V.; Gallina, L.; Sampieri, M.; Rugna, G.; Rubini, S.; Maioli, G.; et al. Molecular Detection of Viral and Bacterial Pathogens in Red Foxes (*Vulpes Vulpes*) from Italy. *Animals (Basel)* 2024, 14, 1969, doi:10.3390/ani14131969.
- Mira, F.; Puleio, R.; Schirò, G.; Condorelli, L.; Di Bella, S.; Chiaramonte, G.; Purpari, G.; Cannella, V.; Balboni, A.; Randazzo, V.; et al. Study on the Canine Adenovirus Type 1 (CAV-1) Infection in Domestic Dogs in Southern Italy. *Pathogens* 2022, 11, 1254, doi:10.3390/pathogens11111254.
- Morrison, M.D.; Onions, D.E.; Nicolson, L. Complete DNA Sequence of Canine Adenovirus Type 1. *J Gen Virol* 1997, 78 ( Pt 4), 873–878, doi:10.1099/0022-1317-78-4-873.
- Ndiana, L.A.; Lanave, G.; Vasinioti, V.; Desario, C.; Martino, C.; Colaianni, M.L.; Pellegrini, F.; Camarda, A.; Berjaoui, S.; Sgroi, G.; et al. Detection and Genetic Characterization of Canine Adenoviruses, Circoviruses, and Novel Cycloviruses From Wild Carnivores in Italy. *Front Vet Sci* 2022, 9, 851987, doi:10.3389/fvets.2022.851987.
- Ochi, Y.; Konishi, S.; Takizawa, T.; Ikegami, T.; Yamamoto, S.; Ishida, K.; Sato, A. Studies on Infectious Hepatitis in the Dog (I). *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 1956, 3, 55–62, doi:10.1111/j.1439-0442.1956.tb00118.x.
- Squires, R.A.; Crawford, C.; Marcondes, M.; Whitley, N. 2024 Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats - Compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *J Small Anim Pract* 2024, 65, 277–316, doi:10.1111/jsap.13718.
- Syamilly, S.; Rajasekhar, R.; Anoopraj, R.; Ravishankar, C.; Jishnu, H.P. Detection and Molecular Characterisation of Canine Adenovirus Type 1 from a Fatal Case of Infectious Canine Hepatitis from India. *Veterinary Record Case Reports* 2023, 11, e698, doi:10.1002/vrc2.698.
- Wong, M.; Woolford, L.; Hasan, N.H.; Hemmatzadeh, F. A Novel Recombinant Canine Adenovirus Type 1 Detected from Acute Lethal Cases of Infectious Canine Hepatitis. *Viral Immunol* 2017, 30, 258–263, doi:10.1089/vim.2016.0041.

### **Canine coronavirus (CCoV)**

L'RNA del CCoV è stato individuato nei campioni di intestino di 16 (31,37%) dei 51 cani campionati. In 8 di questi animali (8/16, 50%) solo questa, tra le matrici in esame, è risultata positiva al test; nei casi rimanenti (8), non si disponeva degli altri tessuti (fegato, polmone). Questa limitazione non ha consentito quindi di evidenziare/escludere eventuali infezioni sistemiche (CCoV c.d. "pantropico").

Questo tasso di positività risulta superiore a quanto da noi precedentemente rilevato dall'esame di 284 cani, i cui campioni sono stati raccolti tra gennaio 2019 e dicembre 2021, che si attesta al 13,7% (*Mira et al., 2024*). Si avvicina di più a quanto riportato recentemente in altre regioni dell'Italia meridionale, come la Campania (31,1%) (*Zobba et al., 2021*), ed insulare, come la Sardegna (22,2%) (*Cardillo et al., 2020*).

In quattro cani (25%) il CCoV è stato rilevato come unico agente virale (cani id. 12, 14, 19 e 27), diversamente dalla maggior parte dei cani risultati positivi (n=12; 75%) che mostravano co-infezioni con altri virus: 10 cani mostravano co-infezioni (doppie) con il CPV-2, di cui un ceppo risultava essere di origine vaccinale, ed un cane con un ceppo di astrovirus (AstV), mentre un solo cane mostrava una co-infezione (tripla) con astrovirus e CPV-2, sebbene quest'ultimo ceppo risultasse di origine vaccinale. Le co-infezioni con altri virus, in particolare CPV-2, prevalevano rispetto alle infezioni singole, confermando il dato osservato nei campioni precedenti (*Mira et al., 2024*) e quanto osservato in Sardegna (*Cardillo et al., 2020*), in cui la maggior parte delle infezioni erano in associazione tra CCoV e CPV-2.

Similmente agli studi precedenti, i dati di questo studio confermano un tasso di positività maggiore (81,25%) tra i soggetti di età inferiore ai 6 mesi, di cui 12 cani di età compresa tra i 40 giorni ed i 4 mesi, rispetto ai soli 3 adulti (18,75%) risultati positivi. I cani positivi erano n=5 di proprietà e n=11 randagi: questo dato, insieme all'alto tasso di co-infezioni con CPV-2 evidenzia la necessità di approfondire il ruolo dei virus in co-infezione e, eventualmente, delle possibili strategie di controllo indiretto attraverso la vaccinazione nei confronti del CPV-2, come anche nei confronti di altri potenziali *stressors* che possano incidere sulla diffusione e persistenza del CCoV, come già in parte osservato (*Cardillo et al., 2020; Godsall et al., 2010; Stavisky et al., 2012*). Difatti, la gestione di strutture sanitarie per la cura e per la custodia dei cani randagi potrebbe beneficiare di ulteriori specifici studi, finalizzati a valutare i fattori di rischio correlati, utili a definire nuove indicazioni di biosicurezza da integrare ai pochi protocolli attualmente formulati ed applicati, al fine di garantire ulteriormente la salute ed il benessere di questi animali presso questa tipologia di strutture.

### **Screening di CCoV**

I campioni risultati positivi alla RT-PCR per lo screening, che amplifica un frammento target del gene M del CCoV e del coronavirus felino (feline coronavirus, FCoV), sono stati sottoposti successivamente a sequenziamento mediante metodo Sanger, al fine di definire e confermare la specificità del prodotto di amplificazione. Sei amplificati sono stati quindi scartati dalle analisi successive perché hanno prodotto un risultato di bassa qualità, verosimilmente indicativo di una scarsa quantità/qualità di genoma target nel campione.

L'analisi della sequenza del frammento del gene M dei restanti 10 ceppi di CCoV ha evidenziato un elevato grado di identità con il genotipo CCoV-I per 8 di loro (cani id. 14, 25, 26, 27, 36, 37, 39, 49) e con il genotipo CCoV-IIa per 2 di loro (cani id. 40 e 42). Nello specifico, i ceppi mostravano rispettivamente un'identità nucleotidica di 97,56-96,22% con il frammento di 409 paia di basi corrispondente della sequenza di riferimento del genotipo CCoV-I (ceppo 23/03) e di 96,22-93,26% con quello corrispondente delle sequenze di riferimento del genotipo CCoV-II (ceppi CB/05, NA/09, 450/07, BGF10 e INSAVC-1). Maggiori percentuali di identità nucleotidica sono state osservate con ceppi individuati tra i campioni collezionati in Sicilia nel 2019-2021 (marcati con "Italia (Sicilia)" in Tabella 1) e con ceppi individuati recentemente in Turchia, Giappone, Cina, Taiwan e Brasile. I dettagli sono riportati nella seguente Tabella 1.

**Tabella 1.** Valori di identità nucleotidica con le sequenze parziali del gene M di CCoV-I e CCoV-II di ceppi di campo e di ceppi di riferimento.

<b>Id. cane</b>	<b>Genot. CCoV</b>	<b>Ceppi di campo (% identità – Paese, anno – acc.nr)</b>	<b>Ceppi di riferimento (% identità – ceppo di rif. – acc.nr)</b>
14	CCoV-I	98,11% - Turchia, 2018 – MK507579 97,84% - Turchia, 2018 – MK507576 97,57% - Cina, 2018 – MT136073	96,22% - ceppo 23/03 - KP849472
25	CCoV-I	99,18% - Giappone, 2019 – LC753485 98,38% - Italia (Sicilia), 2019 – OQ565679 98,22% - Brasile, 2009 – GU300121	97,30% - ceppo 23/03 - KP849472
26	CCoV-I	98,65% - Italia (Sicilia), 2020 – OQ565687 98,37% - Brasile, 2012 – KP322068 98,10% - Brasile, 2012 – KP322066	97,30% - ceppo 23/03 - KP849472
27	CCoV-I	99,19% - Italia (Sicilia), 2020 – OQ565688 97,69% - Cina, 2019 – OP422887 97,69% - Cina, 2020 – OP422889	97,56% - ceppo 23/03 - KP849472
36	CCoV-I	98,11% - Italia (Sicilia), 2019 – OQ565684 97,93% - Brasile, 2009 – GU300121 97,84% - Cina, 2021 – OQ623731	96,76% - ceppo 23/03 - KP849472
37	CCoV-I	97,84% - Brasile, 2012 – KF309017 97,84% - Italia (Sicilia), 2019 – OQ565684 97,65% - Cina, 2020 – OP422894	97,03% - ceppo 23/03 - KP849472
39	CCoV-I	97,27% - Turchia, 2012-2014 – MN913446 97,04% - Brasile, 2009 – GU300121	96,49% - ceppo 23/03 - KP849472
49	CCoV-I	98,11% - Italia (Sicilia), 2021 – OQ565695 97,62% - Cina, 2014 – KT192644 97,36% - Cina, 2020 – OP422894	96,76% - ceppo 23/03 - KP849472
40	CCoV-II	96,76% - Turchia, 2018 – MN732565 96,76% - Turchia, 2018 – MN732563 96,49% - Italia (Sicilia), 2020 – OQ565708 96,22% - Grecia, 2009 – HQ450377	96,22% - ceppo CB/05* – KP981644 96,22% - ceppo NA/09* – JF682842 96,22% - ceppo 450/07* – GU146061 93,78% - ceppo BGF10 – AY342160 93,26% - ceppo INSAVC – D13096
42	CCoV-II	96,76% - Turchia, 2018 – MN732565 96,76% - Turchia, 2018 – MN732563 96,49% - Italia (Sicilia), 2020 – OQ565708 96,22% - Grecia, 2009 – HQ450377	96,22% - ceppo CB/05* – KP981644 96,22% - ceppo NA/09* – JF682842 96,22% - ceppo 450/07* – GU146061 93,78% - ceppo BGF10 – AY342160 93,26% - ceppo INSAVC-1 – D13096

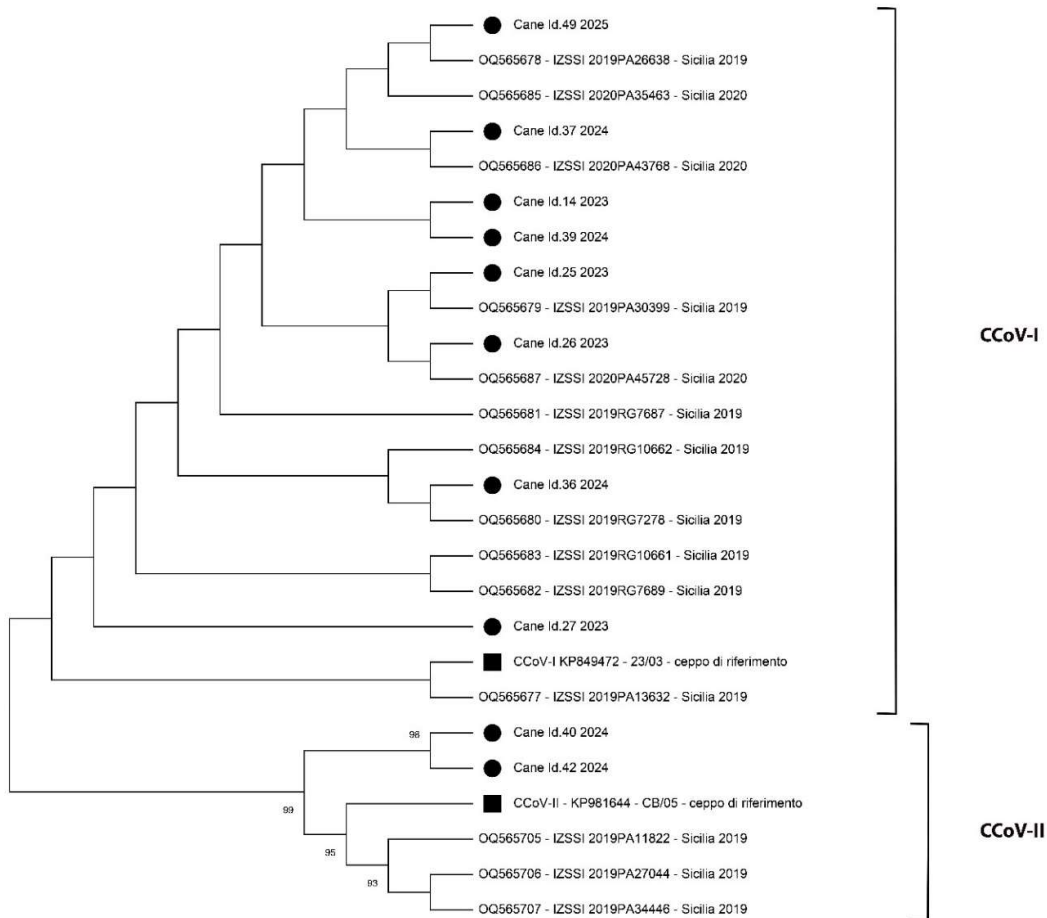
\*ceppi di CCoV c.d. "pantropici".

Inoltre, nella sequenza del gene M del ceppo CCoV-I dal cane id. 25 è stata osservata la mutazione Ile126Val, non evidenziata negli altri ceppi CCoV-I in esame. In entrambe le sequenze del ceppo CCoV-II dai cani id. 40 e 42 sono state osservate tre mutazioni rispetto alle sequenze dei ceppi CCoV-II pantropici di riferimento: Val124Ile, Ile127Val e Lys223Gln. Queste mutazioni sono state dettagliate nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Sostituzioni non sinonime nella sequenza parziale del gene M dei ceppi di CCoV ed in relazione a sequenze di CCoV-I e CCoV-II di riferimento\* ottenute dal database GenBank (NCBI).

Genotipo CCoV-I			Genotipo CCoV-II				
ceppo	acc.nr.	aa 126	ceppo	acc.nr.	aa 124 127 123		
CCoV 23/03*	KP849472	Ile	CB/05*	KP981644	Val	Ile	Lys
			NA/09*	JF682842	Val	Ile	Ile
			450/07*	GU146061	Val	Ile	Ile
Cane id. 14		Ile	Cane id. 40		Ile	Val	Gln
Cane id. 25		Val	Cane id. 42		Ile	Val	Gln
Cane id. 26		Ile					
Cane id. 27		Ile					
Cane id. 36		Ile					
Cane id. 37		Ile					
Cane id. 39		Ile					
Cane id. 49		Ile					

L'analisi filogenetica (Figura 1) basata sul frammento del gene M di CCoV ha confermato la clusterizzazione dei ceppi dei cani id. 14,25,26,27,36,37,39 e 49 nel clade che include i ceppi del genotipo CCoV-I, mentre i ceppi dei cani id. 40 e 42 nel clade che include i ceppi del genotipo CCoV-II.



**Figura 1.** Albero filogenetico basato sul metodo Maximum-likelihood (modello Tamura-Nei + distribuzione Gamma; bootstrap su 1000 replicati: sono mostrati i valori superiori a 60) e su 26 sequenze parziali del gene M (368 nucleotidi) di ceppi di coronavirus del cane (CCoV-I e CCoV-II, come indicate in figura) analizzati in questo studio (indicati con i cerchi neri), di ceppi di campo individuati in Sicilia e di ceppi di riferimento (indicati con i quadrati neri). Ciascuna sequenza di campo e di riferimento è stata indicata con accession number – nome del ceppo – luogo ed anno di origine (se di campo).

### Genotipizzazione di CCoV

La RT-PCR utilizzata per distinguere i genotipi/sub genotipi (CCoV-I, CCoV-IIa e CCoV-IIb) ha dato esito positivo per 7 dei 16 campioni analizzati, confermando il risultato negativo ottenuto con la RT-PCR di screening, dovuto verosimilmente alla bassa quantità di genoma di CCoV, a cui si aggiunge quello per i campioni dei cani id.36, 40 e 42, probabilmente legato anche a divergenze del genoma target nel sito di legame dei primers utilizzati. Il differente target e la maggiore variabilità nella sequenza del gene S rispetto a quella del gene M potrebbe infatti spiegare la discordanza tra i due risultati, suggerendo che la RT-PCR di screening possa avere una maggiore sensibilità, probabilmente per la minore divergenza della sequenza del gene M rispetto a quella del gene S, sottoposto a una costante selezione positiva.

I risultati hanno confermato il risultato ottenuto dal sequenziamento del frammento del gene M, ovvero che i ceppi appartenevano al genotipo CCoV-I, eccetto che per il campione del cane id. 49 che ha dato esito positivo per il genotipo CCoV-IIa. Per verificare il dato, i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a sequenziamento di tipo Sanger, mostrando un'elevata identità nucleotidica con ceppi CCoV-I di campo del Giappone, Cina, Taiwan, Egitto e Brasile (99,01-97,23%) e con i ceppi CCoV-I di riferimento Elmo/02 (97,69-95,66%) e 23/03 (96,53-93,93%) (Decaro *et al.*, 2015a), diversamente dal ceppo CCoV-IIa del cane id.49 che mostrava elevata omologia con ceppi CCoV-IIa di campo del Brasile (Costa *et al.*, 2014), con un ceppo CCoV-II ricombinante isolato negli U.S.A. (Regan *et al.*, 2012), con un ceppo FCoV della Cina del 2018, e con il ceppo CCoV-IIa di referenza CB/05 (Decaro *et al.*, 2015b). I risultati qui descritti sono condizionati dalle sequenze disponibili nei database di pubblico dominio per il gene S, di numero e da aree geografiche più ridotte rispetto alle sequenze comparabili per il gene M, ma in ogni caso suggeriscono una elevata identità tra i ceppi circolanti nei diversi Paesi descritti e l'identità sia verso CCoV che FCoV per il ceppo del cane id. 49. I dettagli sono riportati nella seguente Tabella 3.

**Tabella 3.** Valori di identità nucleotidica con le sequenze parziali del gene S di CCoV-I e CCoV-II di ceppi di campo e di ceppi di riferimento.

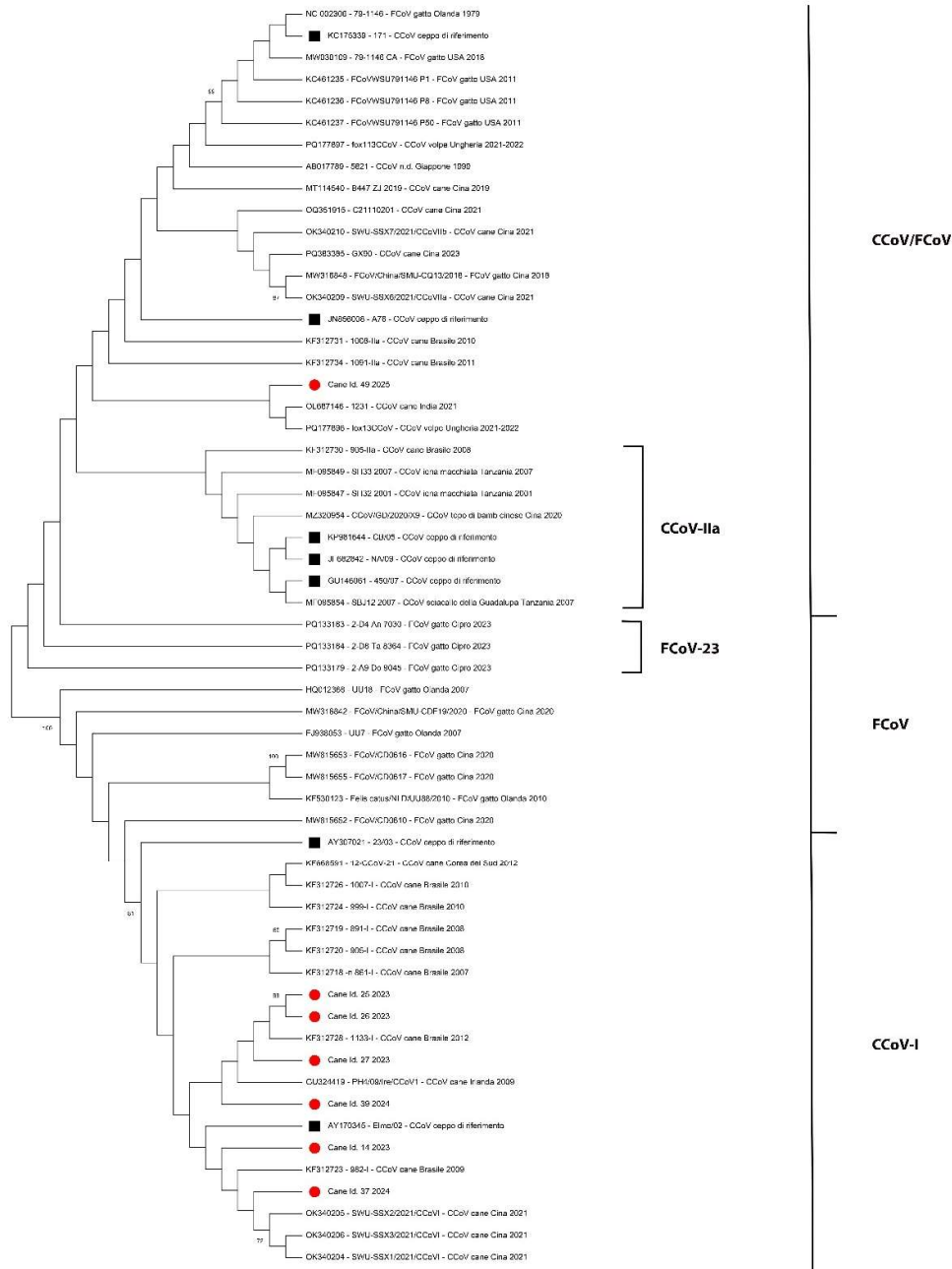
<b>Id. cane</b>	<b>Genot. CCoV</b>	<b>Ceppi di campo (% identità – Paese, anno – acc.nr)</b>	<b>Ceppi di riferimento (% identità – ceppo di rif. – acc.nr)</b>
14	CCoV-I	98,28% - Giappone, 2019 – LC753475 98,04% - Cina, 2019 – OP422906	97,69% - ceppo Elmo/02 – AY307020 95,09% - ceppo 23/03 - KP849472
25	CCoV-I	97,40% - Brasile, 2012 – KF312728 97,23% - Egitto, 2022 – OQ974949	95,95% - ceppo Elmo/02 – AY307020 93,93% - ceppo 23/03 - KP849472
26	CCoV-I	97,40% - Brasile, 2012 – KF312728 97,23% - Egitto, 2022 – OQ974949	95,95% - ceppo Elmo/02 – AY307020 93,93% - ceppo 23/03 - KP849472
27	CCoV-I	98,03% - Taiwan, 2015 – MK986768 97,40% - Brasile, 2012 – KF312728	97,11% - ceppo Elmo/02 – AY307020 94,51% - ceppo 23/03 - KP849472
37	CCoV-I	99,01% - Taiwan, 2016 – MK986770 98,59% - Cina, 2020 – OP422907	96,53% - ceppo 23/03 - KP849472 95,66% - ceppo Elmo/02 – AY307020
39	CCoV-I	97,69% - Italy, 2002 – AY307020 97,40% - Brasile, 2012 – KF312728	97,69% - ceppo Elmo/02 – AY307020 95,09% - ceppo 23/03 - KP849472
49	CCoV-IIa	93,55% - Brasile, 2011 – KF312734 93,40% - USA, 1976 – JN856008 92,82% FCoV – Cina, 2018 - MQ316848	91,64% - ceppo CB/05 – DQ112226

Inoltre, in questo frammento della sequenza del gene S dei ceppi CCoV-I dai cani id. 14, 25, 26 e 37 sono state osservate le mutazioni Thr1267Met e Asp1276His, non evidenziata negli altri ceppi CCoV-I in esame e nei ceppi di riferimento Elmo/02 e 23/03. Nello stesso frammento del ceppo del cane id. 49 sono state osservate sei mutazioni rispetto al ceppo CCoV-IIa di riferimento CB/05. Queste mutazioni sono state dettagliate nella Tabella 4.

**Tabella 4.** Sostituzioni non sinonime nella sequenza parziale del gene S dei ceppi di CCoV ed in relazione a sequenze di CCoV-I (Elmo/02 e 23/03) e di CCoV-IIa (CB/05) di riferimento\*.

<b>Genotipo CCoV-I</b>				<b>Genotipo CCoV-IIa</b>							
<b>ceppo</b>	<b>acc.nr.</b>	<b>aa</b>		<b>ceppo</b>	<b>acc.nr.</b>	<b>aa</b>					
		<b>1267</b>	<b>1276</b>			<b>1226</b>	<b>1247</b>	<b>1302</b>	<b>1304</b>	<b>1334</b>	<b>1370</b>
Elmo/02*	AY307020	Thr	Asp	CB/05*	DQ112226	Val	Asp	Val	Glu	Glu	Val
23/03*	KP849472	Thr	Asp								
Cane id. 14		<b>Met</b>	Asp	Cane id. 49		<b>Leu</b>	<b>Asn</b>	<b>Thr</b>	<b>Asp</b>	<b>Asp</b>	<b>Ile</b>
Cane id. 25		Thr	<b>His</b>								
Cane id. 26		Thr	<b>His</b>								
Cane id. 27		Thr	Asp								
Cane id. 37		<b>Met</b>	Asp								
Cane id. 39		Thr	Asp								

L'analisi filogenetica ha mostrato la segregazione dei ceppi del genotipo CCoV-I sequenziati in questo studio (cani id.14, 25, 26, 27, 37 e 39) con altri dello stesso genotipo ed in prossimità del ceppo di riferimento Elmo/02, mentre il ceppo del sub-genotipo CCoV-IIa (cane id. 49) ha segregato con un gruppo di ceppi che comprende sia CCoV che FCoV, in un ramo con un ceppo identificato in un cane in India ed un altro in una volpe in Ungheria, prossimo ai rami che raggruppano i ceppi di riferimento CCoV-IIa CB/05, NA/09 e 450/07 (Figura 2).



**Figura 2.** Albero filogenetico basato sul metodo Maximum-likelihood (modello Tamura 3-parameter; bootstrap su 1000 replicati: sono mostrati i valori superiori a 60) e su 58 sequenze parziali del gene S (296 nucleotidi) di ceppi di coronavirus del cane (CCoV) e del gatto (FCoV), come indicati in figura, analizzati in questo studio (indicati con i cerchi neri), di ceppi di campo e di riferimento (indicati con i quadrati neri) ottenuti da GenBank. Ciascuna sequenza di campo e di riferimento è stata indicata con accession number – nome del ceppo – specie animale, luogo ed anno di origine (se di campo).

### Analisi di sequenza del gene S di CCoV

I campioni risultati positivi alla RT-PCR di screening ed a quella di genotipizzazione sono stati infine sottoposti alle specifiche RT-PCR per il sequenziamento del frammento della sequenza del gene Spike

(corrispondente alla porzione 5' della regione N-terminale della subunità S1, la regione responsabile dell'unione del virus al recettore dell'ospite).

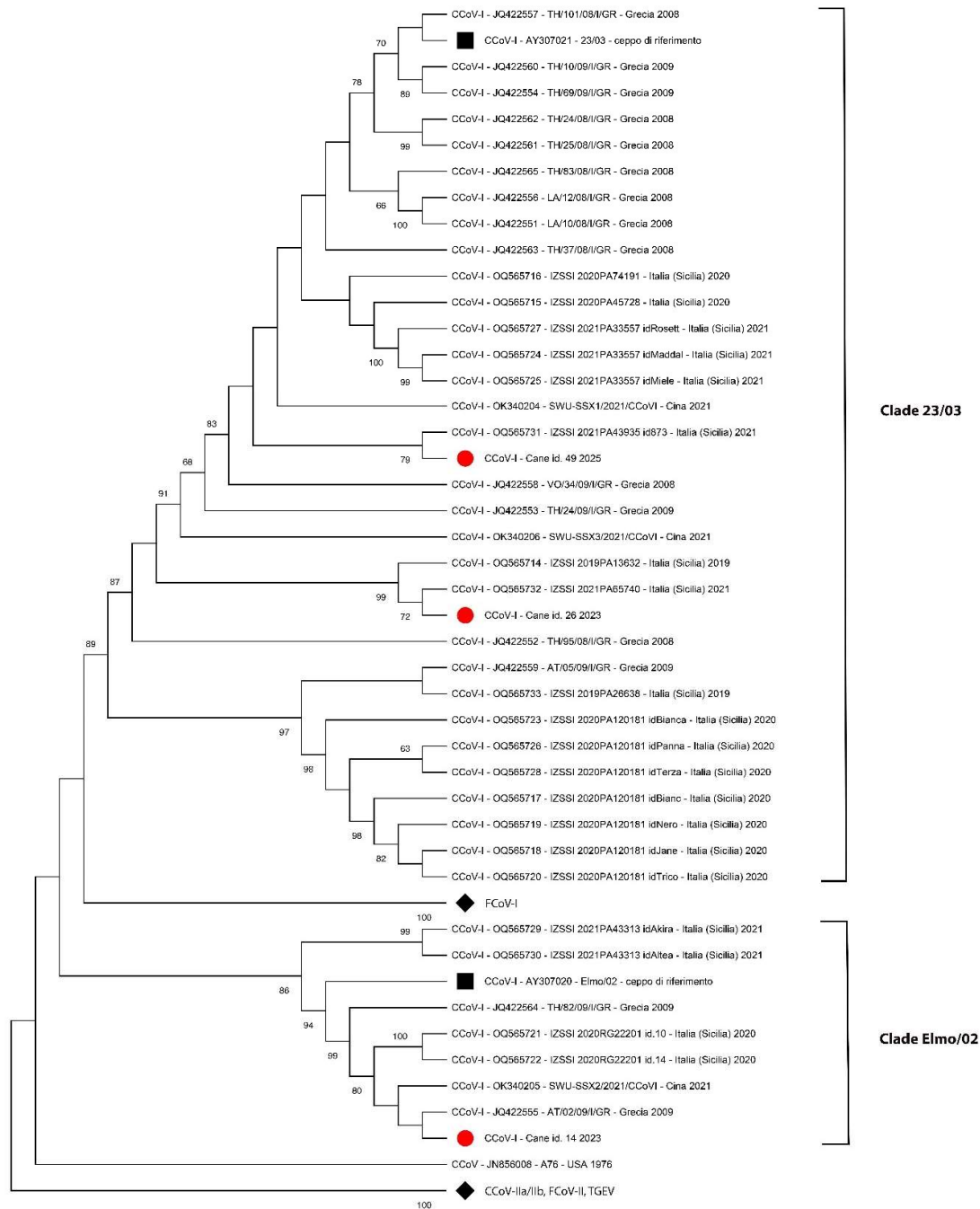
I campioni dei cani id. 14, 25, 26, 27, 37 e 49 hanno dato esito positivo alla RT-PCR di sequenziamento per il genotipo CCoV-I e lo stesso campione del cane id. 49 ha dato esito positivo anche alla RT-PCR di sequenziamento per il genotipo CCoV-II. I prodotti di amplificazione dei campioni dei cani id. 25, 27 e 37 hanno prodotto sequenze di bassa qualità, probabilmente in relazione alla qualità/quantità di RNA di CCoV del campione in esame, per cui sono stati scartati dalle analisi successive.

L'analisi di sequenza dei ceppi di CCoV-I dei cani id. 14, 26 e 49 ha mostrato le più elevate identità nucleotidiche con le sequenze di ceppi già identificati da cani in Italia nel 2020-2021, in Cina nel 2021 ed in Grecia nel 2008-2009; valori leggermente inferiori sono stati registrati dal confronto con la sequenza del ceppo di riferimento 23/03 (Tabella 5).

**Tabella 5.** Valori di identità nucleotidica tra le sequenze parziali del gene S di CCoV-I analizzate in questo studio e quelle di ceppi di campo e di riferimento.

<b>Ceppi di campo</b>	<b>Ceppo di riferimento</b>
<b>CCoV-I - Cane id. 14</b>	
92,80% - JQ422555 - cane, Grecia, 2009	79,29% - KP849472 - ceppo 23/03
91,61% - OK340205 - cane, Cina, 2021	
91,03% - OQ565721 - cane, Italia (Sicilia), 2020	
<b>CCoV-I - Cane id. 26</b>	
93,66% - OQ565732 - cane, Italia (Sicilia), 2021	83,07% - KP849472 - ceppo 23/03
87,25% - JQ422522 - cane, Grecia, 2008	
84,21% - OK340206 - cane, Cina, 2021	
<b>CCoV-I - Cane id. 49</b>	
90,51% - OQ565731 - cane, Italia (Sicilia), 2021	87,13% - KP849472 - ceppo 23/03
89,82% - JQ422558 - cane, Grecia, 2009	
89,09% - OK340204 - cane, Cina, 2021	

L'analisi filogenetica (Figura 3) basata sul frammento della sequenza del gene Spike (corrispondente alla porzione 5' della regione N-terminale della subunità S1) ha evidenziato una clusterizzazione delle sequenze secondo il genotipo virale (CCoV-I, CCoV-IIa, CCoV-IIb, FCoV, TGEV). Le sequenze dei ceppi in esame (cani id. 14, 26, 49) risultano fraposte tra quelle dei CCoV-I di campo, di cui una (cane id. 14) nel clade formato dalle sequenze vicine al ceppo di riferimento Elmo/02, mentre le altre (cani id. 26 e 49) nel clade delle sequenze correlate al ceppo di riferimento 23/03. Questo dato conferma la presenza del genotipo CCoV-I nella maggior parte dei campioni per cui è stato possibile effettuare studi di sequenziamento, con una elevata omologia ed una stretta clusterizzazione con i due ceppi di riferimento (23/03 ed Elmo/02).



**Figura 3.** Albero filogenetico basato sul metodo Maximum-likelihood (modello General Time Reversible + distribuzione Gamma; bootstrap su 1000 replicati: sono mostrati i valori superiori a 60) e su 64 sequenze parziali del gene S (1074 nucleotidi) di ceppi di coronavirus del cane (CCoV) e del gatto (FCoV), come indicati in figura, analizzati in questo studio (indicati con i cerchi rossi), di ceppi di campo e di riferimento (i ceppi di riferimento CCoV-1 23/03 ed Elmo/02 sono indicati con i quadrati neri) ottenuti da GenBank. I rami corrispondenti alle sequenze dei ceppi CCoV-IIa (CCoV/NTU336/F/2008, GQ477367; 1-71, JQ404409; K378, KC175340; S378, KC175341; INSAVC, D13096; BGF10, AY342160; CB/05, DQ112226; TN-449, JQ404410), CCoV-IIb (UCD-1, AF116248; 430/07, EU924790; 174/06, EU856362; 341/05, EU856361; 119/08, EU924791), FCoV-I (Black, EU186072; UCD1, AB088222), FCoV-II (79-1146, NC007025; WSU 79-1683, JN634064), coronavirus enterico felino (79-1683, X80799) e virus della gastroenterite trasmissibile del suino (TGEV) (Purdue, DQ811789; TS, DQ201447) sono stati raggruppati

(“collassati”) (indicati con i rombi neri). Le sequenze CCoV-I di campo e di riferimento sono state indicate con l’accession number, il nome del ceppo virale, la nazione e l’anno di origine.

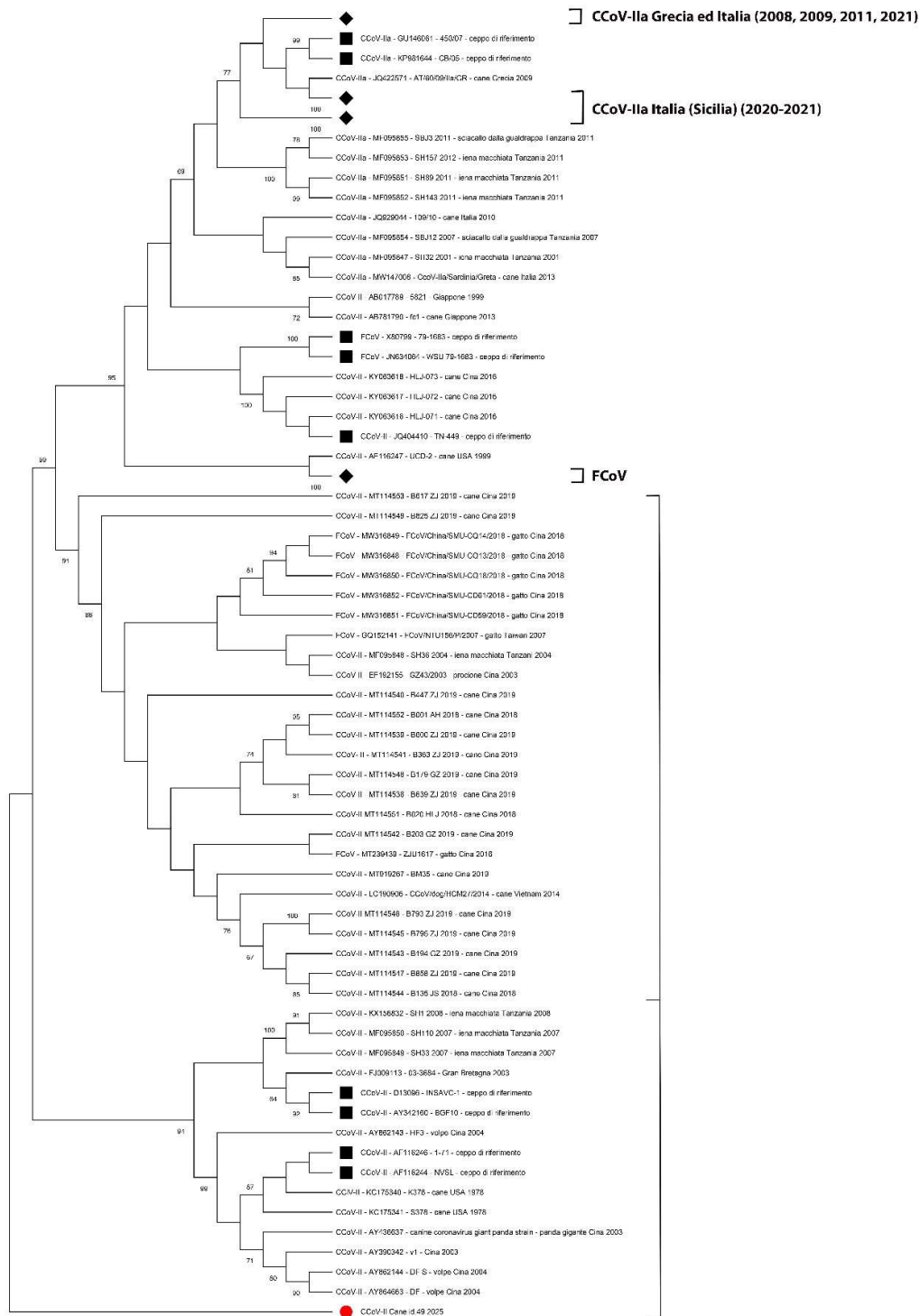
L’analisi di sequenza del ceppo di CCoV-II del cane id. 49 ha mostrato le più elevate identità nucleotidiche (90,37-83,80%) con sequenze di ceppi di CCoV identificati da cani (di cui due in Italia da cani importati nel 2017 dall’Ungheria (Alfano et al., 2020), da volpi e con i ceppi di riferimento INSAVC-1, 1-71, NVSL e BGF10, di cui alcuni considerati come potenziali ceppi ricombinanti (Tabella 6).

**Tabella 6.** Valori di identità nucleotidica tra le sequenze parziali del gene S di CCoV-II analizzate in questo studio e quelle di ceppi di campo e di riferimento.

Ceppi di campo	Ceppo di riferimento
<b>CCoV-II - Cane Id. 49</b>	
90,37% - MN086813 - cane, Italia, 2017	84,36% - D13096 - ceppo INSAVC-1
89,87% - MN086812 - cane, Italia, 2017	83,83% - AF116246 - ceppo 1-71
87,43% - PQ177897 - volpe, Ungheria, 2021-2022	83,83% - AF116244 – ceppo NVSL
84,18% - AY862143 - volpe, Cina, 2004	83,80% - AY342160 - ceppo BGF10
84,08% - OX335623 - cane, UK, 2022	
84,01% - AY390342 - cane, Cina, 2003	
83,83% - KC175341 - cane, USA, 1978	
83,83% - KC175340 - cane, USA, 1978	

L’analisi filogenetica (Figura 4) basata sul frammento della sequenza del gene Spike ha evidenziato la clusterizzazione separata dei ceppi in relazione al genotipo (FCoV/CCoV) e, in maggiore dettaglio, la separazione tra i clade formati da (i) sequenze vicine al ceppo CCoV-IIa di riferimento CB/05, (ii) quelle di CCoV-II/FCoV da cani e gatti in Asia, animali selvatici (iena macchiata e procione) in Cina e Tanzania, e (iii) quelle di CCoV da cani ed animali selvatici (iena macchiata, volpe, panda gigante) vicine ai ceppi di riferimento 1-71, INSAVC-1, BGF 10 e NVSL: la sequenza del ceppo CCoV-II del cane id. 49 si colloca in un ramo separato ma prossimo a quest’ultimo clade.

Questo dato conferma la probabile co-infezione di due ceppi di CCoV nel cane id. 49, di cui uno appartenente al genotipo CCoV-I ed un altro al genotipo CCoV-II, apparentemente divergente dai CCoV-IIa/b più comunemente segnalati nel cane. Ulteriori studi sarebbero necessari per confermare questo dato e definire in maggiore dettaglio le caratteristiche di questo ceppo virale.



**Figura 4.** Albero filogenetico basato sul metodo Maximum-likelihood (modello Tamura 3-parameter + distribuzione Gamma + siti invariati; bootstrap su 1000 replicati: sono mostrati i valori superiori a 60) e su 101 sequenze parziali del gene S (560 nucleotidi) di ceppi di coronavirus del cane (CCov-II) e del gatto (FCoV), come indicati in figura, analizzati in questo studio (indicato con il cerchio rosso), di ceppi di campo e di riferimento (i ceppi di riferimento sono indicati con i quadrati neri) ottenuti da GenBank. I rami corrispondenti alle sequenze dei ceppi CCov-IIa ed una parte dei ceppi FCoV sono stati raggruppati

(“collassati”) (indicati con i rombi neri). Le sequenze CCoV-I di campo e di riferimento sono state indicate con l’accession number - il nome del ceppo virale - la specie animale, la nazione e l’anno di origine (se disponibili).

I risultati ottenuti dalle prove di RT-PCR utilizzate e relativi ai genotipi di coronavirus rilevati, unitamente alle co-infezioni virali, sono quindi riassunti nella seguente Tabella 7.

**Tabella 7.** Dati di genotipizzazione dei CCoV analizzati in questo studio.

Cane id.	Genotipo/Sub-genotipo CCoV			Altri virus enterici
	Gene M (RT-PCR screen.)	Gene S (RT-PCR genot.)	Gene S (RT-PCR seq.)	
14	I	I	I	No
25	I	I	POS ma no seq. <sup>b</sup>	CPV-2c
26	I	I	I	CPV-2c
27	I	I (ma no seq) <sup>a</sup>	POS ma no seq. <sup>b</sup>	No
36	I	NEG	NEG	CPV-2 vacc. AstV
37	I	I	POS ma no seq. <sup>b</sup>	CPV-2c
39	I	I (ma no seq) <sup>a</sup>	NEG	CPV-2c
40	II	NEG	POS ma no seq. <sup>b</sup>	CPV-2c
42	II	NEG	POS ma no seq. <sup>b</sup>	CPV-2c
49	I	IIa	I/IIa	CPV-2 vacc.

Note: <sup>a</sup>per questi campioni è stato possibile determinare il genotipo di appartenenza ma non è stato possibile effettuare l’analisi della sequenza relativa; <sup>b</sup>per questi campioni è stato ottenuto un risultato positivo alla prova di PCR ma non è stato possibile effettuare l’analisi di sequenza del prodotto di amplificazione.

Probabilmente i risultati ottenuti sono stati condizionati dalla quantità o dalla qualità dell’RNA di CCoV disponibile oppure dalla variabilità intrinseca del virus, condizionando l’affinità dei primers per il target in esame. Da un punto di vista metodologico, questo dato sottolinea come lo studio del CCoV sia complesso e che richiede un approccio basato sull’utilizzo di più metodiche di biologia molecolare (a tal fine le tecniche di sequenziamento di ultima generazione – NGS – possono apportare un valido contributo, come già evidenziato per i coronavirus umani nella recente pandemia COVID-19) o verso differenti target del genoma. Nella maggior parte dei casi si sono rilevate co-infezioni principalmente con CPV-2c ed in un caso una probabile co-infezione tra CCoV-I e CCoV-II. Le infezioni multiple da differenti genotipi di CCoV o quelle miste ad altri virus enterici, come in questo caso CPV-2 ed AstV, sono state correlate ad una potenziale sinergia in grado di determinare una maggiore gravità dei segni clinici (*Costa et al., 2014; Decaro et al., 2006; Pratelli et al., 1999*); è stata anche dimostrata la capacità di ceppi ipervirulenti di CCoV di determinare malattia sistemica con linfopenia acuta (*Decaro et al., 2008*) o consecutiva deplezione delle cellule T CD4+ prolungata nel tempo, che potrebbero potenzialmente determinare una maggiore esposizione ad altre infezioni opportunistiche (*Marinaro et al., 2010*).

Questo studio non ha rilevato ceppi appartenenti al sub-genotipo CCoV-IIb, descritto per la prima volta nel 2009 da Decaro et al. e successivamente in altri Paesi europei (Decaro et al., 2010), in particolare in Ungheria, ma altrettanto non rilevato in un più recente studio di Zobba et al. (2021), limitato però al territorio della regione Sardegna. Questo sub-genotipo (CCoV-IIb) è stato descritto come un ceppo che può avere avuto origine dalla ricombinazione tra i ceppi di CCoV-II del cane e il virus della gastroenterite trasmissibile del suino (porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV) (Decaro et al., 2009), documentando ancora una volta come i ceppi nuovi ceppi di CCoV possano avere origine da ricombinazioni con ceppi di *Alphacoronavirus* noti in specie animali diverse, oltre che da mutazioni del genoma. Questi eventi hanno verosimilmente dato origine a nuovi ceppi di CCoV, alcuni dei quali dotati di un potenziale patogenetico più pronunciato (Pratelli et al., 2022). Gli studi sui coronavirus del cane negli ultimi 20 anni hanno infatti consentito di definire le caratteristiche genetiche e patobiologiche dei ceppi di CCoV circolanti e le sue correlazioni con altri Alphacoronavirus (coronavirus del gatto e del suino): definendo quelle di Elmo/02, evidenziando le correlazioni con il genoma del coronavirus felino (FCoV) e designandolo come prototipo del genotipo CCoV-I; descrivendo nel 2005 le caratteristiche di una nuova variante altamente virulenta che, a differenza del classico coronavirus enterico del cane, è in grado di causare una malattia sistemica, talvolta con esito fatale, e designata come ceppo CCoV-II “pantropico” (il cui prototipo è il ceppo CB/05) (Buonavoglia et al., 2006); descrivendo nel 2009 le caratteristiche della nuova variante sub-genetica CCoV-IIb, caratterizzata da particolare virulenza e verosimilmente originata dalla ricombinazione tra ceppi di CCoV-II e TGEV (Decaro et al., 2009).

Questo studio ha evidenziato un rilievo di CCoV-I maggiore di CCoV-IIa, parimenti a quanto osservato nei ceppi collezionati negli anni precedenti (Mira et al., 2024), ed un certo grado di divergenza con i ceppi di riferimento ed un grado di omologia più elevato con ceppi circolanti in Paesi di continenti diversi tra loro. In un caso è stato possibile identificare una infezione mista tra due genotipi di CCoV, di cui il ceppo del genotipo CCoV-II mostrava un certo grado di divergenza dai più comuni CCoV-IIa ed una correlazione con ceppi per cui sono stati ipotizzati eventi di ricombinazione tra genotipi differenti e identificati anche in animali selvatici.

La recente evidenza di virus correlati al CCoV, evidenziati da bambini con polmonite in Malesia (ceppo HuPn-2018) o da adulti con febbre di ritorno da un viaggio ad Haiti (ceppo HuCCoV\_Z19Haiti), ha fatto ipotizzare la potenziale origine di questo virus dal cane (Buonavoglia et al., 2023). Più recentemente, nel 2023 è stato identificato un ceppo di coronavirus felino di tipo 2 (ceppo FCoV-23) che ha causato un grande focolaio di peritonite infettiva del gatto (FIP) nell’isola di Cipro ed alcuni casi in Gran Bretagna, in gatti importati da Cipro (Attipa et al., 2025). L’analisi della sequenza di questo ceppo virale ha consentito di osservare un frammento del gene S di un ceppo di CCoV “pantropico” già circolante in Grecia nel 2009 (ceppo NA/09) (Ntafis et al., 2012), correlato al ceppo CCoV-IIa “pantropico” CB/05 (Decaro et al. 2009). I ceppi CCoV-II analizzati in questo studio hanno mostrato gradi di identità nucleotidica con il ceppo FCoV-23 ed i ceppi CCoV-IIa di riferimento CB/05 e NA/09 più bassi (gene M: 81,46-80,49% con FCoV e 96,59%

con CB/05 e NA/09 - gene S: 90,32-89,59% con FCoV e 91,64-91,20% con CB/05 e NA/09) rispetto a quelli mostrati con i ceppi di campo descritti, mostrando quindi una maggiore correlazione con questi ultimi. In conclusione, il monitoraggio e l'analisi dei ceppi circolanti di CCoV può offrire uno strumento utile per valutare ulteriormente l'evoluzione di questo virus, al fine di mitigare eventuali rischi posti da varianti caratterizzate da maggiore virulenza, in grado di ricombinarsi con altre specie di coronavirus o saltare ad altre specie animali.

### Bibliografia

- Alfano, F.; Fusco, G.; Mari, V.; Occhiogrosso, L.; Miletti, G.; Brunetti, R.; Galiero, G.; Desario, C.; Cirilli, M.; Decaro, N. Circulation of Pantropic Canine Coronavirus in Autochthonous and Imported Dogs, Italy. *Transbound Emerg Dis* 2020, 67, 1991–1999, doi:10.1111/tbed.13542.
- Attipa, C.; Warr, A.S.; Epaminondas, D.; O'Shea, M.; Hanton, A.J.; Fletcher, S.; Malbon, A.; Lyraki, M.; Hammond, R.; Hardas, A.; et al. Feline Infectious Peritonitis Epizootic Caused by a Recombinant Coronavirus. *Nature* 2025, 645, 228–234, doi:10.1038/s41586-025-09340-0.
- Buonavoglia, A.; Pellegrini, F.; Decaro, N.; Galgano, M.; Pratelli, A. A One Health Perspective on Canine Coronavirus: A Wolf in Sheep's Clothing? *Microorganisms* 2023, 11, 921, doi:10.3390/microorganisms11040921.
- Buonavoglia, C.; Decaro, N.; Martella, V.; Elia, G.; Campolo, M.; Desario, C.; Castagnaro, M.; Tempesta, M. Canine Coronavirus Highly Pathogenic for Dogs. *Emerg Infect Dis* 2006, 12, 492–494, doi:10.3201/eid1203.050839.
- Cardillo, L.; Piegari, G.; Iovane, V.; Viscardi, M.; Alfano, F.; Cerrone, A.; Pagnini, U.; Montagnaro, S.; Galiero, G.; Pisanelli, G.; et al. Lifestyle as Risk Factor for Infectious Causes of Death in Young Dogs: A Retrospective Study in Southern Italy (2015-2017). *Vet Med Int* 2020, 2020, 6207297, doi:10.1155/2020/6207297.
- Costa, E.M.; de Castro, T.X.; Bottino, F. de O.; Garcia, R. de C.N.C. Molecular Characterization of Canine Coronavirus Strains Circulating in Brazil. *Vet Microbiol* 2014, 168, 8–15, doi:10.1016/j.vetmic.2013.10.002.
- Decaro, N.; Martella, V.; Desario, C.; Bellacicco, A.L.; Camero, M.; Manna, L.; d'Aloja, D.; Buonavoglia, C. First Detection of Canine Parvovirus Type 2c in Pups with Haemorrhagic Enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006, 53, 468–472, doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00974.x.
- Decaro, N.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Desario, C.; Mari, V.; Colaianni, M.L.; Elia, G.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Experimental Infection of Dogs with a Novel Strain of Canine Coronavirus Causing Systemic Disease and Lymphopenia. *Vet Microbiol* 2008, 128, 253–260, doi:10.1016/j.vetmic.2007.10.008.
- Decaro, N.; Mari, V.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Camero, M.; Elia, G.; Martella, V.; Cordioli, P.; Enjuanes, L.; Buonavoglia, C. Recombinant Canine Coronaviruses Related to Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine Are Circulating in Dogs. *J Virol* 2009, 83, 1532–1537, doi:10.1128/JVI.01937-08.
- Decaro, N.; Mari, V.; Dowgier, G.; Elia, G.; Lanave, G.; Colaianni, M.L.; Buonavoglia, C. Full-Genome Sequence of Pantropic Canine Coronavirus. *Genome Announc* 2015b, 3, e00401-15, doi:10.1128/genomeA.00401-15.
- Decaro, N.; Mari, V.; Elia, G.; Addie, D.D.; Camero, M.; Lucente, M.S.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Recombinant Canine Coronaviruses in Dogs, Europe. *Emerg Infect Dis* 2010, 16, 41–47, doi:10.3201/eid1601.090726.
- Decaro, N.; Mari, V.; Elia, G.; Lanave, G.; Dowgier, G.; Colaianni, M.L.; Martella, V.; Buonavoglia, C. Full-Length Genome Analysis of Canine Coronavirus Type I. *Virus Res* 2015a, 210, 100–105, doi:10.1016/j.virusres.2015.07.018.
- Godsall, S.A.; Clegg, S.R.; Stavisky, J.H.; Radford, A.D.; Pinchbeck, G. Epidemiology of Canine Parvovirus and Coronavirus in Dogs Presented with Severe Diarrhoea to PDSA PetAid Hospitals. *Vet Rec* 2010, 167, 196–201, doi:10.1136/vr.c3095.
- Marinaro, M.; Mari, V.; Bellacicco, A.L.; Tarsitano, E.; Elia, G.; Losurdo, M.; Rezza, G.; Buonavoglia, C.; Decaro, N. Prolonged Depletion of Circulating CD4+ T Lymphocytes and Acute Monocytosis after

- Pantropic Canine Coronavirus Infection in Dogs. *Virus Res* 2010, 152, 73–78, doi:10.1016/j.virusres.2010.06.006.
- Mira, F.; Schirò, G.; Lanave, G.; Chiaramonte, G.; Canuti, M.; Giudice, E.; Capozza, P.; Randazzo, V.; Antoci, F.; Racle, D.A.; et al. Molecular Screening and Characterization of Canine Coronavirus Types I and II Strains from Domestic Dogs in Southern Italy, 2019-2021. *Transbound Emerg Dis* 2024, 2024, 7272785, doi:10.1155/2024/7272785.
- Ntafis, V.; Xylouri, E.; Mari, V.; Papanastassopoulou, M.; Papaioannou, N.; Thomas, A.; Buonavoglia, C.; Decaro, N. Molecular Characterization of a Canine Coronavirus NA/09 Strain Detected in a Dog's Organs. *Arch Virol* 2012, 157, 171–175, doi:10.1007/s00705-011-1141-6.
- Pratelli, A.; Tempesta, M.; Roperto, F.P.; Sagazio, P.; Carmichael, L.; Buonavoglia, C. Fatal Coronavirus Infection in Puppies Following Canine Parvovirus 2b Infection. *J Vet Diagn Invest* 1999, 11, 550–553, doi:10.1177/104063879901100615.
- Pratelli, A.; Tempesta, M.; Elia, G.; Martella, V.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. The Knotty Biology of Canine Coronavirus: A Worrying Model of Coronaviruses' Danger. *Res Vet Sci* 2022, 144, 190–195, doi:10.1016/j.rvsc.2021.11.014.
- Regan, A.D.; Millet, J.K.; Tse, L.P.V.; Chillag, Z.; Rinaldi, V.D.; Licitra, B.N.; Dubovi, E.J.; Town, C.D.; Whittaker, G.R. Characterization of a Recombinant Canine Coronavirus with a Distinct Receptor-Binding (S1) Domain. *Virology* 2012, 430, 90–99, doi:10.1016/j.virol.2012.04.013.
- Stavisky, J.; Pinchbeck, G.; Gaskell, R.M.; Dawson, S.; German, A.J.; Radford, A.D. Cross Sectional and Longitudinal Surveys of Canine Enteric Coronavirus Infection in Kennelled Dogs: A Molecular Marker for Biosecurity. *Infect Genet Evol* 2012, 12, 1419–1426, doi:10.1016/j.meegid.2012.04.010.
- Zobba, R.; Visco, S.; Sotgiu, F.; Pinna Parpaglia, M.L.; Pittau, M.; Alberti, A. Molecular Survey of Parvovirus, Astrovirus, Coronavirus, and Calicivirus in Symptomatic Dogs. *Vet Res Commun* 2021, 45, 31–40, doi:10.1007/s11259-020-09785-w.

### **Canine distemper virus (CDV)**

L'RNA del CDV non è stato individuato in alcuno dei campioni in esame. La ricerca del genoma del virus del cimurro è stata effettuata sia per aderire agli scopi prefissati da questo studio ma anche in ragione del fatto che alcuni segni clinici del cimurro, nello specifico quelli gastro-enterici, non sono chiaramente ed univocamente distinguibili da quelli di altri agenti virali. Il risultato ottenuto può avere varie interpretazioni. Il virus del cimurro, a differenza degli altri virus precedentemente trattati (CPV-2 e CCoV), è caratterizzato da una limitata resistenza nell'ambiente esterno per via della sua labilità (sopravvivenza inferiore alle 24 ore a temperatura ambiente e rapida inattivazione da calore, essiccamento e comuni disinfettanti) e per la sua trasmissione necessita uno stretto contatto tra i cani, essendo trasmesso per via diretta attraverso principalmente l'aerosol di essudati respiratori ed altri secreti, come le urine o il materiale fecale (Marenzoni, 2023). Questo aspetto risulta pertanto condizionante l'epidemiologia del CDV, necessitando quindi per la sua diffusione la prossimità di soggetti malati con altri appartenenti ad una popolazione canina priva di immunità nei suoi confronti. L'ampia disponibilità di formulazioni vaccinali, allestite con ceppi vivi attenuati di CDV (oggi comunemente il ceppo *Onderstepoort*), ed il loro uso estensivo hanno contribuito all'immunizzazione dei cani, producendo una robusta protezione nei confronti della malattia che risulta essere di lunga durata (Schultz, 2006; Schultz et al., 2010). Questo aspetto spiegherebbe la ricorrenza di casi clinici in popolazioni canine non immunizzate e la loro occorrenza più limitata e con minore frequenza in quelle che hanno superato l'infezione naturale od a cui si applica la profilassi immunizzante. In Italia la più recente circolazione del CDV nel cane è stata documentata dal 2013 e negli anni successivi (Alfano et al., 2022; Di Sabatino et al., 2016; Mira et al., 2018; Ricci et al., 2021), principalmente sostenuta dai lineage *Arctic* ed *Europe*. Negli stessi anni (2015-2016) la circolazione del CDV è stata documentata anche in Sicilia (Mira et al., 2018), dove i ceppi circolanti erano correlati a ceppi documentati in Svizzera in cani introdotti dall'Est Europa (Willi et al., 2015). Già nei primi anni 2000 era stata documentata la possibile diffusione del CDV in territori distanti attraverso l'introduzione di cani con infezione in atto, sostenuta dal commercio incontrollato di cani da compagnia appartenenti a razze ad alto valore commerciale (Demeter et al., 2007; Martella et al., 2006).

Pur rimanendo il cane il principale reservoir del CDV, tanti altri animali selvatici (in particolare le volpi in Italia) sono suscettibili all'infezione e manifestano segni clinici simili a quelli del cane, talvolta con esito infausto (Alfano et al., 2025; Coradduzza et al., 2024; Di Francesco et al., 2022; Ricci et al., 2021; Trogu et al., 2022). Alcuni lineage (ad esempio l'*Arctic*) hanno mostrato la loro circolazione sia tra cani che animali selvatici negli stessi territori (Di Sabatino et al., 2016), mentre altri (*Europe* ed *Europe wildlife*) hanno mostrato di circolare principalmente tra i carnivori selvatici suscettibili. Questo sottolinea l'attenzione che va posta all'interfaccia tra i cani e la fauna selvatica, essendo il virus del cimurro come anche gli altri virus considerati in questo studio (CPV-2, CAdV, CCoV) comuni alle diverse specie animali. Infine, l'evidenza del virus del cimurro in primati non umani (scimmie) in Cina ed in Giappone nel 2006-2008 (Qiu et al., 2011; Sakai et al., 2008; Sun et al., 2010), con manifestazioni cliniche di particolare gravità, ha reso opportuna la ricerca di questo virus nei campioni in esame. Sebbene abbia dato esito negativo, alla

luce dell'ampio spettro d'ospite e dei potenziali salti di specie, sarebbero da incoraggiare ulteriori studi su questo virus, sia nel cane quanto nelle specie selvatiche suscettibili.

### Bibliografia

- Alfano, F.; Lanave, G.; Lucibelli, M.G.; Miletti, G.; D'Alessio, N.; Gallo, A.; Auriemma, C.; Amoroso, M.G.; Lucente, M.S.; De Carlo, E.; et al. Canine Distemper Virus in Autochthonous and Imported Dogs, Southern Italy (2014-2021). *Animals (Basel)* 2022, 12, 2852, doi:10.3390/ani12202852.
- Alfano, F.; Lucibelli, M.G.; D'Alessio, N.; Auriemma, C.; Rea, S.; Sgroi, G.; Lucente, M.S.; Pellegrini, F.; Diakoudi, G.; De Carlo, E.; et al. Detection of Canine Distemper Virus in Wildlife in Italy (2022-2024). *Front Vet Sci* 2025, 12, 1527550, doi:10.3389/fvets.2025.1527550.
- Coradduzza, E.; Stefania, F.M.; Pintus, D.; Ferretti, L.; Ledda, A.; Chessa, G.S.; Rocchigiani, A.M.; Lostia, G.; Rossi, R.; Cancedda, M.G.; et al. Canine Distemper Virus in Sardinia, Italy: Detection and Phylogenetic Analysis in Foxes. *Animals (Basel)* 2024, 14, 3134, doi:10.3390/ani14213134.
- Demeter, Z.; Lakatos, B.; Palade, E.A.; Kozma, T.; Forgách, P.; Rusvai, M. Genetic Diversity of Hungarian Canine Distemper Virus Strains. *Vet Microbiol* 2007, 122, 258–269, doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.001.
- Di Francesco, C.E.; Smoglica, C.; Di Pirro, V.; Cafini, F.; Gentile, L.; Marsilio, F. Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of Canine Distemper Virus in Marsican Brown Bear (*Ursus Arctos Marsicanus*). *Animals (Basel)* 2022, 12, 1826, doi:10.3390/ani12141826.
- Di Sabatino, D.; Di Francesco, G.; Zaccaria, G.; Malatesta, D.; Brugnola, L.; Marcacci, M.; Portanti, O.; De Massis, F.; Savini, G.; Teodori, L.; et al. Lethal Distemper in Badgers (*Meles Meles*) Following Epidemic in Dogs and Wolves. *Infect Genet Evol* 2016, 46, 130–137, doi:10.1016/j.meegid.2016.10.020.
- Marenzoni, M.L. Cimurro. In: *Malattie infettive degli animali*. Point Vétérinaire Italie: Milano, Italy, 2023; pp. 659-665.
- Martella, V.; Cirone, F.; Elia, G.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Campolo, M.; Desario, C.; Lucente, M.S.; Bellacicco, A.L.; Blixenkron-Møller, M.; et al. Heterogeneity within the Hemagglutinin Genes of Canine Distemper Virus (CDV) Strains Detected in Italy. *Vet Microbiol* 2006, 116, 301–309, doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.019.
- Mira, F.; Purpari, G.; Di Bella, S.; Vicari, D.; Schirò, G.; Di Marco, P.; Macaluso, G.; Battilani, M.; Guercio, A. Update on Canine Distemper Virus (CDV) Strains of Arctic-like Lineage Detected in Dogs in Italy. *Vet Ital* 2018, 54, 225–236, doi:10.12834/VetIt.1455.7862.2.
- Qiu, W.; Zheng, Y.; Zhang, S.; Fan, Q.; Liu, H.; Zhang, F.; Wang, W.; Liao, G.; Hu, R. Canine Distemper Outbreak in Rhesus Monkeys, China. *Emerg Infect Dis* 2011, 17, 1541–1543, doi:10.3201/eid1708.101153.
- Ricci, I.; Cersini, A.; Manna, G.; Marcario, G.A.; Conti, R.; Brocherel, G.; Grifoni, G.; Eleni, C.; Scicluna, M.T. A Canine Distemper Virus Retrospective Study Conducted from 2011 to 2019 in Central Italy (Latium and Tuscany Regions). *Viruses* 2021, 13, 272, doi:10.3390/v13020272.
- Sakai, K.; Nagata, N.; Ami, Y.; Seki, F.; Suzaki, Y.; Iwata-Yoshikawa, N.; Suzuki, T.; Fukushi, S.; Mizutani, T.; Yoshikawa, T.; et al. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in *Cynomolgus* Monkeys in Japan in 2008. *J Virol* 2013, 87, 1105–1114, doi:10.1128/JVI.02419-12.
- Schultz, R.D.; Thiel, B.; Mukhtar, E.; Sharp, P.; Larson, L.J. Age and Long-Term Protective Immunity in Dogs and Cats. *J Comp Pathol* 2010, 142 Suppl 1, S102-108, doi:10.1016/j.jcpa.2009.10.009.
- Schultz, R.D. Duration of Immunity for Canine and Feline Vaccines: A Review. *Vet Microbiol* 2006, 117, 75–79, doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.013.
- Sun, Z.; Li, A.; Ye, H.; Shi, Y.; Hu, Z.; Zeng, L. Natural Infection with Canine Distemper Virus in Hand-Feeding Rhesus Monkeys in China. *Vet Microbiol* 2010, 141, 374–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.024.
- Trogu, T.; Castelli, A.; Canziani, S.; Tolini, C.; Carrera, M.; Sozzi, E.; Lelli, D.; Tosi, G.; Fiorentini, L.; Di Donato, A.; et al. Detection and Molecular Characterization of Canine Distemper Virus in Wildlife from Northern Italy. *Pathogens* 2022, 11, 1557, doi:10.3390/pathogens11121557.
- Willi, B.; Spiri, A.M.; Meli, M.L.; Grimm, F.; Beatrice, L.; Riond, B.; Bley, T.; Jordi, R.; Dennler, M.; Hofmann-Lehmann, R. Clinical and Molecular Investigation of a Canine Distemper Outbreak and Vector-Borne Infections in a Group of Rescue Dogs Imported from Hungary to Switzerland. *BMC Vet Res* 2015, 11, 154, doi:10.1186/s12917-015-0471-0.

## VIRUS EMERGENTI

### Norovirus (NoV) - Calicivirus

La presenza del genoma (RNA) dei norovirus (NoV) e dei Sapovirus (SaVs), entrambi appartenenti alla famiglia *Caliciviridae* e causa di malattia enterica nel cane (Bodnar et al., 2016; Li et al., 2011; Lyoo et al., 2018; Ma et al., 2021; Martella et al., 2008; Soma et al., 2015) e nell'uomo, è stata indagata attraverso una RT-PCR che utilizza una coppia di primers specifici per i norovirus (Vennema et al., 2002), compresi quelli umani. Per i soli campioni dello studio prospettico, lo studio è stato approfondito anche attraverso una seconda RT-PCR che utilizza una coppia di primers in grado di amplificare e discriminare i NoV ed altri membri della famiglia *Caliciviridae* (generi *Vesivirus* e *Sapovirus*) (Jiang et al., 1999). L'esame dei campioni del periodo 2023-2025 (studio prospettico), analizzati attraverso entrambe le RT-PCR, ha prodotto esito negativo per tutti i campioni testati. Diversamente, in campioni di intestini, feci o tamponi rettali collezionati da n=268 cani nel periodo 2019-2022 sono stati individuati 7/268 (2,6%) campioni positivi, quasi tutti da cani randagi, di cui n=5 cuccioli, n=1 soggetto giovane e n=1 adulto (Tabella 1). Tutti i cani positivi hanno mostrato co-infezioni con CPV-2 (principalmente la variante CPV-2c) e, in tre casi, anche con CCoV-I.

**Tabella 1.** Dettagli dei cani positivi al norovirus.

<b>Id.</b>	<b>Campione</b>	<b>Data di prelievo</b>	<b>Età</b>	<b>Origine</b>	<b>Co-infezioni</b>
A	Tampone rettale	28-02-2019	7 mesi	Di proprietà	CPV-2c
B	Tampone rettale	29-04-2019	2 mesi	Randagio	CPV-2c/CCoV-I
C	Intestino	24-05-2019	3 mesi	Randagio	CPV-2c
D	Tampone rettale	09-11-2020	2 mesi	Randagio	CPV-2b
E	Tampone rettale	16-03-2021	3 mesi	Randagio	CPV-2c/CCoV-I
F	Tampone rettale	16-03-2021	3 mesi	Randagio	CPV-2c/CCoV-I
G	Intestino	09-11-2021	3 anni	Randagio	CPV-2c

La percentuale di positività (2,6%) è in linea con quanto rilevato dai pochi precedenti studi (2,2%) in Italia (Martella et al., 2009), (3,9%) in Europa (Bodnar et al., 2017), ed (3,1%) in Korea (Lyoo et al., 2018), e fornisce un background epidemiologico utile a giustificare il risultato negativo ottenuto per i cani analizzati negli anni successivi, in relazione al numero dei soggetti testati. Infatti, questi valori di prevalenza attesi suggeriscono la necessità di un campione d'esame più ampio, per aumentare la probabilità di rilievo di ceppi di NoV. L'evidenza di NoV quasi esclusivamente in cani randagi sottolinea anche l'origine e la potenziale diffusione di questi virus in contesti antropizzati. Precedenti studi hanno mostrato l'evidenza di anticorpi verso il norovirus del cane in emosieri di origine umana ed in particolare appartenenti a medici veterinari (Di Martino et al., 2014; Mesquita et al., 2013) e di norovirus umani in campioni di feci di cani conviventi con soggetti sintomatici (Summa et al., 2012): questi dati suggeriscono la circolazione di norovirus con una comune origine, che possono trasmettersi a seguito della stretta convivenza tra uomini e cani, seppure la significatività clinica dell'evidenza di ceppi eterologhi appaia ancora da determinare.

I n=7 ceppi di NoV in esame hanno mostrato le più elevate identità nucleotidiche (n=1) con ceppi appartenenti al genogruppo GVI (genotipo GVI.2) collezionati in Cina nel 2018/2019 (95,72%) e (n=6) con ceppi appartenenti al genogruppo GIV (genotipo GIV.2) collezionati in Italia nel 2007 (94,21-93,29%) ed in Grecia nel 2008 (95,18-93,89%) (Tabella 2).

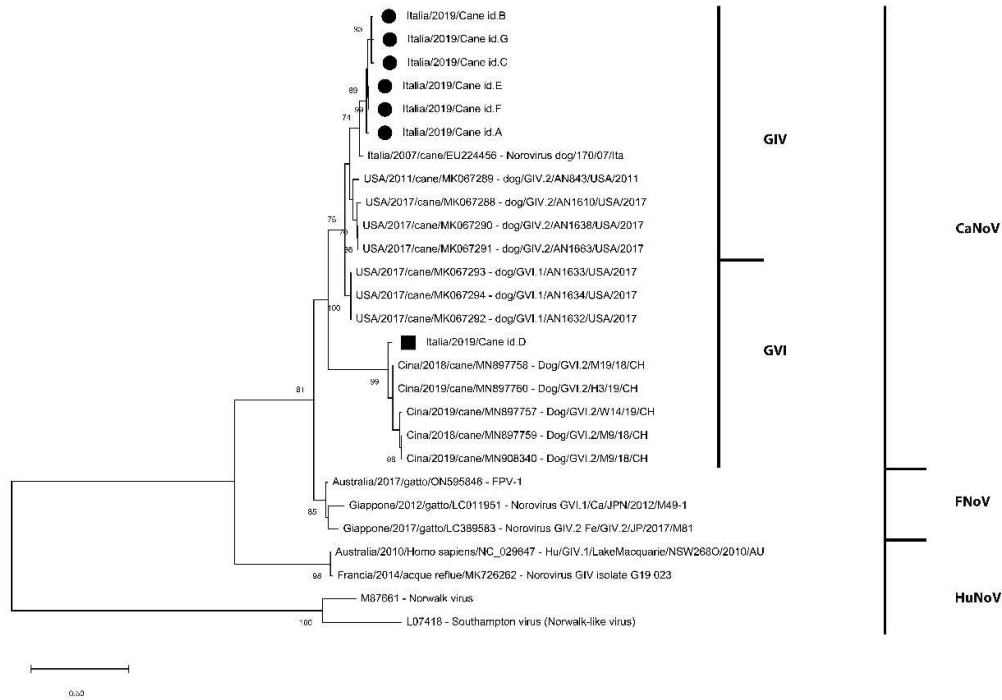
**Tabella 2.** Identità nucleotidiche con ceppi CaNoV correlati.

<b>Id.</b>	<b>Genot.</b>	<b>Identità (%)</b>	<b>Accession number</b>	<b>Paese, ospite ed anno di origine</b>	<b>Bibliografia</b>
A	GIV.2	94,21%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		95,18%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,83%	MK067289	USA, cane, 2010	<i>Ford-Siltz et al., 2019</i>
B	GIV.2	93,60%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		94,89%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,21%	MK067288	USA, cane, 2010	<i>Ford-Siltz et al., 2019</i>
C	GIV.2	93,29%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		93,89%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,21%	MW165826	Cina, cane, 2019	<i>Ma et al., 2021</i>
D	GVI.2	95,72%	MN897758	Cina, cane, 2018	<i>Ma et al., 2021</i>
		95,72%	MN897760	Cina, cane, 2019	<i>Ma et al., 2021</i>
		93,58%	MK067295	USA, cane, 2017	<i>Ford-Siltz et al., 2019</i>
E	GIV.2	93,29%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		93,89%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,21%	MW165826	Cina, cane, 2019	<i>Ma et al., 2021</i>
F	GIV.2	93,29%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		93,89%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,21%	MW165826	Cina, cane, 2019	<i>Ma et al., 2021</i>
G	GIV.2	93,29%	EU224456	Italia, cane, 2007	<i>Martella et al., 2008</i>
		93,89%	GU354246	Grecia, cane, 2008	<i>Ntafis et al., 2010</i>
		90,21%	MW165826	Cina, cane, 2019	<i>Ma et al., 2021</i>

I risultati mostrano (i) una netta prevalenza dei ceppi assimilabili al genotipo GIV.2, in linea con i pochi altri dati disponibili in Italia, rispetto al rilievo di un solo ceppo del genotipo GVI.2, (ii) tutti identificati come norovirus del cane (canine norovirus, CaNoV) e (iii) senza alcuna evidenza di ceppi di origine umana (human norovirus, HuNoV): in Italia, i ceppi di CaNoV appartenenti ad entrambi i genotipi sono stati identificati per la prima volta nel 2007 (GIV.2 (*Martella et al., 2008*) e GVI.2 (*Bodnar et al., 2017*)), e, negli anni successivi, pochi altri studi li hanno descritti in altri paesi e continenti (GIV.2 in Portogallo (*Mesquita et al., 2012*), Grecia (*Ntafis et al., 2010*), Cina (*Ma et al., 2021*) ed USA (*Ford-Siltz et al., 2019*); GVI.2 in Cina (*Ma et al., 2021*), USA (*Ford-Siltz et al., 2019*) e Corea del Sud (*Lyoo et al., 2018*). Norovirus appartenenti a questi genogruppi, vicini ai CaNoV, sono stati descritti in Italia anche nel gatto, finanche in Sicilia, ed in leoni (*Di Martino et al., 2016; Martella et al., 2007; Mira et al., 2024*). Questi risultati, basati su un frammento parziale (328 paia di basi) della regione RdRp, sebbene integrino i pochi dati disponibili in letteratura evidenziando la maggiore circolazione del genogruppo IV, necessitano tuttavia di essere integrati dal sequenziamento e dall'analisi della proteina (VP1) del capsido virale, codificata dalla ORF1 del genoma di NoV, per una più dettagliata genotipizzazione dei ceppi virali in esame.

L'analisi filogenetica (Figura 1) ha confermato la segregazione dei ceppi in esame tra i ceppi di CaNoV e, in particolare, nei due subclade che raggruppano i norovirus dei cani rispettivamente appartenenti ai genogruppi IV e VI. Il subclade che include il ceppo del cane id. D raccoglie sequenze di CaNov GVI

identificati in Cina, le uniche disponibili in GenBank per il frammento di genoma corrispondente. Nonostante il limite delle sequenze disponibili, l'analisi filogenetica ha chiaramente distinto i ceppi in esame nei genogruppi di appartenenza. Questi risultati integrano quelli correnti e la disponibilità di sequenze aggiornate provenienti dal territorio nazionale.



**Figura 1.** Albero filogenetico costruito con il metodo Maximum-likelihood, modello Kimura 2-parameter (K2) e distribuzione Gamma (+G), bootstrap su 1000 replicati (sono mostrati i valori di bootstrap maggior di 65) basato su 27 sequenze parziali (328 paia di basi) della regione RdRp (ORF1) di ceppi di norovirus di cane, gatto e dell'uomo. I ceppi descritti in questo studio sono marcati con ● (genogruppo IV) e ■ (genogruppo VI). Ciascuna sequenza è indicata, ove disponibile il dato, con Paese/anno di identificazione/specie animale di origine/accession number – nome del ceppo.

Il basso tasso di positività (2,6% nel periodo 2019-2022) e la discontinuità di rilievo negli anni (3 casi nel 2019, 1 nel 2020, 3 nel 2021 e 0 cani positivi dal 2022 e fino a febbraio 2025) hanno condizionato la disponibilità di ceppi da esaminare; nonostante ciò, i dati ottenuti sono certamente utili. Il genogruppo IV è quello maggiormente rappresentato, a cui si aggiunge un ceppo del genogruppo VI che rappresenta uno dei più recenti ed emergenti genotipi in Italia ed in altri paesi del mondo, che coesistono pertanto con i più diffusi norovirus del genogruppo IV e descrivendo il grado di eterogeneità dei ceppi circolanti nel cane. L'evidenza di co-infezioni con altri virus, in particolare il CPV-2 (il principale patogeno enterico virale del cane), la cui significatività nel determinare enterite nel cane è ampiamente descritta, aggiunge ulteriori quesiti sul ruolo clinico del norovirus del cane, mentre l'assenza di casi d'infezione singola non permette di formulare altre considerazioni.

Nella specie umana i norovirus sono causa di gravi episodi di enterite, in particolare tra i bambini ed i soggetti con immunodeficienze, e sono riconosciuti tra le principali cause di epidemie di enterite non batterica nel mondo (Bodnar et al., 2017; Martella et al., 2008; Patel et al., 2008). Nella specie umana, il norovirus è un agente infettivo altamente contagioso, trasmesso per contatto diretto o attraverso il consumo di alimenti o acqua contaminati. Diversamente dalla specie umana, queste caratteristiche non sono state comunemente osservate nel cane, per cui la fonte di infezione e le modalità di trasmissione sono ancora da determinare.

I norovirus dell'uomo sono classicamente appartenenti ai genogruppi I, II e IV: tra questi, il GII risulta essere quello maggiormente prevalente nel mondo, mentre il GIV è quello identificato solo sporadicamente nell'uomo, seppur più frequentemente rilevato in acque reflue di impianti di depurazione, dimostrando in ogni caso la circolazione di questo genogruppo nella specie umana (Bodnar et al., 2017; Di Martino et al., 2014; Martella et al., 2008, 2009, 2011). I norovirus del cane ad oggi descritti sono inclusi nei genogruppi IV (genotipo GIV.2), VI (genotipo GVI.1 e GVI.2) e VII (Bodnar et al., 2017). Sebbene i norovirus comuni all'uomo ed al cane siano ascrivibili al solo genogruppo IV, i genotipi segnalati nel cane appartengono al genotipo GIV.2 mentre quelli dell'uomo al genotipo GIV.1 (Di Martino et al., 2014; Martella et al., 2008, 2009). Inoltre, anticorpi anti-norovirus del cane dei genogruppi IV e VI sono stati determinati in campioni di siero umani (Di Martino et al., 2014; Mesquita et al., 2013), evidenziando il contatto dell'uomo con questi virus. Per tale motivo è stata avanzata un'ipotesi di relazione evolutiva tra i NoV dell'uomo e degli animali, da cui la necessità di approfondire con studi relativi. La recente evidenza di ceppi di HuNoV GII in campioni fecali di cani a stretto contatto con pazienti sintomatici ha dimostrato la sopravvivenza di questi ceppi e la loro eliminazione attraverso il tratto gastrointestinale del cane (Summa et al., 2012), avanzando nuovi quesiti sul ruolo del cane nella diffusione di norovirus umani.

Per quanto sia stato osservato che norovirus differenti tra loro possano determinare sierconversione in specie diverse, gli studi attuali non dimostrano il determinismo di casi clinici dell'uomo conseguenti all'infezione del norovirus del cane. In considerazione delle caratteristiche intrinseche dei norovirus (come ad esempio la bassa dose infettante e l'elevata resistenza nell'ambiente, che contribuirebbe all'elevato rischio di contagio nella specie umana (Lyoo et al., 2018)) e del potenziale di ricombinazione tra ceppi, sarebbe da suggerire un più ampio e continuo monitoraggio, orientando la ricerca soprattutto verso siti (strutture sanitarie di ricovero e cura di cani) e categorie (cani randagi) potenzialmente a maggiore rischio.

### Bibliografia

- Bodnar, L.; Di Martino, B.; Di Profio, F.; Melegari, I.; Lanave, G.; Lorusso, E.; Cavalli, A.; Elia, G.; Bányai, K.; Marsilio, F.; et al. Detection and Molecular Characterization of Sapoviruses in Dogs. *Infect Genet Evol* 2016, 38, 8–12, doi:10.1016/j.meegid.2015.11.034.
- Bodnar, L.; Lorusso, E.; Di Martino, B.; Catella, C.; Lanave, G.; Elia, G.; Bányai, K.; Buonavoglia, C.; Martella, V. Identification of a Novel Canine Norovirus. *Infect Genet Evol* 2017, 52, 75–81, doi:10.1016/j.meegid.2017.04.020.
- Di Martino, B.; Di Profio, F.; Ceci, C.; Di Felice, E.; Green, K.Y.; Bok, K.; De Grazia, S.; Giammanco, G.M.; Massirio, I.; Lorusso, E.; et al. Seroprevalence of Norovirus Genogroup IV Antibodies among Humans, Italy, 2010–2011. *Emerg Infect Dis* 2014, 20, 1828–1832, doi:10.3201/eid2011.131601.

- Di Martino, B.; Di Profio, F.; Melegari, I.; Sarchese, V.; Cafiero, M.A.; Robetto, S.; Aste, G.; Lanave, G.; Marsilio, F.; Martella, V. A Novel Feline Norovirus in Diarrheic Cats. *Infect Genet Evol* 2016, 38, 132–137, doi:10.1016/j.meegid.2015.12.019.
- Ford-Siltz, L.A.; Mullis, L.; Sanad, Y.M.; Tohma, K.; Lepore, C.J.; Azevedo, M.; Parra, G.I. Genomics Analyses of GIV and GVI Noroviruses Reveal the Distinct Clustering of Human and Animal Viruses. *Viruses* 2019, 11, 204, doi:10.3390/v11030204.
- Jiang, X.; Huang, P.W.; Zhong, W.M.; Farkas, T.; Cubitt, D.W.; Matson, D.O. Design and Evaluation of a Primer Pair That Detects Both Norwalk- and Sapporo-like Caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999, 83, 145–154, doi:10.1016/s0166-0934(99)00114-7.
- Li, L.; Pesavento, P.A.; Shan, T.; Leutenegger, C.M.; Wang, C.; Delwart, E. Viruses in Diarrhoeic Dogs Include Novel Kobuviruses and Sapoviruses. *J Gen Virol* 2011, 92, 2534–2541, doi:10.1099/vir.0.034611-0.
- Lyoo, K.-S.; Jung, M.-C.; Yoon, S.-W.; Kim, H.K.; Jeong, D.G. Identification of Canine Norovirus in Dogs in South Korea. *BMC Vet Res* 2018, 14, 413, doi:10.1186/s12917-018-1723-6.
- Ma, H.; Yue, H.; Luo, Y.; Li, S.; Tang, C. First Detection of Canine Norovirus in Dogs and a Complete GVI.2 Genome in Mainland China. *Infect Genet Evol* 2021, 92, 104879, doi:10.1016/j.meegid.2021.104879.
- Martella, V.; Campolo, M.; Lorusso, E.; Cavicchio, P.; Camero, M.; Bellacicco, A.L.; Decaro, N.; Elia, G.; Greco, G.; Corrente, M.; et al. Norovirus in Captive Lion Cub (*Panthera Leo*). *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1071–1073, doi:10.3201/eid1307.070268.
- Martella, V.; Decaro, N.; Lorusso, E.; Radogna, A.; Moschidou, P.; Amorisco, F.; Lucente, M.S.; Desario, C.; Mari, V.; Elia, G.; et al. Genetic Heterogeneity and Recombination in Canine Noroviruses. *J Virol* 2009, 83, 11391–11396, doi:10.1128/JVI.01385-09.
- Martella, V.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Elia, G.; Radogna, A.; D'Abramo, M.; Desario, C.; Cavalli, A.; Corrente, M.; Camero, M.; et al. Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus. *Emerg Infect Dis* 2008, 14, 1306–1308, doi:10.3201/eid1408.080062.
- Martella, V.; Pinto, P.; Buonavoglia, C. Canine Noroviruses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011, 41, 1171–1181, doi:10.1016/j.cvsm.2011.08.002.
- Mesquita, J.R.; Costantini, V.P.; Cannon, J.L.; Lin, S.; Nascimento, M.S.J.; Vinjé, J. Presence of Antibodies against Genogroup VI Norovirus in Humans. *Virol J* 2013, 10, 176, doi:10.1186/1743-422X-10-176.
- Mesquita, J.R.; Nascimento, M.S.J. Molecular Epidemiology of Canine Norovirus in Dogs from Portugal, 2007-2011. *BMC Vet Res* 2012, 8, 107, doi:10.1186/1746-6148-8-107.
- Mira, F.; Schirò, G.; Giudice, E.; Purpari, G.; Origi, F.; Vicari, D.; Di Pietro, S.; Antoci, F.; Gucciardi, F.; Geraci, F.; et al. Viral Pathogens in Domestic Cats in Southern Italy: A Retrospective Analysis in Sicily, 2020-2022. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2024, 111, 102209, doi:10.1016/j.cimid.2024.102209.
- Ntafis, V.; Xylouri, E.; Radogna, A.; Buonavoglia, C.; Martella, V. Outbreak of Canine Norovirus Infection in Young Dogs. *J Clin Microbiol* 2010, 48, 2605–2608, doi:10.1128/JCM.02528-09.
- Patel, M.M.; Widdowson, M.-A.; Glass, R.I.; Akazawa, K.; Vinjé, J.; Parashar, U.D. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008, 14, 1224–1231, doi:10.3201/eid1408.071114.
- Soma, T.; Nakagomi, O.; Nakagomi, T.; Mochizuki, M. Detection of Norovirus and Sapovirus from Diarrheic Dogs and Cats in Japan. *Microbiol Immunol* 2015, 59, 123–128, doi:10.1111/1348-0421.12223.
- Summa, M.; von Bonsdorff, C.-H.; Maunula, L. Pet Dogs--a Transmission Route for Human Noroviruses? *J Clin Virol* 2012, 53, 244–247, doi:10.1016/j.jcv.2011.12.014.
- Vennema, H.; de Bruin, E.; Koopmans, M. Rational Optimization of Generic Primers Used for Norwalk-like Virus Detection by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Clin Virol* 2002, 25, 233–235, doi:10.1016/s1386-6532(02)00126-9.

## Rotavirus (RoV)

La ricerca del genoma di rotavirus ha dato esito negativo per tutti i campioni testati nel periodo 2023-2025. Diversamente, l'esame di campioni di intestino, feci e tamponi rettali collezionati ad n=170 cani nel periodo 2020-2022 ha prodotto due risultati positivi (1,1% dei cani testati). Sommando il numero dei cani i cui campioni sono stati sottoposti ad esame (n=221), il tasso di positività si attesta allo 0,9%.

Nella letteratura scientifica sono pochi i dati epidemiologici, essendo molti degli studi sui rotavirus del cane basati sulla descrizione ed analisi di singoli ceppi virali. Un risultato simile (0,78%) è stato ottenuto in uno studio condotto recentemente in canili del Nord-Est d'Italia (*Mazzotta et al., 2024*): nessuno dei due cani positivi di quello studio mostrava segni gastro-intestinali al momento del campionamento ed il genotipo dei ceppi virali non è stato analizzato. Altri studi epidemiologici condotti in Thailandia hanno mostrato tassi di positività differenti tra loro: uno, effettuato su campioni provenienti da cani clinicamente sani a momento del prelievo (*Chamsai et al., 2024*), ha evidenziato un tasso di positività leggermente maggiore (2,75%; 8/290 cani) mentre l'altro (*Charoenkul et al., 2021*), su campioni ottenuti da cani sia clinicamente sani (n=3) che con diarrea (n=2), ha evidenziato un tasso dello 0,70% (5/710); in entrambi questi studi è stato rilevato il genotipo G3P[3], quello predominante tra i cani. In ogni caso, questi ridotti tassi di positività sottolineano la bassa incidenza dell'infezione da rotavirus nei cani e quindi la bassa probabilità di rilevare il rotavirus da questa specie in relazione al campione in esame, se comparato ad altri virus della specie.

In entrambi i casi positivi descritti in questo studio, si tratta di soggetti giovani, di diversa origine ed in un caso in co-infezione con CPV-2c (Tabella 1).

**Tabella 1.** Dettagli dei cani positivi al rotavirus.

<b>Id.</b>	<b>Campione</b>	<b>Data di prelievo</b>	<b>Età</b>	<b>Origine</b>	<b>Co-infezioni</b>	<b>lesioni</b>
A	Intestino	17-02-2021	10 giorni	Di proprietà	nessuno	Emoperitoneo; lieve enterite
B	Intestino	02-11-2021	5 mesi	Allevamento	CPV-2c	Emaciazione; grave enterite

Un caso (cane id. A) è stato riferito come un fatto di mortalità neonatale di una cucciolata, dopo avere mostrato debolezza e segni clinici enterici, mentre il secondo (cane id. B) come un caso di morte improvvisa. Questi dati integrano i pochi disponibili sulle manifestazioni cliniche associate al rilievo di rotavirus nel tratto gastro-enterico del cane. In entrambi i casi non sono stati però effettuati ulteriori esami per determinare il G- ed il P- tipo dei ceppi rilevati, limitandone la comparazione con i dati disponibili in letteratura. Nella maggior parte dei casi descritti negli studi precedenti, i cani positivi non mostrano segni clinici se non diarrea (raramente); si tratta di soggetti prevalentemente di età inferiore ai sei mesi di età (*Albuquerque et al., 2023*; *Chamsai et al., 2024*; *Charoenkul et al., 2021*; *Mosallanejad et al., 2015*). La selezione di un campione target (<6 mesi, senza segni clinici o con segni enterici) potrebbe pertanto orientare ulteriori studi epidemiologici per determinare con maggiore accuratezza la circolazione di rotavirus nel cane. Inoltre, la determinazione del genotipo risulta determinante per confermare il rilievo e per determinare le similitudini con i rotavirus descritti nel cane ed in altre specie animali, uomo compreso, o valutare fenomeni di riassortimento genico. A tal fine, occorre evidenziare come il crescente interesse verso i rotavirus e, in

particolare, verso quelli comuni all'uomo ed agli animali, abbia contribuito già dall'inizio degli anni '90 allo sviluppo di metodologie biomolecolari per la determinazione del genotipo, attraverso protocolli di retrotrascrizione/amplificazione (RT-PCR) combinati ad analisi attraverso enzimi di restrizione (restriction fragment length polymorphism, RFLP) o sequenziamento nucleotidico, che utilizzano come target i geni VP7 e VP4 o, più recentemente, il gene NSP4 (Bányai et al., 2009). Questi stessi protocolli possono quindi contribuire a trarre più dettagliate conclusioni sul genotipo di appartenenza dei ceppi di origine canina e, quindi, sul reale potenziale zoonotico degli stessi, garantendo la metodologia necessaria ad ulteriori studi. Gli studi sul genoma dei rotavirus hanno evidenziato la similitudine tra quelli del cane e dell'uomo (Fujiwara & Nakagomi, 1997; Li et al., 1994; Nakagomi et al., 1990; Nakagomi & Nakagomi 2000), stimolando l'attenzione sul potenziale zoonotico dei rotavirus del cane e la trasmissione interspecie che potrebbe indurre fenomeni di riassortimento genico. L'interesse alla potenziale trasmissione interspecie ha origine nella chiara evidenza del rotavirus nella specie canina già dai primi anni '80 (Biermann et al., 1989; Finlaison, 1995; Kölbl et al., 1990; Mochizuki & Hsüan, 1984; Osterhaus et al., 1980) e si è accresciuto, con lo sviluppo delle tecniche biomolecolari e di analisi del genoma, grazie al più recente rilievo di rotavirus del cane in campioni di origine umana (Palombo, 2002; Tsugawa & Hoshino, 2008; Vonsover et al., 1993). Ceppi di rotavirus del cane (genotipo A, sierotipo G3) sono stati anche identificati e descritti in Italia (Martella et al., 2001a-b) e questi stessi (ceppo G3P[3]) sono stati anche diagnosticati in un caso di grave enterite acuta in un bambino a Palermo nel 1997 (De Grazia et al., 2007), rinforzando l'ipotesi del passaggio delle barriere di specie ma anche la capacità di questi ceppi virali di indurre forme cliniche gravi nei bambini. Altri studi hanno evidenziato casi clinici simili (Luchs et al., 2012; Tsugawa & Hoshino, 2008; Wu et al., 2012) e ribadito questa correlazione tra i ceppi G3P[3] della specie umana e quelli del cane (Grant et al., 2011; Papp et al., 2015; Tsugawa & Hoshino, 2008). Nel corso degli anni sono stati identificati altri ceppi di rotavirus G3P[3] in cani in Asia (Chen et al., 2022; Luchs et al., 2012; Tsugawa & Hoshino, 2008; Wu et al., 2012) e Sud America (Azevedo et al., 2023), evidenziando riassortimenti multipli tra rotavirus umani ed animali.

Come quelli del cane, anche altri rotavirus (sierotipo G3) di origine animale o derivati dal riassortimento tra ceppi dell'uomo e degli animali hanno mostrato potenziale zoonotico, tra cui quelli correlati ai rotavirus degli equini (G3P[8]) (Bonura et al., 2022), dei suini (G3P[6] e G3P[13]) (Kaneko et al., 2018; Yan et al., 2021), dei gatti (G3P[9]) (Nguyen et al., 2016) e dei pipistrelli (G3P[10]) (Komoto et al., 2021), sottolineando la possibilità di riassortimento genico tra ceppi di rotavirus originati da specie animali differenti e di trasmissione a specie diverse tra loro. Anche per i ceppi di rotavirus del cane è stata osservata la possibilità di derivare verosimilmente da fenomeni di riassortimento con rotavirus di altre specie di animali domestici come i suini (Yan et al., 2019) o con rotavirus di altre specie, tra cui quelli dell'uomo o dei pipistrelli (Chamsai et al., 2024; Charoenkul et al., 2021; Chen et al., 2022).

Questi dati evidenziano ancora una volta la necessità di un monitoraggio continuo, sia di tipo clinico che del genoma, in particolare dei rotavirus circolanti nelle specie animali domestiche e da compagnia, al fine

di ottenere ceppi virali utili a supportare le misure di sorveglianza umana e a determinarne l'impatto, le possibili origini e le vie di trasmissione.

### Bibliografia

- Albuquerque, M.A.; Deus, D.R. de; Lobo, P.S.; Teixeira, D.M.; Maués, M.A.C.; Cardoso, J.F.; Silva, L.D. da; Gabbay, Y.B.; Resque, H.R.; Silva Soares, L. da; et al. Detection of G3 Human-like Rotavirus in Institutionalized Dogs from Brazil. *Braz J Microbiol* 2023, 54, 1295–1301, doi:10.1007/s42770-023-00972-w.
- Azevedo, L.S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Viana, E.; França, Y.; Medeiros, R.S.; Guiducci, R.; Morillo, S.G.; Primo, D.; Lopes, R.D.; et al. Full Genotype Characterization of Brazilian Canine G3P[3] Strains during a 10-Year Survey (2012-2021) of Rotavirus Infection in Domestic Dogs and Cats. *Arch Virol* 2023, 168, 176, doi:10.1007/s00705-023-05807-5.
- Bányai, K.; Bogdán, Á.; Szücs, G.; Arista, S.; De Grazia, S.; Kang, G.; Banerjee, I.; Iturriza-Gómara, M.; Buonavoglia, C.; Martella, V. Assignment of the Group A Rotavirus NSP4 Gene into Genotypes Using a Hemi-Nested Multiplex PCR Assay: A Rapid and Reproducible Assay for Strain Surveillance Studies. *J Med Microbiol* 2009, 58, 303–311, doi:10.1099/jmm.0.005124-0.
- Biermann, U.; Herbst, W.; Krauss, H.; Schliesser, T. [Electron microscopic detection rate of enteral viruses in diarrhea of dogs, cats, calves, swine and foals in the year 1988--electron microscopic study results]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1989, 102, 412–414.
- Bonura, F.; Banyai, K.; Mangiaracina, L.; Bonura, C.; Martella, V.; Giammanco, G.M.; De Grazia, S. Emergence in 2017-2019 of Novel Reassortant Equine-like G3 Rotavirus Strains in Palermo, Sicily. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 813–835, doi:10.1111/tbed.14054.
- Chamsai, E.; Charoenkul, K.; Udom, K.; Jairak, W.; Chaiyawong, S.; Amonsin, A. Genetic Characterization and Evidence for Multiple Reassortments of Rotavirus A G3P[3] in Dogs and Cats in Thailand. *Front Vet Sci* 2024, 11, 1415771, doi:10.3389/fvets.2024.1415771.
- Charoenkul, K.; Janetanakit, T.; Bunpapong, N.; Boonyapisitsopa, S.; Tangwangvivat, R.; Suwannakarn, K.; Theamboonlers, A.; Poovorawan, Y.; Amonsin, A. Molecular Characterization Identifies Intra-Host Recombination and Zoonotic Potential of Canine Rotavirus among Dogs from Thailand. *Transbound Emerg Dis* 2021, 68, 1240–1252, doi:10.1111/tbed.13778.
- Chen, Y.; Wu, R.; Mi, W.; Ghonaim, A.H.; Ren, W.; Yang, L.; Ruan, S.; He, Q.; Chen, H.; Jiang, Y. Molecular Evolution and Genetic Characteristics of G3P[3] Group A Canine Rotavirus Isolated in Wuhan, China. *J Gen Virol* 2022, 103, doi:10.1099/jgv.0.001784.
- De Grazia, S.; Martella, V.; Giammanco, G.M.; Gómara, M.I.; Ramirez, S.; Cascio, A.; Colomba, C.; Arista, S. Canine-Origin G3P[3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1091–1093, doi:10.3201/eid1307.070239.
- Finlaison, D.S. Faecal Viruses of Dogs--an Electron Microscope Study. *Vet Microbiol* 1995, 46, 295–305, doi:10.1016/0378-1135(95)00094-q.
- Fujiwara, Y.; Nakagomi, O. Interspecies Sharing of Two Distinct Nonstructural Protein 1 Alleles among Human and Animal Rotaviruses as Revealed by Dot Blot Hybridization. *J Clin Microbiol* 1997, 35, 2703–2705, doi:10.1128/jcm.35.10.2703-2705.1997.
- Grant, L.; Esona, M.; Gentsch, J.; Watt, J.; Reid, R.; Weatherholtz, R.; Santosham, M.; Parashar, U.; O'Brien, K. Detection of G3P[3] and G3P[9] Rotavirus Strains in American Indian Children with Evidence of Gene Reassortment between Human and Animal Rotaviruses. *J Med Virol* 2011, 83, 1288–1299, doi:10.1002/jmv.22076.
- Kaneko, M.; Do, L.P.; Doan, Y.H.; Nakagomi, T.; Gauchan, P.; Agbemabiese, C.A.; Dang, A.D.; Nakagomi, O. Porcine-like G3P[6] and G4P[6] Rotavirus A Strains Detected from Children with Diarrhoea in Vietnam. *Arch Virol* 2018, 163, 2261–2263, doi:10.1007/s00705-018-3836-4.
- Kölbl, S.; Vogel, I.; Modli, M.; Gerstl, F. [Comparison of the diagnostic methods for studying parvovirus and rotavirus infections of dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1990, 103, 232–236.
- Komoto, S.; Tacharoenuang, R.; Guntapong, R.; Upachai, S.; Singchai, P.; Ide, T.; Fukuda, S.; Hatazawa, R.; Sutthiwarakom, K.; Kongjorn, S.; et al. Genomic Characterization of a Novel G3P[10] Rotavirus Strain from a Diarrheic Child in Thailand: Evidence for Bat-to-Human Zoonotic Transmission. *Infect Genet Evol* 2021, 87, 104667, doi:10.1016/j.meegid.2020.104667.

- Li, B.; Clark, H.F.; Gouvea, V. Amino Acid Sequence Similarity of the VP7 Protein of Human Rotavirus HCR3 to That of Canine and Feline Rotaviruses. *J Gen Virol* 1994, 75 ( Pt 1), 215–219, doi:10.1099/0022-1317-75-1-215.
- Luchs, A.; Cilli, A.; Morillo, S.G.; Carmona, R. de C.C.; Timenetsky, M. do C.S.T. Rare G3P[3] Rotavirus Strain Detected in Brazil: Possible Human-Canine Interspecies Transmission. *J Clin Virol* 2012, 54, 89–92, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.025.
- Martella, V.; Pratelli, A.; Elia, G.; Decaro, N.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Isolation and Genetic Characterization of Two G3P5A[3] Canine Rotavirus Strains in Italy. *J Virol Methods* 2001a, 96, 43–49, doi:10.1016/s0166-0934(01)00312-3.
- Martella, V.; Pratelli, A.; Greco, G.; Gentile, M.; Fiorente, P.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Nucleotide Sequence Variation of the VP7 Gene of Two G3-Type Rotaviruses Isolated from Dogs. *Virus Res* 2001b, 74, 17–25, doi:10.1016/s0168-1702(00)00230-6.
- Mazzotta, E.; Lucchese, L.; Corrò, M.; Ceglie, L.; Danesi, P.; Capello, K.; Natale, A. Zoonoses in Dog and Cat Shelters in North-East Italy: Update on Emerging, Neglected and Known Zoonotic Agents. *Front Vet Sci* 2024, 11, 1490649, doi:10.3389/fvets.2024.1490649.
- Mochizuki, M.; Hsüan, S. Isolation of a Rotavirus from Canine Diarrheal Feces. *Nihon Juigaku Zasshi* 1984, 46, 905–908, doi:10.1292/jvms1939.46.905.
- Mosallanejad, B.; Shapouri, M.R.S.; Avizeh, R.; Pourmahdi, M. Antigenic Detection of Canine Rotavirus Group A in Diarrheic Dogs in Ahvaz District, Southwestern Iran. *Comp Clin Path* 2015, 24, 899–902, doi:10.1007/s00580-014-2005-8.
- Nakagomi, O.; Ohshima, A.; Aboudy, Y.; Shif, I.; Mochizuki, M.; Nakagomi, T.; Gotlieb-Stematsky, T. Molecular Identification by RNA-RNA Hybridization of a Human Rotavirus That Is Closely Related to Rotaviruses of Feline and Canine Origin. *J Clin Microbiol* 1990, 28, 1198–1203, doi:10.1128/jcm.28.6.1198-1203.1990.
- Nakagomi, T.; Nakagomi, O. Human Rotavirus HCR3 Possesses a Genomic RNA Constellation Indistinguishable from That of Feline and Canine Rotaviruses. *Arch Virol* 2000, 145, 2403–2409, doi:10.1007/s007050070029.
- Nguyen, T.H.; Than, V.T.; Thanh, H.D.; Kim, W. Evidence of Multiple Reassortment Events of Feline-to-Human Rotaviruses Based on a Rare Human G3P[9] Rotavirus Isolated from a Patient with Acute Gastroenteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016, 46, 53–59, doi:10.1016/j.cimid.2016.04.003.
- Osterhaus, A.D.; Drost, G.A.; Wirahadiredja, R.M.; van den Ingh, T.S. Canine Viral Enteritis: Prevalence of Parvo-, Corona- and Rotavirus Infections in Dogs in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk* 1980, 105, 181–190.
- Palombo, E.A. Genetic Analysis of Group A Rotaviruses: Evidence for Interspecies Transmission of Rotavirus Genes. *Virus Genes* 2002, 24, 11–20, doi:10.1023/a:1014073618253.
- Papp, H.; Mihalov-Kovács, E.; Dóró, R.; Marton, S.; Farkas, S.L.; Giammanco, G.M.; De Grazia, S.; Martella, V.; Bányai, K. Full-Genome Sequencing of a Hungarian Canine G3P[3] Rotavirus A Strain Reveals High Genetic Relatedness with a Historic Italian Human Strain. *Virus Genes* 2015, 50, 310–315, doi:10.1007/s11262-014-1163-8.
- Tsugawa, T.; Hoshino, Y. Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analyses Reveal Human Rotavirus G3P[3] Strains Ro1845 and HCR3A Are Examples of Direct Virion Transmission of Canine/Feline Rotaviruses to Humans. *Virology* 2008, 380, 344–353, doi:10.1016/j.virol.2008.07.041.
- Vonsover, A.; Shif, I.; Silberstein, I.; Rudich, H.; Aboudy, Y.; Mendelson, E.; Shulman, L.; Nakagomi, T.; Nakagomi, O. Identification of Feline- and Canine-like Rotaviruses Isolated from Humans by Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. *J Clin Microbiol* 1993, 31, 1783–1787, doi:10.1128/jcm.31.7.1783-1787.1993.
- Wu, F.-T.; Bányai, K.; Lin, J.-S.; Wu, H.-S.; Hsiung, C.A.; Huang, Y.-C.; Hwang, K.-P.; Jiang, B.; Gentsch, J.R. Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12, 170–173, doi:10.1089/vbz.2011.0708.
- Yan, N.; Tang, C.; Kan, R.; Feng, F.; Yue, H. Genome Analysis of a G9P[23] Group A Rotavirus Isolated from a Dog with Diarrhea in China. *Infect Genet Evol* 2019, 70, 67–71, doi:10.1016/j.meegid.2019.02.020.
- Yan, N.; Yue, H.; Wang, Y.; Zhang, B.; Tang, C. Genomic Analysis Reveals G3P[13] Porcine Rotavirus A Interspecific Transmission to Human from Pigs in a Swine Farm with Diarrhoea Outbreak. *J Gen Virol* 2021, 102, doi:10.1099/jgv.0.001532.

### Astrovirus (AstV)

Il genoma (RNA) di AstV è stato riscontrato nei campioni di 8/51 cani in esame (15,68%; IC 95%: 7,02–28,59%), risultando uno dei virus maggiormente rilevati dopo il CPV-2 (64,70%) ed il CCoV (31,37%). I cani provenivano da quattro province del territorio regionale: n=4 da Palermo (id. 4,5,6 e 18), n=2 da Ragusa (id. 15 e 17), n=1 da Siracusa (id. 36) e n=1 da Catania (id. 44). Si trattava di soggetti giovani, di età compresa tra i 2 ed i 6 mesi (2 mesi=4; 3 mesi=1; 4 mesi=2; 6 mesi=1), di cui 5 meticcii ed 1 soggetto di razza, la maggior parte (n=5) randagi/accolti in canili sanitari rispetto ai soggetti di proprietà (n=3). Tutti i cani positivi mostravano segni clinici e lesioni riferibili ad una gastro-enterite grave con esito infausto. I soggetti risultati positivi mostravano in ogni caso co-infezioni con CPV-2 (n=6, tra cui n=4 con CPV-2c e n=2 con CPV-2b), con CCoV (n=1, con genotipo non determinato per scarsa quantità/qualità del genoma) o con entrambi CPV-2/CCoV (n=1, con un ceppo CPV-2 di origine vaccinale e con CCoV-I). I dettagli dei cani risultati positivi alla ricerca di AstV sono inclusi nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Dettagli dei cani AstV positivi.

Anno	Cane	Età	Provincia di origine	Tessuti AstV positivi	Altri virus identificati
2023	Id.4	2 mesi	Palermo	intestino	CPV-2c
	Id.5 <sup>a</sup>	4 mesi	Palermo	intestino	CPV-2b
	Id.6 <sup>a</sup>	4 mesi	Palermo	intestino	CPV-2b
	Id.15 <sup>b</sup>	3 mesi	Ragusa	intestino	CPV-2c
	Id.17 <sup>b</sup>	2 mesi	Ragusa	intestino	CPV-2c
	Id.18	2 mesi	Palermo	intestino	CCoV
2024	Id.36	6 mesi	Siracusa	intestino-polmone	CPV-2 (vacc)/CCoV-I
	Id.44	2 mesi	Catania	intestino	CPV-2c

**a, b:** soggetti rispettivamente provenienti dallo stesso luogo di origine.

Questi risultati evidenziano come gli AstV, ad oggi mai ricercati nei cani sul territorio regionale, mostrino (i) una diffusione territoriale ampia, essendo stati rilevati in cani da province ed in periodi diversi, (ii) la possibilità di essere rilevati in cani tra loro conviventi e (iii) la capacità di infettare soggetti giovani, con segni di grave gastro-enterite associata a coinfezioni da parvovirus e coronavirus enterico. Questi risultati rappresentano il primo contributo alle ricerche epidemiologiche in Sicilia e confermano i dati degli studi precedenti (Martella et al., 2011a, 2011b; Zhou et al., 2017; Boros et al., 2022), che hanno evidenziato astrovirus in cuccioli in coinfezione con CPV-2/CCoV.

Astrovirus sono stati individuati in campioni di intestino, come atteso, eccetto che per un cane (id. 36) risultato positivo anche nel campione di polmone che mostrava un quadro di grave polmonite. Astrovirus è noto principalmente per causare malattia gastrointestinale nei cani, principalmente con diarrea e vomito (Martella et al., 2011a, 2011b). Sebbene tradizionalmente associato all'apparato digerente, recenti ricerche suggeriscono che gli astrovirus nelle diverse specie possono colpire anche altri organi, tra cui il sistema nervoso centrale, il fegato e l'apparato respiratorio (Janowski, 2021). In particolare, per chiarire se anche per il cane sussiste un potenziale tropismo per l'apparato respiratorio, sarebbe opportuno approfondire

ulteriormente le ricerche con esami isto-patologici, per confermare l'associazione della positività ad astrovirus con le lesioni polmonari osservate.

È stato effettuato il sequenziamento Sanger di tutti gli amplificati (n=9), con la produzione di sequenze parziali della regione RdRp di buona qualità. L'identità nucleotidica reciproca tra le 9 sequenze in esame è risultata variabile tra il 99,4% ed il 76,3%, evidenziando minori tassi di identità con i ceppi di AstV dai cani id. 5 e 6. I ceppi dai cani che provenivano dallo stesso luogo di origine o da organi diversi dello stesso cane mostravano un'identità reciproca quasi completa (99,74%), con una sola sostituzione nucleotidica per ciascuna delle coppie di sequenze comparate. L'analisi di sequenza ha definito sulla base della regione RdRp che i ceppi di AstV identificati in questo studio erano correlati ai ceppi di astrovirus del cane (canine astrovirus) (Tassonomia ufficiale della International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) – specie: *Mamastrovirus canis* – virus: mamastrovirus 5, MAstV5). Secondo quanto indicato dall'ICTV, per una più dettagliata tipizzazione dei ceppi di AstV sarebbe opportuno comparare le identità tra i ceppi sulla base della ORF2, codificante per il capsido virale (Guix et al., 2012); questa comparazione non è stata effettuata in questo studio.

L'analisi delle sequenze ottenute ha messo in evidenza due mutazioni tra i ceppi dei sei cani (id. 4, 15, 17, 18, 36 e 44) caratterizzati da una maggiore identità nucleotidica reciproca (Asp273Val nei ceppi dei cani id. 17 e 44; His321Asn nel ceppo del cane id. 17) ed un numero maggiore di mutazioni nelle sequenze dei ceppi dei rimanenti due cani (id. 5 e 6) quando comparate alle precedenti (Ser272Ala, Asp273Lys, Arg292Lys, Glu303Asp, Asn307Asp, Thr309Tyr, Phe350Ile, Asn354Asp, Gln356Glu, Leu359Ala, Asn360Ser, Leu376Lys, Ile377Leu, Asn380Asp, Val382Asn, Glu383Thr, Leu387Ala, Lys390Arg), evidenziando quindi una moderata divergenza di questi ultimi due campioni.

Attraverso il confronto con le sequenze disponibili nei database di dominio pubblico, sono state evidenziate le più elevate identità nucleotidiche con ceppi Europei, individuati in Ungheria nel 2012 e nel 2021, in Gran Bretagna nel 2012 ed in Italia nel 2010, e con ceppi Asiatici, individuati in Thailandia nel 2022 ed in Cina nel 2019 e nel 2015. I dettagli sono riportati nella seguente Tabella 2.

**Tabella 2.** Identità nucleotidiche con ceppi AstV correlati.

<b>Cane</b>	<b>Identità (%)</b>	<b>Accession number</b>	<b>Paese ed anno di origine</b>	<b>Bibliografia</b>
Id.4	98,99%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	98,74%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>
	98,49%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
Id.5	97,52%	JN193534	Italia, 2010	<i>Martella et al., 2012</i>
	97,24%	KX599352	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
	96,98%	PQ423910	Thailandia, 2022	<i>Thaw et al., 2025</i>
Id.6	97,52%	JN193534	Italia, 2010	<i>Martella et al., 2012</i>
	97,49%	KX599352	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
	97,24%	PQ423910	Thailandia, 2022	<i>Thaw et al., 2025</i>
Id.15	99,50%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	99,25%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>
	98,99%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
Id.17	99,50%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	99,25%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>

	98,99%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
Id.18	98,23%	KX599351	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
	97,49%	MN882009	Cina, 2019	<i>Zhang et al., 2020</i>
	97,42%	KY271998	Cina, 2015	<i>Zhou et al., 2017</i>
Id.36 (int.)	99,75%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	99,50%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>
	99,25%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
Id.36 (pol.)	99,50%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	99,25%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>
	98,99%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>
Id.44	99,25%	ON733251	Ungheria, 2021	<i>Boros et al., 2022</i>
	98,99%	NC_026814	Gran Bretagna, 2012	<i>Caddy &amp; Goodfellow, 2015</i>
	98,74%	KX599349	Ungheria, 2012	<i>Mihalov-Kovács et al., 2017</i>

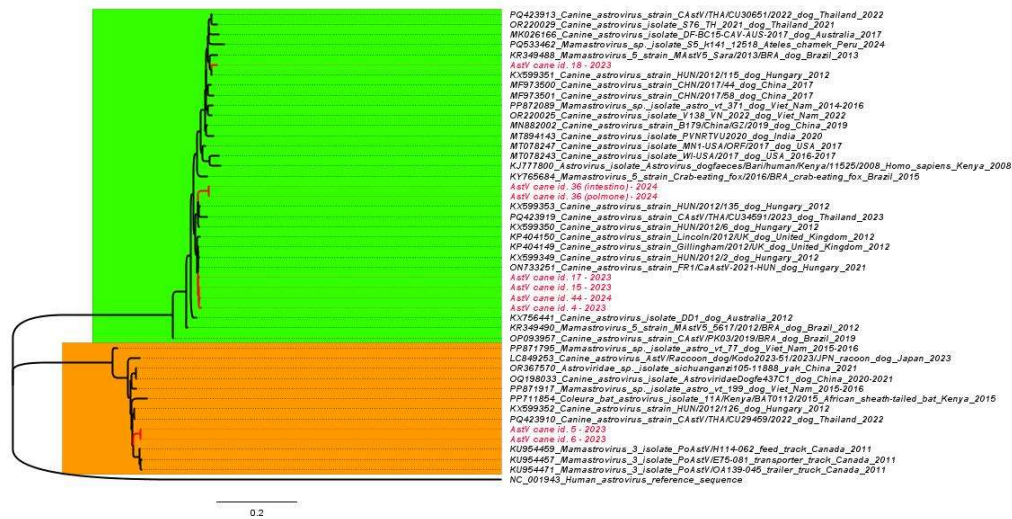
Al fine di valutare ulteriormente l'origine dei ceppi di AstV correlati, sono state prese in considerazione le sequenze dei database di dominio pubblico, selezionando un cut-off di correlazione uguale o superiore al 95% del frammento della regione RdRp (ORF1b). La maggior parte dei ceppi correlati sono stati identificati in cani di diverse nazioni di origine. Identità nucleotidiche di vario grado (97-95%) sono state osservate per la maggior parte dei ceppi di astrovirus di questo studio anche con ceppi identificati in acque reflue di depuratori (97,19-95,04%), canidi del Sud America (maikong - *Cerdocyon thous*) (96,23-95,48%) e nel guano di pipistrelli (95,92-95,04%). Invece, i ceppi dei cani id. 5 e 6 mostravano identità nucleotidiche con campioni prelevati in allevamenti industriali di suini del Canada (96,93-96,48%), campioni di intestino e di cervello di procioni in Corea del Sud (96,63%), campioni di microbioma intestinale di ruminanti (yak - *Bos grunniens*) (96,48-96,23%) e di primati (macaco rhesus - *Macaca mulatta*) (96,18%). Questi risultati, sebbene sembrino indicare una specie-specificità non esclusiva dei ceppi di astrovirus, necessitano di conferma attraverso l'analisi di sequenza della ORF2. Dettagli sono riportati in Tabella 3.

**Tabella 3.** Identità nucleotidiche >95% con ceppi di AstV di origine diversa dal cane.

Identità (%)	Accession number	Origine	Bibliografia
<b>Cani id. 4, 15, 17, 18, 36, 44</b>			
95,30-95,04%	MK966909 MK966914	Guano di pipistrelli - La Riunione, 2017	<i>Joffrin et al., 2021</i>
97,19-95,04%	KR007585	Reflui – Uruguay, 2011	<i>Lizasoain et al., 2015</i>
	OP696941	Reflui – Giappone, 2022	<i>Hoque et al., 2023</i>
	OP696937	Reflui – Giappone, 2021	
	OP696936	Reflui – Giappone, 2021	
	OP696935	Reflui – Giappone, 2021	
96,23-95,48%	KY765684	Maikong – Brasile, 2015	<i>Diniz Beduschi Travassos Alves et al., 2018</i>
<b>Cani id. 5 e 6</b>			
96,93-96,48%	KU954471	Camion suini – Canada, 2011	<i>Lachapelle et al., 2017</i>
	KU954460	Silos cereali – Canada, 2011	
	KU954459	Carro alimentazione – Canada, 2011	
	KU954457	Camion trasporto – Canada, 2011	
96,63%	OR043649	Intestino procione – Corea del Sud, 2018	<i>Chae et al., 2023</i>
	OR043648	Cervello procione – Corea del Sud, 2018	
96,48-96,23%	OR367570	Yak – Cina, 2021	<i>Lu et al., 2024</i>
96,16%	KT599577	Macaco rhesus – Bangladesh, 2013	<i>Anthony et al., 2015</i>

95,92%	KX702344	Guano di pipistrelli - Cina, 2015	Han et al., 2017
95,82%	OR752531	Guano di pipistrelli - La Riunione, 2017	Leong et al., 2025

L'analisi filogenetica nei confronti dei ceppi di riferimento (Figura 1), ha evidenziato che i ceppi di questo studio clusterizzavano in due separati clades: un primo che include un maggior numero di sequenze di ceppi identificati principalmente nei cani (oltre che in un maikong, in un primate - l'atele peruviano – ed in un campione di feci umane) ed un secondo, più ristretto, che include, oltre alle sequenze dei ceppi ottenuti dai cani id. 5 e 6, e quelle di ceppi collezionati da cani, da altre specie animali e da mezzi e strumenti di allevamenti industriali di suini.



**Figura 1.** Albero filogenetico costruito con metodo maximum likelihood, basato su 47 sequenze parziali della regione RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) degli Astrovirus. I rami includono le sequenze dei ceppi di astrovirus identificati in questo studio, evidenziati con il colore rosso ed inclusi nei due clades evidenziati in verde ed arancione, e le sequenze di riferimento, identificate con: accession number\_specie virus\_nome ceppo\_origine\_nazione\_anno. Per annotare e modificare l'albero filogenetico è stato utilizzato FigTree v.1.4.4.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno messo in evidenza la circolazione di ceppi di astrovirus associati a segni clinici/lesioni di gastro-enterite grave in cuccioli ed in co-infezione con CPV-2 e CCovV. Per quanto sia stata osservata una elevata identità tra la maggior parte dei ceppi in esame e ceppi virali precedentemente segnalati nell'intestino/feci di cani, alcuni degli AstV individuati in questo studio hanno mostrato (i) un certo grado di divergenza ed un'elevata similitudine con ceppi individuati anche in altre specie animali, domestiche e selvatiche, e (ii), in un caso, la presenza dell'RNA di AstV in tessuti extra-intestinali (polmone).

I ceppi divergenti identificati sono risultati correlati a ceppi virulenti in cani adulti (Martella et al., 2012), in carnivori selvatici (Chae et al., 2023) ed in specie animali prossime a quella umana, quali le scimmie (Anthony et al., 2015). Sono stati anche descritti nei pipistrelli, mammiferi noti per avere dato origine o

essere serbatoio di virus patogeni per l'uomo (*Han et al., 2017; Leong et al., 2025*). Questi ceppi e le loro caratteristiche appaiono ancora oggi poco indagate, necessitando quindi di ulteriori approfondimenti. Questi risultati confermano quindi un certo grado di eterogeneità dei ceppi di AstV circolanti nel cane e la possibilità che una parte di questi sia diffusa o possa essere trasmessa tra specie animali differenti. Pertanto, andrebbero determinate più specificamente le correlazioni tra gli astrovirus delle differenti specie animali e la loro patobiologia.

### Bibliografia

- Anthony, S.J.; Islam, A.; Johnson, C.; Navarrete-Macias, I.; Liang, E.; Jain, K.; Hitchens, P.L.; Che, X.; Soloyvov, A.; Hicks, A.L.; et al. Non-Random Patterns in Viral Diversity. *Nat Commun* 2015, 6, 8147, doi:10.1038/ncomms9147.
- Boros, Á.; Albert, M.; Urbán, P.; Herczeg, R.; Gáspár, G.; Balázs, B.; Cságola, A.; Pankovics, P.; Gyenesei, A.; Reuter, G. Unusual “Asian-Origin” 2c to 2b Point Mutant Canine Parvovirus (Parvoviridae) and Canine Astrovirus (Astroviridae) Co-Infection Detected in Vaccinated Dogs with an Outbreak of Severe Haemorrhagic Gastroenteritis with High Mortality Rate in Hungary. *Vet Res Commun* 2022, 46, 1355–1361, doi:10.1007/s11259-022-09997-2.
- Caddy, S.L.; Goodfellow, I. Complete Genome Sequence of Canine Astrovirus with Molecular and Epidemiological Characterisation of UK Strains. *Vet Microbiol* 2015, 177, 206–213, doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.011.
- Chae, S.-B.; Jeong, C.-G.; Park, J.-S.; Na, E.-J.; Oem, J.-K. Detection and Genetic Characterization of Astroviruses in Brain Tissues of Wild Raccoon Dogs. *Viruses* 2023, 15, 1488, doi:10.3390/v15071488.
- Diniz Beduschi Travassos Alves, C.; da Fontoura Budaszewski, R.; Cibulski, S.P.; Nunes Weber, M.; Quoos Mayer, F.; Viezzer Bianchi, M.; Zafalon-Silva, B.; Konradt, G.; Slaviero, M.; Sonne, L.; et al. Mamastrovirus 5 Detected in a Crab-Eating Fox (*Cerdocyon Thous*): Expanding Wildlife Host Range of Astroviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018, 58, 36–43, doi:10.1016/j.cimid.2018.08.002.
- Guix, S.; Bosch, A.; Pintó, R.M. Astrovirus Taxonomy. In: Schultz-Cherry, S. (eds) *Astrovirus Research*. Springer, New York, NY. 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4735-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4735-1_6)
- Han, H.-J.; Wen, H.-L.; Zhao, L.; Liu, J.-W.; Luo, L.-M.; Zhou, C.-M.; Qin, X.-R.; Zhu, Y.-L.; Liu, M.-M.; Qi, R.; et al. Novel Coronaviruses, Astroviruses, Adenoviruses and Circoviruses in Insectivorous Bats from Northern China. *Zoonoses Public Health* 2017, 64, 636–646, doi:10.1111/zph.12358.
- Hoque, S.A.; Kotaki, T.; Pham, N.T.K.; Onda, Y.; Okitsu, S.; Sato, S.; Yuki, Y.; Kobayashi, T.; Maneekarn, N.; Kiyono, H.; et al. Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. *Food Environ Virol* 2023, 15, 176–191, doi:10.1007/s12560-023-09553-4.
- Janowski, A.B. Beyond the Gastrointestinal Tract: The Emerging and Diverse Tissue Tropisms of Astroviruses. *Viruses* 2021, 13, 732, doi:10.3390/v13050732.
- Joffrin, L.; Hoarau, A.O.G.; Lagadec, E.; Köster, M.; Ramanantsalama, R.V.; Mavingui, P.; Lebarbenchon, C. Astrovirus in Reunion Free-Tailed Bat (*Mormopterus Francoismoutoui*). *Viruses* 2021, 13, 1524, doi:10.3390/v13081524.
- Lachapelle, V.; Letellier, A.; Fravallo, P.; Brassard, J.; L’Homme, Y. Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as Molecular Markers. *Appl Environ Microbiol* 2017, 83, e03187-16, doi:10.1128/AEM.03187-16.
- Leong, R.; Hoarau, A.O.G.; Carcauzon, V.; Köster, M.; Dietrich, M.; Tortosa, P.; Lebarbenchon, C. High Astrovirus Diversity in an Endemic Bat Species Suggests Multiple Spillovers from Synanthropic Rodents and Birds. *J Virol* 2025, 99, e0135724, doi:10.1128/jvi.01357-24.
- Lizasoain, A.; Tort, L.F.L.; García, M.; Gómez, M.M.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P.; Cristina, J.; Berois, M.; Colina, R.; Victoria, M. Sewage Surveillance Reveals the Presence of Canine GVII Norovirus and Canine Astrovirus in Uruguay. *Arch Virol* 2015, 160, 2839–2843, doi:10.1007/s00705-015-2571-3.
- Lu, X.; Gong, G.; Zhang, Q.; Yang, S.; Wu, H.; Zhao, M.; Wang, X.; Shen, Q.; Ji, L.; Liu, Y.; et al. Metagenomic Analysis Reveals High Diversity of Gut Viromes in Yaks (*Bos Grunniens*) from the Qinghai-Tibet Plateau. *Commun Biol* 2024, 7, 1097, doi:10.1038/s42003-024-06798-y.

- Martella, V.; Moschidou, P.; Catella, C.; Larocca, V.; Pinto, P.; Losurdo, M.; Corrente, M.; Lorusso, E.; Bányai, K.; Decaro, N.; et al. Enteric Disease in Dogs Naturally Infected by a Novel Canine Astrovirus. *J Clin Microbiol* 2012, 50, 1066–1069, doi:10.1128/JCM.05018-11.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Buonavoglia, C. Astroviruses in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011a, 41, 1087–1095, doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.001.
- Martella, V.; Moschidou, P.; Lorusso, E.; Mari, V.; Camero, M.; Bellacicco, A.; Losurdo, M.; Pinto, P.; Desario, C.; Bányai, K.; et al. Detection and Characterization of Canine Astroviruses. *J Gen Virol* 2011b, 92, 1880–1887, doi:10.1099/vir.0.029025-0.
- Mihalov-Kovács, E.; Martella, V.; Lanave, G.; Bodnar, L.; Fehér, E.; Marton, S.; Kemenesi, G.; Jakab, F.; Bányai, K. Genome Analysis of Canine Astroviruses Reveals Genetic Heterogeneity and Suggests Possible Inter-Species Transmission. *Virus Res* 2017, 232, 162–170, doi:10.1016/j.virusres.2016.12.005.
- Thaw, Y.N.; Charoenkul, K.; Nasamran, C.; Chamsai, E.; Jairak, W.; Phyu, E.M.; Phyu, H.W.; Chaiyawong, S.; Amonsin, A. Monitoring and Characterization of Canine and Feline Astroviruses in Domestic Dogs and Cats in Thailand. *Sci Rep* 2025, 15, 18293, doi:10.1038/s41598-025-03037-0.
- Zhang, W.; Wang, R.; Liang, J.; Zhao, N.; Li, G.; Gao, Q.; Su, S. Epidemiology, Genetic Diversity and Evolution of Canine Astrovirus. *Transbound Emerg Dis* 2020, 67, 2901–2910, doi:10.1111/tbed.13663.
- Zhou, H.; Liu, L.; Li, R.; Qin, Y.; Fang, Q.; Balasubramaniam, V.R.; Wang, G.; Wei, Z.; Ouyang, K.; Huang, W.; et al. Detection and Genetic Characterization of Canine Astroviruses in Pet Dogs in Guangxi, China. *Virol J* 2017, 14, 156, doi:10.1186/s12985-017-0823-4.

### **Hepatitis E virus (HEV)**

Il genoma (RNA) di HEV non è stato riscontrato in alcuno dei campioni in esame. Pertanto, allo stato attuale, il cane non sembrerebbe rivestire un ruolo attivo nella trasmissione/diffusione di questo virus patogeno per l'uomo. In particolare, HEV oggi rappresenta in medicina umana un rilevante patogeno a livello mondiale, causando ogni anno oltre tre milioni di casi di epatite acuta. In Italia, nel corso del 2024, sono stati segnalati 70 casi di epatite E, principalmente verificatisi nelle regioni Abruzzo e Lombardia, con un trend delle curve di incidenza in aumento a partire dal 2020 (ISS, <https://www.epicentro.iss.it/epatite/dati-seieva#e>). Si trasmette attraverso un ciclo oro-fecale e sono comunemente considerate fonti di infezione l'ingestione di cibi non cotti o di acque contaminate (WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>). Nei pazienti immunosoppressi, la malattia può progredire in epatite cronica e cirrosi.

Ad oggi, all'interno dell'unico sierotipo noto, si riconoscono 4 genotipi maggiori di HEV che causano malattia nell'uomo (genotipi 1-4) e 24 sub-genotipi (rispettivamente cinque (a-e), due (a-b), dieci (a-j) e sette (a-g) per ciascun genotipo) (Lu et al., 2006): mentre i genotipi 1 e 2 determinano infezione primariamente nell'uomo, i genotipi 3 e 4 trovano il loro principale reservoir negli animali, causando occasionalmente infezione nell'uomo, principalmente attraverso l'assunzione di cibo contaminato o, verosimilmente, anche dall'ambiente (WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>). Infatti, i genotipi 3 e 4 sono stati identificati sia in animali domestici (suini, ruminanti, conigli) o selvatici (cinghiali, piccoli roditori come i topi), che in prodotti alimentari a base di carne di suidi domestici o selvatici cruda o poco cotta (Izopet et al., 2019; Zahmanova et al., 2023). Tra questi ultimi, il genotipo 3 di HEV è quello più diffuso in Europa (Izopet et al., 2019). Le vie di trasmissione dagli animali all'uomo maggiormente definite sono quelle legate al consumo di carne di suidi domestici e selvatici, ruminanti selvatici o carne e latte di camelidi, in aree geografiche dove vengono comunemente consumati (Izopet et al., 2019). La diffusione di HEV in altre specie animali domestiche e quindi la loro potenzialità di agire come reservoir del virus come anche le eventuali vie di trasmissione, restano ancora da definire, in particolare nei cani e nei gatti quali animali da compagnia che condividono l'ambiente domestico con l'uomo. È solo dall'ultimo decennio che si è cominciato a ricercare l'infezione in queste specie, basandosi sia su tecniche sierologiche per la ricerca di anticorpi anti-HEV sia su tecniche di biologia molecolare.

Questi studi hanno quindi determinato la presenza di anticorpi anti-HEV, o agenti antigenicamente correlati, in campioni prelevati da animali domestici diversi dal suino, quali bovini, pecore, capre, cavalli, gatti e cani (Thiry et al., 2017). Tra questi, alcuni studi sierologici sono stati condotti specificatamente nel cane, evidenziando tassi di sieropositività variabile. Per l'origine dell'infezione sono state formulate varie ipotesi, come ad esempio l'ingestione di avanzi di cucina oppure di alimenti crudi di origine animale contaminati (Arankalle et al., 2001; Liu et al., 2009; Liang et al., 2014; McElroy et al., 2015). Anche in Italia alcuni studi hanno determinato la sieroprevalenza di HEV nei cani (Bernardini et al., 2022; Ferrara et al., 2024). I dati basati sulla sola sieropositività degli animali domestici, sebbene suggestivi dell'esposizione al virus in queste specie, rimangono tuttavia inconclusivi nel chiarirne il ruolo (Kenney, 2019).

L'indagine virologica attraverso saggi di RT-PCR consente di determinare la presenza dell'RNA di HEV nei campioni in esame. Dei pochi studi precedenti, nessuno ha identificato l'RNA di HEV in campioni di intestino o nel contenuto intestinale dei cani (Azevedo et al., 2024; Caballero-Gómez et al., 2022; Ferrara et al., 2024; Liu et al., 2009; Shun et al., 2024; Veronesi et al., 2021). Per lo studio qui condotto è stata utilizzato un saggio di RT-PCR in grado di identificare tutti i genotipi di HEV ("pan-orthohepeviruses") e, attraverso l'esame di sequenza, determinare a quale genotipo appartiene il ceppo (Drexler et al., 2012). Questo saggio di RT-PCR è anche utilizzato in letteratura per la ricerca dell'RNA di HEV in alimenti di origine animale, pertanto utile come saggio di screening per questo target virale. Il risultato negativo in questo studio è quindi in linea con quanto già riportato in letteratura, corroborando l'ipotesi di un ruolo nullo del cane come specie ospite di HEV o nella sua trasmissione verso altri animali o l'uomo.

Il rilievo di HEV in carnivori selvatici come le volpi, che condividono con il cane uno spettro di patogeni di origine virale comuni, è stato ricondotto all'ingestione da parte di questi animali di prede come, ad esempio, i ratti (Bodewes et al., 2013; Lanszki et al., 2020). Anche in Italia è stata recentemente descritta l'evidenza di un ceppo di HEV da carnivori selvatici, nello specifico da un campione intestinale di lupo ritrovato morto a seguito di un trauma da collisione con un'automobile, appartenente al genotipo 3, sottotipo c, e correlato ai ceppi circolanti in suidi domestici e selvatici del territorio di origine (Sarchese et al., 2021). Anche questo risultato è stato ricondotto all'attività predatoria dell'animale verso altre specie con infezione attiva, quali suidi o ruminanti.

Questo studio, in relazione alla bibliografia corrente, suggerisce quindi un ruolo verosimilmente irrilevante del cane come ospite naturale e nella trasmissione di HEV, in particolare all'uomo. L'evidenza di HEV nel tratto intestinale di carnivori selvatici (verosimilmente conseguenza del naturale comportamento alimentare di predazione) suggerirebbe la possibilità di potere potenzialmente rilevare l'HEV a seguito dell'ingestione di alimenti a base di carne non cotta di altri animali naturalmente infetti. Questa ipotesi però non trova attualmente riscontro, non essendo specificatamente indagati quei cani che hanno accesso a questi alimenti. Occorre notare che il campionamento di convenienza di cani randagi utile a questo studio ha offerto la possibilità di testare campioni di animali le cui risorse alimentari non sono note e che vivono in aree urbanizzate, notoriamente popolate da specie sinantropiche suscettibili come topi e ratti, quindi potenziale riflesso dell'ambiente che popolano. Queste attività di sorveglianza rimangono pertanto determinanti per sviluppare strategie di controllo basate sulle evidenze.

### Bibliografia

- Arankalle, V.A.; Joshi, M.V.; Kulkarni, A.M.; Gandhe, S.S.; Chobe, L.P.; Rautmare, S.S.; Mishra, A.C.; Padbidri, V.S. Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus Antibodies in Different Indian Animal Species. *J Viral Hepat* 2001, 8, 223–227, doi:10.1046/j.1365-2893.2001.00290.x.
- Azevedo, L.S. de; Silva, V.C.M.; Guiducci, R.; Guadagnucci, S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Lopes, R.D.; da Costa, A.C.; Cunha, L.; Lemos, M.F.; et al. Emerging Zoonanthroponotic Risks: Detection of the Human Norovirus GII.4 Sydney[P31] Strain in a Domestic Dog in Brazil. *Acta Trop* 2024, 260, 107449, doi:10.1016/j.actatropica.2024.107449.
- Bernardini, A.; Pacini, M.I.; Fonti, N.; Forzan, M.; Marchetti, V.; Mazzei, M. Serological, Virological Investigation and Hepatic Injury Evaluation for Hepatitis E Virus in Hunting Dogs. *Pathogens* 2022, 11, 1123, doi:10.3390/pathogens11101123.

- Bodewes, R.; van der Giessen, J.; Haagmans, B.L.; Osterhaus, A.D.M.E.; Smits, S.L. Identification of Multiple Novel Viruses, Including a Parvovirus and a Hepevirus, in Feces of Red Foxes. *J Virol* 2013, 87, 7758–7764, doi:10.1128/JVI.00568-13.
- Caballero-Gómez, J.; Rivero-Juarez, A.; Jurado-Tarifa, E.; Jiménez-Martín, D.; Jiménez-Ruiz, E.; Castro-Scholten, S.; Ulrich, R.G.; López-López, P.; Rivero, A.; García-Bocanegra, I. Serological and Molecular Survey of Hepatitis E Virus in Cats and Dogs in Spain. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 240–248, doi:10.1111/tbed.14437.
- Drexler, J.F.; Seelen, A.; Corman, V.M.; Fumie Tateno, A.; Cottontail, V.; Melim Zerbinati, R.; Gloza-Rausch, F.; Klose, S.M.; Adu-Sarkodie, Y.; Oppong, S.K.; et al. Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *J Virol* 2012, 86, 9134–9147, doi:10.1128/JVI.00800-12.
- Ferrara, G.; Pagnini, U.; Improda, E.; Ciarcia, R.; Parisi, A.; Fiorito, F.; Della Valle, G.; Iovane, G.; Montagnaro, S. Detection of Anti-HEV Antibodies but No Molecular Positivity in Dogs in the Campania Region, Southern Italy. *One Health* 2024, 18, 100724, doi:10.1016/j.onehlt.2024.100724.
- Izopet, J.; Tremeaux, P.; Marion, O.; Miguères, M.; Capelli, N.; Chapuy-Regaud, S.; Mansuy, J.-M.; Abravanel, F.; Kamar, N.; Lhomme, S. Hepatitis E Virus Infections in Europe. *J Clin Virol* 2019, 120, 20–26, doi:10.1016/j.jcv.2019.09.004.
- Kenney, S.P. The Current Host Range of Hepatitis E Viruses. *Viruses* 2019, 11, 452, doi:10.3390/v11050452.
- Lanszki, Z.; Kurucz, K.; Zeghib, S.; Kemenesi, G.; Lanszki, J.; Jakab, F. Identification of Hepatitis E Virus in the Feces of Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). *Animals (Basel)* 2020, 10, 1841, doi:10.3390/ani10101841.
- Liang, H.; Chen, J.; Xie, J.; Sun, L.; Ji, F.; He, S.; Zheng, Y.; Liang, C.; Zhang, G.; Su, S.; et al. Hepatitis E Virus Serosurvey among Pet Dogs and Cats in Several Developed Cities in China. *PLoS One* 2014, 9, e98068, doi:10.1371/journal.pone.0098068.
- Liu, J.; Zhang, W.; Shen, Q.; Yang, S.; Huang, F.; Li, P.; Guo, X.; Yang, Z.; Cui, L.; Zhu, J.; et al. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Pet Dogs in the Jiang-Zhe Area of China. *Scand J Infect Dis* 2009, 41, 291–295, doi:10.1080/00365540902767031.
- Lu, L.; Li, C.; Hagedorn, C.H. Phylogenetic Analysis of Global Hepatitis E Virus Sequences: Genetic Diversity, Subtypes and Zoonosis. *Rev Med Virol* 2006, 16, 5–36, doi:10.1002/rmv.482.
- McElroy, A.; Hiraide, R.; Bexfield, N.; Jalal, H.; Brownlie, J.; Goodfellow, I.; Caddy, S.L. Detection of Hepatitis E Virus Antibodies in Dogs in the United Kingdom. *PLoS One* 2015, 10, e0128703, doi:10.1371/journal.pone.0128703.
- Sarchese, V.; Fruci, P.; Palombieri, A.; Di Profio, F.; Robetto, S.; Ercolini, C.; Orusa, R.; Marsilio, F.; Martella, V.; Di Martino, B. Molecular Identification and Characterization of a Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) Strain Detected in a Wolf Faecal Sample, Italy. *Animals (Basel)* 2021, 11, 3465, doi:10.3390/ani11123465.
- Shun, E.H.-K.; Situ, J.; Tsoi, J.Y.-H.; Wu, S.; Cai, J.; Lo, K.H.-Y.; Chew, N.F.-S.; Li, Z.; Poon, R.W.-S.; Teng, J.L.-L.; et al. Rat Hepatitis E Virus (Rocahepevirus Ratti) Exposure in Cats and Dogs, Hong Kong. *Emerg Microbes Infect* 2024, 13, 2337671, doi:10.1080/22221751.2024.2337671.
- Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) - Istituto Superiore di Sanità (ISS). <https://www.epicentro.iss.it/epatite/dati-seieva#e>
- Thiry, D.; Mauroy, A.; Pavo, N.; Purdy, M.A.; Rose, N.; Thiry, E.; de Oliveira-Filho, E.F. Hepatitis E Virus and Related Viruses in Animals. *Transbound Emerg Dis* 2017, 64, 37–52, doi:10.1111/tbed.12351.
- Veronesi, R.; Morach, M.; Hübschke, E.; Bachofen, C.; Stephan, R.; Nüesch-Inderbinen, M. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Dogs in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 2021, 68, 8–11, doi:10.1111/zph.12779.
- WHO Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- Zahmanova, G.; Takova, K.; Tnova, V.; Koynarski, T.; Lukov, L.L.; Minkov, I.; Pishmisheva, M.; Kotsev, S.; Tsachev, I.; Baymakova, M.; et al. The Re-Emergence of Hepatitis E Virus in Europe and Vaccine Development. *Viruses* 2023, 15, 1558, doi:10.3390/v15071558.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Questo studio ha focalizzato l'attenzione sulle infezioni da virus classici ed emergenti del cane nel territorio della regione Sicilia, con lo scopo di fornire dati utili da confrontare con lo scenario internazionale.

I risultati della ricerca hanno confermato l'evidenza di positività in soggetti di giovane età e con segni clinici/lesioni *post-mortem* di enterite/epatite. La positività associata alla giovane età è un dato già abbastanza consolidato, considerato che vari fattori, tra cui immaturità del sistema immunitario, stato vaccinale, condizioni di gestione e trasporto, infestazioni parassitarie o altri stressor, possono favorire le infezioni virali (Cardillo *et al.*, 2020). Questo studio ha incluso i campioni da cani randagi od ospitati presso i presidi sanitari pubblici o privati, offrendo un campione di una parte della popolazione canina che sarebbe opportuno monitorare maggiormente. Difatti, questa popolazione di cani rappresenta uno specchio della circolazione dei virus sul territorio. Tali animali, quindi, possono essere considerati come potenziali sentinelle dei virus presenti negli ambienti frequentati anche da altre popolazioni animali suscettibili, uomo compreso, in particolare le figure che si occupano della gestione e l'assistenza dei cani randagi. Se per alcuni di questi virus sono state evidenziati possibili motivazioni della persistenza della circolazione virale nonostante l'estensivo ricorso alla profilassi vaccinale (Decaro *et al.*, 2020) – tra cui resistenza ambientale intrinseca di alcuni (es., parvovirus, coronavirus), fenomeni di spillover/spillback nei confronti di ospiti serbatoio della fauna selvatica, insufficiente copertura vaccinale o fallimenti di induzione dell'immunità acquisita –, occorre considerare che gli stessi fattori trovano maggiore significatività nei territori dove sono presenti ampie popolazioni di cani randagi che mantengono/diffondono i virus nel territorio. Inoltre, sarebbero da chiarire gli effetti di interazione diretta ed indiretta tra le popolazioni dei cani vaganti e quelle di animali selvatici, i quali agiscono da serbatoi o vettori di agenti patogeni (Bryce, 2021). Il costante rilievo di agenti virali nel cane ed in molte specie di animali selvatici suscettibili (Balboni *et al.*, 2013; Calatayud *et al.*, 2020; Canuti *et al.*, 2025; Costanzi *et al.*, 2021; Guercio *et al.*, 2023; Leopardi *et al.*, 2022; Mira *et al.*, 2018a; Ndiana *et al.*, 2022), principalmente carnivori, sottolinea il rischio persistente di trasmissione interspecie e la diffusione, diretta o indiretta, di questi agenti patogeni, rimanendo indefinita quale tra queste popolazioni possa essere considerata quella reservoir.

Tra i virus indagati, il parvovirus del cane di tipo 2 (CPV-2) è stato quello maggiormente rilevato, da solo ed in associazione con gli altri virus ricercati. Lo studio sul CPV-2 evidenzia non solo la sua continua persistenza sul territorio ma anche i cambiamenti sopraggiunti recentemente nel suo genoma e nella sua distribuzione geografica, talvolta in grado di condizionare la sua epidemiologia. Gli esempi più significativi sono stati offerti dalla ulteriore dimostrazione della diffusione e persistenza del lineage "Asiatico" della variante CPV-2c, di origine più recente rispetto alla prima variante CPV-2c segnalata in Europa (Buonavoglia *et al.*, 2001; Franzo *et al.*, 2023; Martella *et al.*, 2006a) che, similmente a questa, ha avuto una rapida diffusione globale (Franzo *et al.*, 2023), talvolta diventando il genotipo prevalente subito dopo la sua introduzione, come osservato proprio in Sicilia (Mira *et al.*, 2024a). Altri esempi sono l'evidenza (Mira *et al.*, 2025) dell'introduzione in Sicilia dalle coste del Nord Africa di un ceppo di CPV-2b divergente

dai comuni CPV-2b circolanti in Europa e correlato a ceppi di origine asiatica, più recentemente rilevati in nazioni del Medio Oriente, e di un ceppo di CPV-2b (Schirò *et al.*, 2022) correlato ai ceppi asiatici, contemporaneamente rilevato nell'est Europa (Boros *et al.*, 2022; Pelegrinovà *et al.*, 2024). Questi dati sottolineano la costante evoluzione del parvovirus del cane di tipo 2 e della sua epidemiologia, condizionata dalle caratteristiche di resistenza intrinseca del virus che favoriscono la persistenza ambientale e la trasmissione indiretta tramite fomite, ma anche e soprattutto dalla trasmissione diretta tra cani e dal trasporto di cani a lunga distanza (Mira *et al.*, 2018b; Urbani *et al.*, 2022), un *driver* questo che necessita di maggiore monitoraggio e che appare rilevante anche per diversi virus (Decaro *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2006b; Mesquita & Nascimento, 2012).

Un altro virus isolato frequentemente nei campioni in esame è stato il coronavirus, di cui ancora oggi risultano limitati i dati epidemiologici in Italia. I risultati qui ottenuti (Mira *et al.*, 2024b) indicano che il genotipo I (CCoV-I) risulta essere quello maggiormente rilevato nel cane, come osservato nei pochi altri studi epidemiologici in altre nazioni (Ntafis *et al.*, 2013; Sha *et al.*, 2022), e pertanto verso questo andrebbero rivolte maggiori ed ulteriori attenzioni. Inoltre, l'evidenza di un caso di co-infezione tra due ceppi di CCoV, di cui uno appartenente al genotipo I ed un altro appartenente al genotipo II ma divergente dai classici ceppi virali di questo genotipo e simile ad altri ceppi CCoV ricombinanti, pone l'attenzione sulle potenziali sinergie tra ceppi virali dello stesso genere e sui possibili eventi di ricombinazione dei coronavirus del cane. La ricombinazione, insieme all'alto tasso di mutazioni, rappresenta un meccanismo evolutivo dei coronavirus, che potrebbe dare origine a virus con nuove caratteristiche, ad *escape-mutants* o nuove varianti virali. Inoltre, la recente comparsa del SARS-CoV-2 (un betacoronavirus) ed il rilievo nell'uomo di casi clinici di malattia associata a distinte varianti del CCoV (alphacoronavirus) (Lednicky *et al.*, 2022; Vlasova *et al.*, 2022) sottolineano ancora una volta come gli eventi di ricombinazione ed i salti di specie nel mondo animale possano dare origine a nuovi coronavirus trasmissibili all'uomo, sottolineando la necessità del monitoraggio dei coronavirus nel mondo animale, comprendendo il cane, al fine di valutare il suo ruolo come serbatoio o ospite intermedio di nuovi ceppi virali (Decaro *et al.*, 2021; Licitra *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2022). Inoltre, l'emergere di un nuovo virus (Attipa *et al.*, 2025) ricombinante tra FCoV e CCoV (ceppo FCoV-23), responsabile di un'epidemia di peritonite infettiva felina originatasi a Cipro nel 2023 (Attipa *et al.*, 2023; Warr *et al.*, 2023), rappresenta un altro esempio di ricombinazione tra questi due virus, già strettamente correlati tra loro e che continuano a dare origine a nuove varianti altamente patogene. Pertanto, il monitoraggio dei coronavirus nel cane resta prioritario anche come utile modello di studio del virus.

Questo studio ha confermato il rilievo, sebbene con tassi di positività bassi, di norovirus noti della specie ed escluso la presenza di genotipi causa di malattia nell'uomo, altri precedenti studi di sorveglianza sanitaria hanno evidenziato che determinate categorie professionali, come chi opera nell'ambito della clinica degli animali da compagnia, possa essere esposto al norovirus del cane (Mesquita *et al.*, 2013) e, per tale motivo, il monitoraggio dei diversi genotipi di norovirus è da suggerire negli studi successivi. La stretta correlazione tra NoV del cane e quelli dell'uomo indica una probabile co-evoluzione di questi virus (Di Martino *et al.*,

2017), rendendo pertanto ancora necessaria la definizione di potenziali salti di specie. Inoltre, i norovirus del cane dei genogruppi IV e VI possono interagire con gli antigeni HBGA (histo-blood group antigens), similmente a quanto osservato per i ceppi di norovirus umani, mostrando quindi ulteriori elementi sulla probabile co-evoluzione e sul potenziale di infezione (Huang et al., 2005; Caddy et al., 2014). Questa stretta correlazione ed il rilievo di anticorpi verso NoV eterologhi ha anche allertato circa il rischio di potenziali ricombinazioni, con l'emersione di ceppi con nuove caratteristiche di virulenza, per cui si renderebbe necessario un costante monitoraggio dei ceppi circolanti (Caddy et al., 2015). Pertanto, anche questo studio sottolinea la necessità della ricerca del norovirus attraverso routinari screening diagnostici delle enteriti del cane, in particolare per quegli animali che vivono o lavorano a stretto contatto con persone fragili (es., cani co-terapeuti negli interventi assistiti o IAA).

L'evidenza di rotavirus nel cane, seppur limitata dalla mancata genotipizzazione dei ceppi individuati in questo studio, parimenti sottolinea la necessità di approfondire gli studi e di mantenere un monitoraggio sanitario attivo su questo virus negletto, dato che è chiara e documentata l'evenienza di infezioni da rotavirus del ceppo G3P[3], il ceppo virale più frequentemente rilevato nel cane, in soggetti umani di giovane età (De Grazia et al., 2007; Luchs et al., 2012; Wu et al., 2012). Di fatto gli studi epidemiologici e clinici sul territorio nazionale risultano ancora limitati, ma i dati di questa ricerca contribuiscono ad integrare le necessarie conoscenze di base.

Anche gli astrovirus rilevati hanno mostrato caratteristiche di interesse. Difatti:

- (i) è stata rilevata una modesta eterogeneità dei ceppi di astrovirus nel cane. Alcuni dei ceppi in esame sono risultati correlati a ceppi rilevati da altri Autori in altre matrici o altri campioni biologici animali (Diniz Beduschi Travassos Alves et al., 2015; Joffrin et al., 2021; Lizasoain et al., 2015) diversi dal cane, suggerendo la necessità di approfondire gli studi, per meglio comprendere se il cane possa avere un ruolo biologico nella loro diffusione o trasmissione;
- (ii) un paio di ceppi virali, quasi identici tra loro, sono riferibili ad una nicchia di ceppi di astrovirus già segnalati nel cane in altri paesi Europei e, più recentemente, in altri mammiferi, tra cui pipistrelli e primati (Anthony et al., 2015; Han et al., 2017; Leong et al., 2025). Pertanto, occorre valutare la specie-specificità di questi ceppi e valutare eventuali mutazioni o eventi di ricombinazione negli ospiti di rilievo;
- (iii) la positività di un campione di tessuto polmonare pone nuovamente l'attenzione sul tropismo d'organo degli astrovirus e la necessità di approfondire le correlazioni con i segni clinici e le eventuali lesioni d'organo osservate.

Infine, i risultati negativi della ricerca del HEV nei campioni in esame confermano quanto già osservato in altri studi. La positività ai test sierologici (Bernardini et al., 2022; Ferrara et al., 2024) è suggestiva del contatto del cane con il virus, sebbene il costante rilievo negativo alla ricerca del genoma virale (Azevedo et al., 2024; Caballero-Gómez et al., 2022; Ferrara et al., 2024; Liu et al., 2009; Shun et al., 2024; Veronesi et al., 2021) suggerisca di definire verosimilmente irrilevante il ruolo del cane nella diffusione/trasmmissione

di HEV. Pertanto, alla luce dei dati disponibili, il cane non appare essere un valido modello di studio per questo virus a tropismo epatico, molto rilevante in sanità pubblica.

Questo studio ha utilizzato un approccio multi-target, consentendo a partire dallo stesso campione di identificare i diversi virus presi in considerazione, da cani con un comune sospetto clinico o anatomopatologico e con segni clinici e lesioni sovrapponibili. Questo approccio, che include differenti patogeni target alla base di manifestazioni cliniche con segni comuni (nella medicina umana definiti anche “test sindromici”), ha offerto la possibilità di determinare in maggiore dettaglio quali virus fossero presenti e di valutare la correlazione o le eventuali differenze nei soggetti con infezioni virali singole o miste, nella morbilità/mortalità e nella gravità dei segni clinici e delle lesioni: questo approccio può pertanto contribuire a determinare il reale impatto clinico di questi virus. Questo approccio diagnostico e di studio potrebbe rappresentare un modello utile, soprattutto in quei contesti ambientali potenzialmente a maggiore rischio di diffusione dei virus tra cani (ad esempio, in contesti “multi-ospite” quali canili, allevamenti, rifugi, ospedali veterinari), in popolazioni canine soggette a movimentazione o stressors, o per quei cani a stretto contatto con l’uomo, in particolare con persone fragili.

In conclusione, questo studio definisce la rilevanza del cane come modello di studio di virus a tropismo enterico ed epatico, classici ed emergenti, proponendo l’eleggibilità di questa specie per approfondire alcune conoscenze e dati che necessitano di una maggiore definizione. I cani sono ubiquitari, suscettibili ad un ampio range di infezioni, talune rilevanti anche per l’uomo, consentendo una facilità di campionamento, anche passivo, e di monitoraggio utili a sviluppare strategie di sorveglianza nei confronti di determinati patogeni (*Cleaveland et al., 2001*). Inoltre, le popolazioni di cani liberi possono rappresentare un campione dell’ambiente e delle comunità in cui vivono (*Cleaveland et al., 2001*). Investimenti strategici e sostegni futuri nel biobanking di risorse biologiche e dei dati associati (*Mira et al., 2021*) e nello sviluppo di strumenti di ricerca specie-specifici sono inoltre essenziali per realizzare appieno il potenziale traslazionale dei modelli basati su gli animali domestici (*Pramond et al., 2025*).

### Bibliografia

- Anthony, S.J.; Islam, A.; Johnson, C.; Navarrete-Macias, I.; Liang, E.; Jain, K.; Hitchens, P.L.; Che, X.; Soloyov, A.; Hicks, A.L.; et al. Non-Random Patterns in Viral Diversity. *Nat Commun* 2015, 6, 8147, doi:10.1038/ncomms9147.
- Attipa, C.; Gunn-Moore, D.; Mazeri, S.; Epaminondas, D.; Lyraki, M.; Hardas, A.; Loukaidou, S.; Gentil, M. Concerning Feline Infectious Peritonitis Outbreak in Cyprus. *Vet Rec* 2023, 192, 449–450, doi:10.1002/vetr.3143.
- Attipa, C.; Warr, A.S.; Epaminondas, D.; O’Shea, M.; Hanton, A.J.; Fletcher, S.; Malbon, A.; Lyraki, M.; Hammond, R.; Hardas, A.; et al. Feline Infectious Peritonitis Epizootic Caused by a Recombinant Coronavirus. *Nature* 2025, 645, 228–234, doi:10.1038/s41586-025-09340-0.
- Azevedo, L.S. de; Silva, V.C.M.; Guiducci, R.; Guadagnucci, S.; Costa, F.F.; Ghani, M.B.A.; Lopes, R.D.; da Costa, A.C.; Cunha, L.; Lemos, M.F.; et al. Emerging Zoonotic Risks: Detection of the Human Norovirus GII.4 Sydney[P31] Strain in a Domestic Dog in Brazil. *Acta Trop* 2024, 260, 107449, doi:10.1016/j.actatropica.2024.107449.
- Balboni, A.; Verin, R.; Morandi, F.; Poli, A.; Prosperi, S.; Battilani, M. Molecular Epidemiology of Canine Adenovirus Type 1 and Type 2 in Free-Ranging Red Foxes (*Vulpes Vulpes*) in Italy. *Vet Microbiol* 2013, 162, 551–557, doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.015.

- Bernardini, A.; Pacini, M.I.; Fonti, N.; Forzan, M.; Marchetti, V.; Mazzei, M. Serological, Virological Investigation and Hepatic Injury Evaluation for Hepatitis E Virus in Hunting Dogs. *Pathogens* 2022, 11, 1123, doi:10.3390/pathogens11101123.
- Boros, Á.; Albert, M.; Urbán, P.; Herczeg, R.; Gáspár, G.; Balázs, B.; Cságola, A.; Pankovics, P.; Gyenesi, A.; Reuter, G. Unusual “Asian-Origin” 2c to 2b Point Mutant Canine Parvovirus (Parvoviridae) and Canine Astrovirus (Astroviridae) Co-Infection Detected in Vaccinated Dogs with an Outbreak of Severe Haemorrhagic Gastroenteritis with High Mortality Rate in Hungary. *Vet Res Commun* 2022, 46, 1355–1361, doi:10.1007/s11259-022-09997-2.
- Bryce, C.M. Dogs as Pets and Pests: Global Patterns of Canine Abundance, Activity, and Health. *Integr Comp Biol* 2021, 61, 154–165, doi:10.1093/icb/icab046.
- Buonavoglia, C.; Martella, V.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Cavalli, A.; Buonavoglia, D.; Bozzo, G.; Elia, G.; Decaro, N.; Carmichael, L. Evidence for Evolution of Canine Parvovirus Type 2 in Italy. *J Gen Virol* 2001, 82, 3021–3025, doi:10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Caballero-Gómez, J.; Rivero-Juarez, A.; Jurado-Tarifa, E.; Jiménez-Martín, D.; Jiménez-Ruiz, E.; Castro-Scholten, S.; Ulrich, R.G.; López-López, P.; Rivero, A.; García-Bocanegra, I. Serological and Molecular Survey of Hepatitis E Virus in Cats and Dogs in Spain. *Transbound Emerg Dis* 2022, 69, 240–248, doi:10.1111/tbed.14437.
- Caddy, S.; Breiman, A.; le Pendu, J.; Goodfellow, I. Genogroup IV and VI Canine Noroviruses Interact with Histo-Blood Group Antigens. *J Virol* 2014, 88, 10377–10391, doi:10.1128/JVI.01008-14.
- Caddy, S.L.; de Rougemont, A.; Emmott, E.; El-Attar, L.; Mitchell, J.A.; Hollinshead, M.; Belliot, G.; Brownlie, J.; Le Pendu, J.; Goodfellow, I. Evidence for Human Norovirus Infection of Dogs in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2015, 53, 1873–1883, doi:10.1128/JCM.02778-14.
- Calatayud, O.; Esperón, F.; Velarde, R.; Oleaga, Á.; Llana, L.; Ribas, A.; Negre, N.; de la Torre, A.; Rodríguez, A.; Millán, J. Genetic Characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish Wildlife Reveals Domestic Dog and Cat-Related Sequences. *Transbound Emerg Dis* 2020, 67, 626–634, doi:10.1111/tbed.13378.
- Canuti, M.; Mira, F.; Villanúa, D.; Rodríguez-Pastor, R.; Guercio, A.; Urra, F.; Millán, J. Molecular Ecology of Novel Amdoparvoviruses and Old Protoparvoviruses in Spanish Wild Carnivorans. *Infect Genet Evol* 2025, 128, 105714, doi:10.1016/j.meegid.2025.105714.
- Cardillo, L.; Piegari, G.; Iovane, V.; Viscardi, M.; Alfano, F.; Cerrone, A.; Pagnini, U.; Montagnaro, S.; Galiero, G.; Pisanelli, G.; et al. Lifestyle as Risk Factor for Infectious Causes of Death in Young Dogs: A Retrospective Study in Southern Italy (2015-2017). *Vet Med Int* 2020, 2020, 6207297, doi:10.1155/2020/6207297.
- Cleaveland, S.; Laurenson, M.K.; Taylor, L.H. Diseases of Humans and Their Domestic Mammals: Pathogen Characteristics, Host Range and the Risk of Emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, 356, 991–999, doi:10.1098/rstb.2001.0889.
- Costanzi, L.; Brambilla, A.; Di Blasio, A.; Dondo, A.; Gorla, M.; Masoero, L.; Gennero, M.S.; Bassano, B. Beware of Dogs! Domestic Animals as a Threat for Wildlife Conservation in Alpine Protected Areas. *Eur J Wildl Res* 2021, 67, 70, doi:10.1007/s10344-021-01510-5.
- De Grazia, S.; Martella, V.; Giammanco, G.M.; Gómara, M.I.; Ramirez, S.; Cascio, A.; Colomba, C.; Arista, S. Canine-Origin G3P[3] Rotavirus Strain in Child with Acute Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007, 13, 1091–1093, doi:10.3201/eid1307.070239.
- Decaro, N.; Buonavoglia, C.; Barrs, V.R. Canine Parvovirus Vaccination and Immunisation Failures: Are We Far from Disease Eradication? *Vet Microbiol* 2020, 247, 108760, doi:10.1016/j.vetmic.2020.108760.
- Decaro, N.; Campolo, M.; Elia, G.; Buonavoglia, D.; Colaianni, M.L.; Lorusso, A.; Mari, V.; Buonavoglia, C. Infectious Canine Hepatitis: An “Old” Disease Reemerging in Italy. *Res Vet Sci* 2007, 83, 269–273, doi:10.1016/j.rvsc.2006.11.009.
- Decaro, N.; Balboni, A.; Bertolotti, L.; Martino, P.A.; Mazzei, M.; Mira, F.; Pagnini, U. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats: Facts and Speculations. *Front Vet Sci* 2021, 8, 619207, doi:10.3389/fvets.2021.619207.
- Di Martino, B.; Di Profio, F.; Melegari, I.; Sarchese, V.; Massirio, I.; Palermo, G.; Romito, G.; Lorusso, E.; Lanave, G.; Bodnar, L.; et al. Seroprevalence for Norovirus Genogroup II, IV and VI in Dogs. *Vet Microbiol* 2017, 203, 68–72, doi:10.1016/j.vetmic.2017.03.006.
- Diniz Beduschi Travassos Alves, C.; da Fontoura Budaszewski, R.; Cibulski, S.P.; Nunes Weber, M.; Quoos Mayer, F.; Viezzer Bianchi, M.; Zafalon-Silva, B.; Konradt, G.; Slaviero, M.; Sonne, L.; et al.

- Mamastrovirus 5 Detected in a Crab-Eating Fox (*Cerdocyon Thous*): Expanding Wildlife Host Range of Astroviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2018, 58, 36–43, doi:10.1016/j.cimid.2018.08.002.
- Ferrara, G.; Pagnini, U.; Improda, E.; Ciarcia, R.; Parisi, A.; Fiorito, F.; Della Valle, G.; Iovane, G.; Montagnaro, S. Detection of Anti-HEV Antibodies but No Molecular Positivity in Dogs in the Campania Region, Southern Italy. *One Health* 2024, 18, 100724, doi:10.1016/j.onehlt.2024.100724.
- Franzo, G.; Mira, F.; Schirò, G.; Canuti, M. Not Asian Anymore: Reconstruction of the History, Evolution, and Dispersal of the “Asian” Lineage of CPV-2c. *Viruses* 2023, 15, 1962, doi:10.3390/v15091962.
- Guercio, A.; Mira, F.; Di Bella, S.; Gucciardi, F.; Lastra, A.; Purpari, G.; Castronovo, C.; Pennisi, M.; Di Marco Lo Presti, V.; Rizzo, M.; et al. Biomolecular Analysis of Canine Distemper Virus Strains in Two Domestic Ferrets (*Mustela Putorius Furo*). *Vet Sci* 2023, 10, 375, doi:10.3390/vetsci10060375.
- Han, H.-J.; Wen, H.-L.; Zhao, L.; Liu, J.-W.; Luo, L.-M.; Zhou, C.-M.; Qin, X.-R.; Zhu, Y.-L.; Liu, M.-M.; Qi, R.; et al. Novel Coronaviruses, Astroviruses, Adenoviruses and Circoviruses in Insectivorous Bats from Northern China. *Zoonoses Public Health* 2017, 64, 636–646, doi:10.1111/zph.12358.
- Huang, P.; Farkas, T.; Zhong, W.; Tan, M.; Thornton, S.; Morrow, A.L.; Jiang, X. Norovirus and Histo-Blood Group Antigens: Demonstration of a Wide Spectrum of Strain Specificities and Classification of Two Major Binding Groups among Multiple Binding Patterns. *J Virol* 2005, 79, 6714–6722, doi:10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005.
- Joffrin, L.; Hoarau, A.O.G.; Lagadec, E.; Köster, M.; Ramanantsalama, R.V.; Mavingui, P.; Lebarbenchon, C. Astrovirus in Reunion Free-Tailed Bat (*Mormopterus Francoismoutoui*). *Viruses* 2021, 13, 1524, doi:10.3390/v13081524.
- Lednický, J.A.; Tagliamonte, M.S.; White, S.K.; Blohm, G.M.; Alam, M.M.; Iovine, N.M.; Salemi, M.; Mavian, C.; Morris, J.G. Isolation of a Novel Recombinant Canine Coronavirus From a Visitor to Haiti: Further Evidence of Transmission of Coronaviruses of Zoonotic Origin to Humans. *Clin Infect Dis* 2022, 75, e1184–e1187, doi:10.1093/cid/ciab924.
- Leong, R.; Hoarau, A.O.G.; Carcauzon, V.; Köster, M.; Dietrich, M.; Tortosa, P.; Lebarbenchon, C. High Astrovirus Diversity in an Endemic Bat Species Suggests Multiple Spillovers from Synanthropic Rodents and Birds. *J Virol* 2025, 99, e0135724, doi:10.1128/jvi.01357-24.
- Leopardi, S.; Milani, A.; Cocchi, M.; Bregoli, M.; Schivo, A.; Leardini, S.; Festa, F.; Pastori, A.; de Zan, G.; Gobbo, F.; et al. Carnivore Protoparvovirus 1 (CPV-2 and FPV) Circulating in Wild Carnivores and in Puppies Illegally Imported into North-Eastern Italy. *Viruses* 2022, 14, 2612, doi:10.3390/v14122612.
- Licitra, B.N.; Duhamel, G.E.; Whittaker, G.R. Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins. *Viruses* 2014, 6, 3363–3376, doi:10.3390/v6083363.
- Liu, J.; Zhang, W.; Shen, Q.; Yang, S.; Huang, F.; Li, P.; Guo, X.; Yang, Z.; Cui, L.; Zhu, J.; et al. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Pet Dogs in the Jiang-Zhe Area of China. *Scand J Infect Dis* 2009, 41, 291–295, doi:10.1080/00365540902767031.
- Lizasoain, A.; Tort, L.F.L.; García, M.; Gómez, M.M.; Leite, J.P.G.; Miagostovich, M.P.; Cristina, J.; Berois, M.; Colina, R.; Victoria, M. Sewage Surveillance Reveals the Presence of Canine GVII Norovirus and Canine Astrovirus in Uruguay. *Arch Virol* 2015, 160, 2839–2843, doi:10.1007/s00705-015-2571-3.
- Luchs, A.; Cilli, A.; Morillo, S.G.; Carmona, R. de C.C.; Timenetsky, M. do C.S.T. Rare G3P[3] Rotavirus Strain Detected in Brazil: Possible Human-Canine Interspecies Transmission. *J Clin Virol* 2012, 54, 89–92, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.025.
- Martella, V.; Cirone, F.; Elia, G.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Campolo, M.; Desario, C.; Lucente, M.S.; Bellacicco, A.L.; Blixenkron-Møller, M.; et al. Heterogeneity within the Hemagglutinin Genes of Canine Distemper Virus (CDV) Strains Detected in Italy. *Vet Microbiol* 2006b, 116, 301–309, doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.019.
- Martella, V.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. Evolution of CPV-2 and Implication for Antigenic/Genetic Characterization. *Virus Genes* 2006a, 33, 11–13, doi:10.1007/s11262-005-0034-8.
- Mesquita, J.R.; Nascimento, M.S.J. Gastroenteritis Outbreak Associated with Faecal Shedding of Canine Norovirus in a Portuguese Kennel Following Introduction of Imported Dogs from Russia. *Transbound Emerg Dis* 2012, 59, 456–459, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01284.x.
- Mesquita, J.R.; Costantini, V.P.; Cannon, J.L.; Lin, S.; Nascimento, M.S.J.; Vinjé, J. Presence of Antibodies against Genogroup VI Norovirus in Humans. *Virol J* 2013, 10, 176, doi:10.1186/1743-422X-10-176.

- Mira, F.; Purpari, G.; Lorusso, E.; Di Bella, S.; Gucciardi, F.; Desario, C.; Macaluso, G.; Decaro, N.; Guercio, A. Introduction of Asian Canine Parvovirus in Europe through Dog Importation. *Transbound Emerg Dis* 2018b, 65, 16–21, doi:10.1111/tbed.12747.
- Mira, F. From Molecular Surveillance to Electronic Health Data and Back: Creating Virtual Biobanks for Infectious Diseases of Companion Animals. *Vet Rec* 2021, 189, 241–243, doi:10.1002/vetr.998.
- Mira, F.; Franzo, G.; Schirò, G.; Vicari, D.; Purpari, G.; Cannella, V.; Giudice, E.; Trapani, M.; Carrozzo, A.; Spene, G.; et al. Introduction of a Divergent Canine Parvovirus Type 2b Strain with a Dog in Sicily, Southern Italy, Through the Mediterranean Sea Route to Europe. *Pathogens* 2025, 14, 108, doi:10.3390/pathogens14020108.
- Mira, F.; Purpari, G.; Di Bella, S.; Vicari, D.; Schirò, G.; Di Marco, P.; Macaluso, G.; Battilani, M.; Guercio, A. Update on Canine Distemper Virus (CDV) Strains of Arctic-like Lineage Detected in Dogs in Italy. *Vet Ital* 2018a, 54, 225–236, doi:10.12834/VetIt.1455.7862.2.
- Mira, F.; Schirò, G.; Franzo, G.; Canuti, M.; Purpari, G.; Giudice, E.; Decaro, N.; Vicari, D.; Antoci, F.; Castronovo, C.; et al. Molecular Epidemiology of Canine Parvovirus Type 2 in Sicily, Southern Italy: A Geographical Island, an Epidemiological Continuum. *Heliyon* 2024a, 10, e26561, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26561.
- Mira, F.; Schirò, G.; Lanave, G.; Chiamonte, G.; Canuti, M.; Giudice, E.; Capozza, P.; Randazzo, V.; Antoci, F.; Raele, D.A.; et al. Molecular Screening and Characterization of Canine Coronavirus Types I and II Strains from Domestic Dogs in Southern Italy, 2019–2021. *Transbound Emerg Dis* 2024b, 2024, 7272785, doi:10.1155/2024/7272785.
- Ndiana, L.A.; Lanave, G.; Vasinioti, V.; Desario, C.; Martino, C.; Colaianni, M.L.; Pellegrini, F.; Camarda, A.; Berjaoui, S.; Sgroi, G.; et al. Detection and Genetic Characterization of Canine Adenoviruses, Circoviruses, and Novel Cycloviruses From Wild Carnivores in Italy. *Front Vet Sci* 2022, 9, 851987, doi:10.3389/fvets.2022.851987.
- Ntafis, V.; Mari, V.; Decaro, N.; Papanastassopoulou, M.; Pardali, D.; Rallis, T.S.; Kanellos, T.; Buonavoglia, C.; Xylouri, E. Canine Coronavirus, Greece. Molecular Analysis and Genetic Diversity Characterization. *Infect Genet Evol* 2013, 16, 129–136, doi:10.1016/j.meegid.2013.01.014.
- Pelegriňová, A.; Petroušková, P.; Korytár, L.; Ondrejková, A.; Drážovská, M.; Vojtek, B.; Mojžišová, J.; Prokeš, M.; Kostičák, M.; Zákutná, L.; et al. The First Evidence of Asian-like CPV-2b in Slovakia in a Vaccinated Dog with an Acute Fatal Course of Parvovirus Infection: A Case Report. *Vet Res Commun* 2024, 48, 3253–3262, doi:10.1007/s11259-024-10492-z.
- Pramod, R.K.; Yadav, V.; Vishnuraj, M.R.; Gupta, M.K. Beyond Rodents: The Integral Role of Domestic Animals in Biomedical Research. *Res Vet Sci* 2025, 193, 105803, doi:10.1016/j.rvsc.2025.105803.
- Schirò, G.; Mira, F.; Canuti, M.; Vullo, S.; Purpari, G.; Chiamonte, G.; Di Bella, S.; Cannella, V.; Randazzo, V.; Castronovo, C.; et al. Identification and Molecular Characterization of a Divergent Asian-like Canine Parvovirus Type 2b (CPV-2b) Strain in Southern Italy. *Int J Mol Sci* 2022, 23, 11240, doi:10.3390/ijms231911240.
- Sha, X.; Li, Y.; Huang, J.; Zhou, Q.; Song, X.; Zhang, B. Detection and Molecular Characteristics of Canine Coronavirus in Chengdu City, Southwest China from 2020 to 2021. *Microb Pathog* 2022, 166, 105548, doi:10.1016/j.micpath.2022.105548.
- Shun, E.H.-K.; Situ, J.; Tsoi, J.Y.-H.; Wu, S.; Cai, J.; Lo, K.H.-Y.; Chew, N.F.-S.; Li, Z.; Poon, R.W.-S.; Teng, J.L.-L.; et al. Rat Hepatitis E Virus (Rocahepevirus Ratti) Exposure in Cats and Dogs, Hong Kong. *Emerg Microbes Infect* 2024, 13, 2337671, doi:10.1080/22221751.2024.2337671.
- Urbani, L.; Tirolo, A.; Balboni, A.; Troia, R.; Dondi, F.; Battilani, M. Concomitant Infections With Canine Parvovirus Type 2 and Intracellular Tick-Borne Pathogens in Two Puppy Dogs. *Front Vet Sci* 2022, 9, 964177, doi:10.3389/fvets.2022.964177.
- Veronesi, R.; Morach, M.; Hübschke, E.; Bachofen, C.; Stephan, R.; Nüesch-Inderbinen, M. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Dogs in Switzerland. *Zoonoses Public Health* 2021, 68, 8–11, doi:10.1111/zph.12779.
- Vlasova, A.N.; Diaz, A.; Damtie, D.; Xiu, L.; Toh, T.-H.; Lee, J.S.-Y.; Saif, L.J.; Gray, G.C. Novel Canine Coronavirus Isolated from a Hospitalized Patient With Pneumonia in East Malaysia. *Clin Infect Dis* 2022, 74, 446–454, doi:10.1093/cid/ciab456.
- Warr, A.; Attipa, C.; Gunn-Moore, D.; Tait-Burkard, C. FCov-23 Causing FIP in a Cat Imported to the UK from Cyprus. *Vet Rec* 2023, 193, 414–415, doi:10.1002/vetr.3696.
- Rabies-Bulletin-Europe, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance & Research. <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/queries>

Wu, F.-T.; Bányai, K.; Lin, J.-S.; Wu, H.-S.; Hsiung, C.A.; Huang, Y.-C.; Hwang, K.-P.; Jiang, B.; Gentsch, J.R. Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12, 170–173, doi:10.1089/vbz.2011.0708.