

## GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH HỆ GEN CỦA PARVOVIRUS PHÂN LẬP ĐƯỢC TRÊN CHÓ TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

Võ Văn Hải, Trịnh Thị Bích Ngọc, Phạm Quang Hưng,  
Nguyễn Văn Tâm, Vũ Xuân Đăng, Bùi Trần Anh Đào, Lê Văn Phan \*

*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*\*Tác giả liên hệ: letranphan@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 14.09.2021

Ngày chấp nhận đăng: 05.04.2022

### TÓM TẮT

Canine Parvovirus type 2 (CPV-2) là virus gây bệnh viêm ruột tiêu chảy cấp tính trên chó. CPV-2 là một ADN virus và dựa trên trình tự gen VP2, CPV-2 được chia thành 3 biến thể là CPV-2a, CPV-2b và CPV-2c. Hiện nay CPV-2c là biến thể đang lưu hành phổ biến trên thế giới cũng như Việt Nam. Trong nghiên cứu này, trình tự hệ gen của 8 chủng Parvovirus phân lập được từ chó tại một số tỉnh của miền Bắc trong giai đoạn 2018-2020 đã được giải trình tự. Kết quả giải trình tự hệ gen của các chủng virus trong nghiên cứu đã thu được trình tự gen có chiều dài là 4269 nucleotide (nt), trong đó trình tự gen mã hóa cho khung đọc mở (ORF) tương ứng với protein phi cấu trúc (nonstructural protein) là 2007 nt và protein cấu trúc (structural protein) là 2256 nt. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự hệ gen cho thấy cả 8 chủng Parvovirus phân lập được từ chó trong nghiên cứu này đều thuộc CPV-2c, cùng nằm trong nhánh phát sinh thuộc genotype Asia-4. Trình tự hệ gen của Parvovirus gây bệnh trên chó thu được trong nghiên cứu này sẽ là nguồn dữ liệu gen quan trọng phục vụ các nghiên cứu về tiến hóa di truyền theo không gian và thời gian của các chủng Parvovirus đã và đang gây bệnh trên đàn chó tại Việt Nam.

Từ khóa: Chó, Canine parvovirus type 2, giải mã bộ gen, CPV-2c.

### Genomic Sequencing and Analysis of Parvovirus Isolated from Dogs in some Northern Provinces of Vietnam

#### ABSTRACT

Canine Parvovirus type 2 (CPV-2) is a virus that causes acute diarrheal enteritis in dogs. CPV-2 is a DNA virus and based on the VP2 gene sequence, CPV-2 is classified into CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c. Currently, CPV-2c is the most popular variant circulating in the world as well as in Vietnam. In this study, the genome sequences of eight canine Parvovirus strains isolated in some northern provinces of Vietnam during 2018 - 2020 were sequenced. The results of genome sequencing of the Parvovirus strains have obtained genetic sequences of 4269 nucleotides (nt) in length, in which the gene sequence coding for the open reading frame (ORF) corresponding to the non-structural proteins was 2007 nt and structural proteins was 2256 nt in length. The phylogenetic analysis based on the full genome sequences showed that all eight present canine Parvovirus strains belonged to CPV-2c and shared the same evolutionary brand with clade Asia-4. The whole genomic sequence data of canine Parvovirus obtained in this study will be an important source for any spatial and temporal genetic evolution studies of canine Parvovirus strains circulating in Vietnam.

Keywords: Dogs, Canine parvovirus type 2, Genomic sequencing, CPV-2c.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Canine Parvovirus type 2 (CPV-2) là nguyên nhân gây bệnh viêm ruột tiêu chảy trên

chó. Bệnh có tỉ lệ mắc và tỉ lệ tử vong cao, thường gặp ở chó dưới 1 năm tuổi và chó chưa được tiêm phòng vaccin. Bệnh xuất hiện một số triệu chứng điển hình như: ủ rũ, bỏ ăn, sốt cao,

nôn mửa, mất nước nhanh chóng và tiêu chảy phân có lẫn máu (Appel & cs., 1979; Hayes & cs., 1979; Vickers, 2017). CPV-2 thuộc giống *Parvovirus*, họ *Parvoviridae*, là virus không có vỏ bọc, đường kính khoảng 25nm, ADN sợi đơn. Bộ gen có chiều dài khoảng 5,2kb, bao gồm 2 khung đọc mở mã hóa cho hai loại protein: protein phi cấu trúc (non-structural protein-NS) và protein cấu trúc (structural protein-VP) (Reed & cs., 1988).

Bệnh do CPV-2 lần đầu tiên được ghi nhận vào cuối những năm 70 của thế kỉ XX (Appel & cs., 1979). Kể từ khi ca bệnh đầu tiên xuất hiện, CPV-2 đã xuất hiện những đột biến trên đoạn gen VP2 và dựa trên cơ sở sự khác biệt được quan sát thấy tại vị trí amino acid 426 đã tạo ra những biến chủng mới bao gồm: CPV-2a (426Asn), CPV-2b (426Asp) và CPV-2c (426Glu). Cho đến nay, cả ba biến chủng đã được ghi nhận trên toàn thế giới, với tỉ lệ lưu hành và phân bố khác nhau giữa các vùng địa lý (Mira & cs., 2018b). Mặc dù gen VP2 của CPV-2 đã được nghiên cứu tương đối tốt nhưng việc nghiên cứu các biến thể di truyền của gen NS vẫn còn hạn chế. Gen NS có liên quan đến sự sao chép của virus, đóng gói ADN, gây độc tế bào và khả năng gây bệnh (Wang & cs., 1998; Niskanen & cs., 2010; Nikanen & cs., 2013).

Ở Việt Nam, theo Hoang & cs., (2019), ca bệnh trên chó đầu tiên do CPV-2 được cho là phát hiện vào năm 1994. Cho đến nay cả ba biến chủng CPV-2a, CPV-2b và CPV-2c đã được phát hiện tại Việt Nam (Hoang & cs., 2019; Nakamura & cs., 2004), trong đó biến chủng gây

bệnh phổ biến nhất trong những năm gần đây là CPV-2c (Hoang & cs., 2019). Mặc dù ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu khoa học phân tích về những biến đổi di truyền của các chủng CPV-2 đã và đang gây bệnh trên đàn chó nuôi tại Việt Nam, nhưng những nghiên cứu này chủ yếu tập trung vào giải mã và phân tích gen VP2 của CPV-2 (Nakamura & cs., 2004; Hoang & cs., 2019; Doan & cs., 2021). Những nghiên cứu về giải mã và phân tích toàn bộ bộ gen của CPV-2 còn ít, theo hiểu biết của chúng tôi thì cho đến nay chỉ có duy nhất một công bố khoa học của Nguyen & cs., (2021) về giải mã hệ bộ gen của CPV-2 phân lập được tại Việt Nam trong giai đoạn 2017-2018. Kết quả nghiên cứu thu được của Nguyen & cs., (2021) cho thấy những biến đổi di truyền của CPV-2 diễn ra trên cả gen mã hóa cho protein cấu trúc và phi cấu trúc, cụ thể sự thay thế cho mỗi vị trí nucleotide (nt) đối với gen mã hóa cho protein cấu trúc là  $3,06 \times 10^{-4}$  nt/năm và đối với gen mã hóa cho protein phi cấu trúc là  $3,16 \times 10^{-4}$  nt/năm. Do CPV-2 thường xuyên có những biến đổi về di truyền để hình thành nên những biến chủng virus mới, vì vậy rất cần những nghiên cứu liên tục về giải mã và phân tích hệ gen của CPV-2 để xác định được nguồn gốc tiến hóa và sự biến đổi di truyền của các chủng CPV-2 đã và đang gây bệnh trên chó theo không gian và thời gian khác nhau. Trong nghiên cứu này, một số chủng Parvovirus phân lập được từ chó bị bệnh nuôi tại Hà Nội, Bắc Giang, Bắc Ninh, Hà Nam và Vĩnh Phúc trong giai đoạn 2018-2020 đã được giải trình tự và phân tích trình tự hệ gen.

**Bảng 1. Thông tin các chủng CPV sử dụng trong nghiên cứu**

Chủng virus	Thời gian thu thập mẫu	Giống chó	Tuổi (tháng)	Địa phương
VNUA/CPV152	09/2018	Poodle	3	Hà Nội
VNUA/CPV153	09/2018	Poodle	5	Vĩnh Phúc
VNUA/CPV175	11/2019	Nhật lai	7	Bắc Giang
VNUA/CPV376	11/2019	Chó ta	2	Bắc Ninh
VNUA/CPV379	04/2020	Phốc	7	Vĩnh Phúc
VNUA/CPV380	04/2020	Chó đốm	3	Hà Nội
VNUA/CPV384	05/2020	Akita	6	Bắc Ninh
VNUA/CPV385	06/2020	Chó lai	2	Hà Nam

**Bảng 2. Thông tin các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu**

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Vị trí	Kích thước (bp)	Nhiệt độ gắn môi (°C)
CPV 1F	CTTCTTGCTTTGACAGAGTGAA	224-246	1198	55
CPV 1R	TGCTATAGCGTGACAA ACTTTA	1399-1420		
CPV 2F	ATCTTGCAAATTCTAGAACATGTCA	1344-1368	843	
CPV 2R	TTGCACGCTTTTGTGAGTAAC	2165-2185		
CPV 3F	ACGTAGTGGACCTTGCACTGGAA	2079-2101	776	
CPV 3R	GATCCTGTAGCTCTTTCATTTCT	2831-2853		
CPV 4F	AATCTTGCACCAATGAGTGA	2774-2793	1169	
CPV 4R	TGACCATGTTGTCTACCAAATGCAT	3918-3942		
CPV 5F	TATGAGACCAGCTGAGGTTGGTTA	3775-3798	821	
CPV 5R	AATTTTTCTAGGTGCTAGTTGATATGTAAT	4566-4595		

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Tám chủng virus CPV-2 khác nhau (VNUA/CPV152, VNUA/CPV153, VNUA/CPV175, VNUA/CPV376, VNUA/CPV379, VNUA/CPV380, VNUA/CPV384 và VNUA/CPV385) đã được sử dụng để giải mã toàn bộ hệ gen. Đây là những chủng virus đã được phân lập thành công trên môi trường tế bào (kết quả không được thể hiện) từ mẫu bệnh phẩm của chó bị bệnh nuôi tại 5 tỉnh thành khác nhau của miền Bắc, bao gồm Hà Nội (2 mẫu), Vĩnh Phúc (2 mẫu), Bắc Ninh (2 mẫu), Bắc Giang (1 mẫu) và Hà Nam (1 mẫu). Thông tin chi tiết về các chủng virus sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết ADN tổng số

DNA tổng số được chiết tách bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ADN sau tách chiết được bảo quản ở -20°C

#### 2.2.2. Phương pháp PCR

Mẫu DNA sau khi tách chiết sẽ được sử dụng cho phản ứng PCR. Thành phần một phản ứng PCR bao gồm: 10µl 2X PCR Master Mix solution (iNtRON); 1µl mỗi xuôi; 1µl mỗi ngược; 3µl ADN và 5µl nước tinh khiết không chứa enzyme phân cắt ADN và ARN. Chu trình

phản ứng PCR được thực hiện như sau: 95°C trong 5 phút; 35 chu trình (95°C 30 giây; 55°C 30 giây; 72°C 1 phút); pha kéo dài 72°C trong 7 phút và bảo quản sản phẩm ở 4°C. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu này là những cặp môi đã được công bố trước đây (Moon & cs., 2020). Thông tin chi tiết về các cặp môi được thể hiện trong bảng 2.

#### 2.2.3. Giải trình tự bộ gen và xây dựng cây sinh học phân tử

Để giải trình tự bộ gen CPV-2, năm cặp môi đặc hiệu khác nhau đã được sử dụng để nhân lên 5 đoạn gen khác nhau của hệ gen CPV-2 (Bảng 2). Sản phẩm PCR thu được đã được giải trình tự bởi công ty 1<sup>st</sup> BASE DNA Sequencing (Malaysia). Các trình tự được căn chỉnh và so sánh bằng phần mềm Geneious 10.0 (<https://www.geneious.com/prime>) và BioEdit. Cây sinh học phân tử được phân tích bằng phần mềm MEGA X (Kumar & cs., 2018), sử dụng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị Bootstrap là 1000. Các chủng CPV-2 tham chiếu sử dụng trong nghiên cứu được thu thập từ dữ liệu ngân hàng gen thế giới (GenBank).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả nhân các đoạn gen của CPV-2 bằng phản ứng PCR

Trình tự hệ gen của CPV-2 có chiều dài khoảng 5,2kb, mã hóa cho 2 protein phi cấu trúc

(NS1 và NS2) và 2 protein cấu trúc (VP1 và VP2) (Reed & cs., 1988). Để giải mã được toàn bộ hệ gen của CPV-2, năm cặp môi đặc hiệu bất cặp ở các vị trí khác nhau và trải dài toàn bộ hệ gen đã được thiết kế (Bảng 2) (Moon & cs., 2020). Kết quả phản ứng PCR cho thấy cả 5 cặp môi đều hoạt động tốt và nhân lên 5 đoạn gen đặc hiệu khác nhau với kích thước là 1198, 843, 776, 1169 và 821 bp, tương ứng với các cặp môi CPV-1F/1R, CPV-2F/2R, CPV-3F/3R, CPV-4F/4R và CPV-5F/5R. Các sản phẩm PCR thu được này có kích thước đúng với kích thước đã được công bố trước đây (Moon & cs., 2020). Như vậy bước nhân các đoạn gen trải dài toàn bộ hệ gen của CPV-2 bằng phương pháp PCR đã thành công (Hình 1).

### 3.2. Kết quả phân tích trình tự nucleotide và amino acid của các chủng CPV-2

Kết quả giải trình tự gen, qua phân tích cho thấy trình tự hệ gen thu được của các mẫu CPV-2 có chiều dài là 4269 nucleotide (nt), bao gồm hai khung đọc mở (ORF) mã hóa cho NS (2007 nt) và VP (2256 nt), trong đó đoạn gen VP2 có chiều dài 1755 nt. Kết quả phân tích và so sánh về trình tự hệ gen cho thấy 8 chủng virus trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng với nhau về trình tự nt dao động từ 99,8-100% và trình tự amino acid (aa) dao động từ 99,7-100%. Khi so sánh về trình tự hệ gen của các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này với một số chủng CPV-2 khác của Việt Nam đã được công bố trước đây, mức độ tương đồng về trình tự nt dao động từ 98,7-99,8% và aa dao động từ 98,5-99,9%. Cụ thể, mức độ tương đồng về trình tự hệ gen của các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này với chủng CPV/dog/HCM/22/2013 (GenBank: LC214970) thuộc biến thể (Genotype) 2a phân lập tại Thành phố Hồ Chí Minh năm 2013 dao động từ 98,7-98,8% về nt và 98,5-98,8% về aa. Đối với chủng CPV-2 thuộc biến thể 2c phân lập tại Thành phố Hồ Chí Minh năm 2013 là chủng CPV/dog/HCM/7/2013 (GenBank: LC214969) và chủng HN07 (GenBank: MT106228) phân lập tại Hà Nội năm 2017 (Nguyen & cs., 2021), mức độ tương đồng về nt dao động từ 99,6-99,8% và aa dao động 99,5-99,9%. Tương tự, khi so sánh

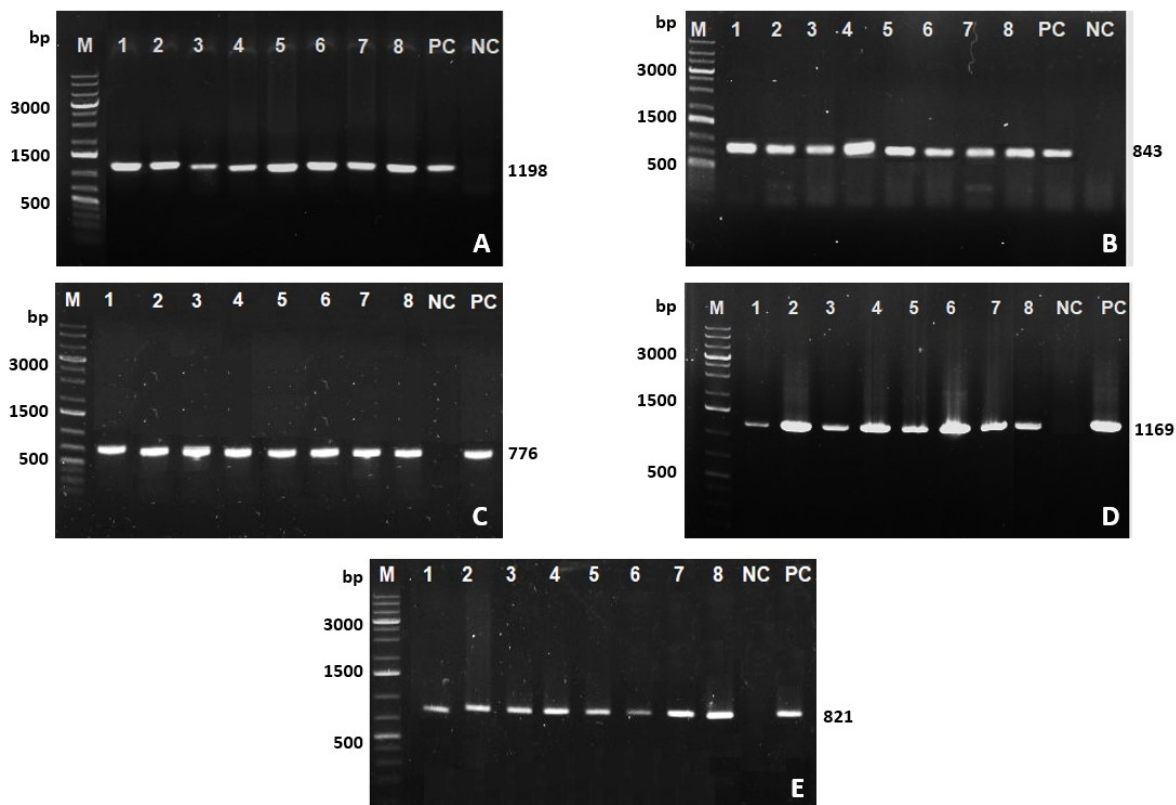
với một số chủng CPV-2 thuộc các biến thể 2a, 2b và 2c khác nhau phân lập được tại Mỹ, Trung Quốc, Ý và Đức, mức độ tương đồng về trình tự nt dao động từ 98,9-99,9% và aa dao động từ 98,5-100%. Trong số các chủng CPV-2 tham chiếu nước ngoài thì các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng về trình tự hệ gen cao nhất với chủng CPV/IZSSI/2743/17 (GenBank: MF510157) phân lập được từ Ý năm 2017, tương đồng 99,9% về nt và 99,8-100% về aa (Bảng 3).

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy các đột biến di truyền diễn ra ở nhiều vị trí khác nhau trên cả đoạn gen mã hoá cho protein cấu trúc và protein phi cấu trúc của CPV-2, không tập trung ở một khu vực trình tự gen nhất định (Moon & cs., 2020; Nguyen & cs., 2021). Kết quả phân tích về trình tự nt của hệ gen trong nghiên cứu này cũng cho thấy có sự thay thế nt diễn ra trên cả trình tự gen mã hóa cho protein cấu trúc và protein phi cấu trúc của CPV-2. Cụ thể trên trình tự gen VP2, chủng VNUA/CPV152 và VNUA/CPV153 sai khác với 6 chủng còn lại tại vị trí nt 445 (G ↔ A). Trên trình tự gen NS, chủng VNUA/CPV175 và VNUA/CPV376 sai khác với 6 chủng còn lại tại vị trí nt 75 (T ↔ C), 376 (G ↔ A) và 939 (A ↔ G). Chủng VNUA/CPV380 có 5 vị trí nt sai khác so với các chủng VNUA/CPV/152, VNUA/CPV153, VNUA/CPV175 và VNUA/CPV376, bao gồm vị trí nt 920 (A ↔ C) trên trình tự gen NS và vị trí nt 633 (T ↔ C), 645 (T ↔ C), 846 (T ↔ C) và 1341 (A ↔ G) trên trình tự gen VP2. Tương tự trên đoạn gen NS, chủng VNUA/CPV384 và VNUA/CPV385 sai khác với 6 chủng còn lại tại vị trí nt 51 (G ↔ A), 1599 (T ↔ G) và 1790 (T ↔ C).

Kết quả phân tích về trình tự aa suy diễn (deduced aa) cho thấy có 31 vị trí sai khác về aa khi so sánh 8 chủng CPV-2 trong nghiên cứu này với nhau và với các chủng tham chiếu khác (Bảng 4). Cụ thể kết quả phân tích trình tự aa của gen VP2 cho thấy, mặc dù có 16 vị trí đột biến nt nhưng chỉ có 8 vị trí đột biến thay thế làm thay đổi trình tự amino acid: 5 (Ala ↔ Gly); 87 (Met ↔ Leu), 101 (Ile ↔ Thr), 267 (Phe ↔ Tyr), 300 (Ala ↔ Gly), 370 (Gln ↔ Agr), 426 (Asn ↔ Glu), 447 (Ile ↔ Met). Một nghiên cứu

trước đây của Hoang & cs., (2019) cũng cho thấy 6/15 vị trí đột biến nt làm thay đổi trình tự aa của gen VP2 của các chủng PCV-2 phân lập tại Việt Nam trong giai đoạn từ tháng 11/ 2016 đến tháng 2/2018. Các đột biến thay thế aa diễn ra ở các vị trí khác nhau (5: Ala ↔ Gly; 267: Phe↔Tyr; 324: Tyr ↔ Ile; và 370: Gln ↔ Agr) trên trình tự gen VP2 của các chủng CPV-2c cũng đã được công bố trước đây tại Trung Quốc (Wang & cs., 2016; Zhao & cs., 2017), Đài Loan (Chiang & cs., 2016; Lin & cs., 2017) và Hàn Quốc (Moon & cs., 2020). Vị trí đột biến aa 370: Gln ↔ Agr của chủng CPV-2c được công bố lần đầu tiên tại Trung Quốc năm 2014 (Guo & cs., 2013). Các vị trí đột biến aa nằm trong vùng từ vị trí aa 359 đến 375 của gen VP2 được cho là có thể ảnh hưởng đến phạm vi vật chủ cảm nhiễm là chó hoặc mèo của CPV-2c và gây ngưng kết

hồng cầu của vật chủ (Simpson & cs., 2000). Kết quả phân tích trình tự aa của gen VP2 trong nghiên cứu này cho thấy aa ở vị trí 370 của chủng virus VNUA/CPV152 phân lập được tại Hà Nội năm 2018 là Gln, trong khi 7 chủng virus còn lại trong nghiên cứu này cũng như các chủng CPV-2c đã được công bố trước đây bởi Nguyen & cs. (2021) đều là Agr. Phát hiện này cho thấy những chủng CPV-2c phân lập được trên chó tại Việt Nam trong những năm gần đây có thể có đặc tính sinh học khác nhau và phạm vi vật chủ cảm nhiễm cũng sẽ khác nhau. Từ nghiên cứu này cho thấy những nghiên cứu mang tính liên tục và cập nhật về các đặc điểm sinh học và sinh học phân tử theo không gian và thời gian khác nhau của các chủng CPV-2 đã và đang gây bệnh trên chó, cũng có thể trên mèo là rất quan trọng và cần thiết.



Ghi chú: Hình A, B, C, D và E là sản phẩm PCR thu được tương ứng với các cặp môi CPV-1F/1R, CPV-2F/2R, CPV-3F/3R, CPV-4F/4R và CPV-5F/5R. M: Marker DNA. A; Giếng 1-8 là 8 chủng virus tương ứng VNUA/CPV152, VNUA/CPV153, VNUA/CPV175, VNUA/CPV376, VNUA/CPV379, VNUA/CPV380, VNUA/CPV384 và VNUA/CPV385; Giếng NC: Đối chứng âm; Giếng PC: Đối chứng dương (sử dụng chủng HN7AA, mã số GenBank: MK357734).

**Hình 1. Kết quả chạy điện di trên gel agarose để kiểm tra sản phẩm PCR**

Những nghiên cứu trước đây cũng cho thấy vị trí aa 426 trên trình tự protein VP2 đóng vai trò quan trọng trong việc chia CPV-2 thành 3 type khác nhau: CPV-2a, CPV-2b và CPV-2c. Cụ thể ở vị trí aa 426, chủng CPV-2a là Asparagine (Asn), chủng CPV-2b là Aspartic acid (Asp) và CPV-2c là Glutamic acid (Glu) (Buonavoglia & cs., 2001; Parrish & cs., 1991). Các type CPV-2a, CPV-2b và CPV-2c khác nhau được cho là có các đặc tính sinh học khác nhau và khác so với chủng CPV-2 gốc ban đầu. Các type CPV-2a, CPV-2b và CPV-2c này có thể lây nhiễm trên mèo (Truyen và Parrish., 1992). Chủng CPV-2c gây bệnh viêm ruột tiêu chảy trên chó đã được ghi nhận ở nhiều quốc gia trên thế giới, bao gồm các nước Bắc Mỹ, Nam Mỹ, châu Âu, châu Phi và châu Á (Doan & cs., 2021; Kang & cs., 2008; Ohshima & cs., 2008). Ở Việt Nam, chủng CPV-2c gây bệnh trên chó đã được ghi nhận lần đầu tiên năm 2004 (Nakamura & cs., 2004). Những công bố khoa học gần đây tại Việt Nam cũng cho thấy chủng CPV-2c là chủng lưu hành phổ biến nhất (Hoang & cs., 2019; Nguyen & cs., 2021). Trong nghiên cứu này 8 chủng CPV-2 thu thập được trong giai đoạn 2018-2020 đều thuộc CPV-2c (Bảng 4). Như vậy các kết quả cập nhật thu được từ nghiên cứu này cùng với các kết quả nghiên cứu đã được công bố gần đây (Hoang & cs., 2019; Doan & cs., 2021; Nguyen & cs., 2021) một lần nữa cho thấy các chủng CPV-2 đang lưu hành và gây bệnh trên đàn chó tại Việt Nam trong những năm gần đây hầu hết thuộc về chủng CPV-2c.

Protein phi cấu trúc (NS) được cho là liên quan đến khả năng gây độc tế bào và khả năng gây bệnh của CPV-2 (Wang & cs., 1998; Niskanen & cs., 2010; Nikanen & cs., 2013). Tuy nhiên những thông tin khoa học công bố về trình tự aa của NS cũng như đột biến di truyền trên NS còn nhiều hạn chế (Moon & cs., 2020). Một số công bố khoa học gần đây cho thấy các đột biến di truyền diễn ra trên cả NS của CPV-2 (Moon & cs., 2020; Nguyen & cs., 2021). Kết quả phân tích trình tự aa của NS cho thấy các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này có ít nhất 4 vị trí đột biến aa (60: Ile↔Val; 544: Tyr↔Phe;

545: Glu↔Val; 630: Leu↔Pro) khi so sánh với các chủng virus thuộc CPV-2 nói chung và CPV-2c nói riêng phân lập được trước đây trên thế giới và Việt Nam (Bảng 4). Các kết quả thu được trong nghiên cứu này cùng với một số nghiên cứu gần đây (Moon & cs., 2020; Nguyen & cs., 2021) cho thấy các nghiên cứu về tiến hoá cũng như dịch tễ học phân tử của các chủng CPV-2 trong thời gian tới cần giải mã toàn bộ hệ gen của CPV-2 thay vì chỉ giải mã gen VP2 như đại đa số các công bố khoa học trước đây (Doan & cs., 2021; Geng & cs., 2015; Hoang & cs., 2019, Kang & cs., 2008; Ohshima & cs., 2008).

### 3.3. Kết quả xây dựng cây phả hệ (Phylogenetic tree)

Một nghiên cứu mới được công bố gần đây của Nguyen & cs., (2021) khi phân tích cây phả hệ dựa trên toàn bộ trình tự nucleotide (nt) của bộ gen của 199 chủng CPV-2 khác nhau phân lập được trong giai đoạn từ năm 1978-2019 cho thấy các chủng CPV-2 trên thế giới được chia thành 2 nhánh chính là nhánh châu Âu và nhánh châu Á. Nhánh chính châu Âu lại được phân nhánh tiếp thành 3 nhánh nhỏ khác nhau là WT-I, WT-II và WT-III và nhánh chính châu Á lại được phân nhánh tiếp thành 4 nhánh nhỏ khác nhau là Asia-1, Asia-2, Asia-3 và Asia-4 (Nguyen & cs., 2021). Kết quả xây dựng cây phả hệ dựa trên toàn bộ trình tự nt của hệ gen cho thấy tất cả 8 chủng CPV-2c trong nghiên cứu này đều thuộc nhánh Asia-4 (Hình 2), cùng nhánh phát sinh với các chủng CPV-2c phân lập được tại Việt Nam trong giai đoạn 2017-2018 (Nguyen & cs., 2021) và chủng CPV/IZSSI/2743/17 (GenBank: MF510157) phân lập tại Ý năm 2017 (Mira & cs., 2018a). Như vậy kết quả xây dựng cây phả hệ trên cơ sở sử dụng toàn bộ trình tự nt của hệ gen của CPV-2 cho thấy tất cả các chủng CPV-2c phân lập được tại Việt Nam trong giai đoạn 2017-2018 (Nguyen & cs., 2021) và các chủng CPV-2c trong nghiên cứu này phân lập được trong giai đoạn 2018-2020 đều thuộc nhánh Asia-4.

Giải mã và phân tích hệ gen của Parvovirus phân lập được trên chó tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam

**Bảng 3. Tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide (NT) (dưới đường chéo) và amino acid (AA) (trên đường chéo) của các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này với các chủng CPV-2 tham chiếu khác**

Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
EU659117/CPV2/USA/1980		99,2	99,0	98,7	98,8	98,8	99,2	99,3	99,4	99,0	98,7	98,7	98,5	99,4	98,6	98,5	98,7	98,7	98,6	98,6	98,5	98,5	
KR002795/CPV-2a/China 2013	99,3		99,6	99,1	99,1	99,1	99,5	99,5	99,5	99,2	99,0	99,0	98,8	99,5	98,9	98,8	99,0	99,0	98,9	98,9	98,8	98,8	
JX660690/CPV2a/China 2011	99,4	99,4		99,2	99,2	99,2	99,3	99,2	99,3	99,3	98,9	98,9	98,8	99,3	98,8	98,8	98,9	98,9	98,8	98,8	98,8	98,8	
LC214970/CPV2a/Vietnam 2013	99,0	99,1	99,4		98,8	98,8	99,0	98,8	99,0	99,0	98,7	98,8	98,7	99,0	98,8	98,7	98,7	98,7	98,6	98,6	98,5	98,5	
JQ686671/CPV2a-new/China 2011	99,1	99,2	99,2	98,9		100	99,1	99,0	99,1	99,7	99,0	98,7	98,8	99,2	98,9	98,8	99,0	99,0	98,9	98,9	98,8	98,8	
KF676668/CPV2a /China 2009	99,1	99,2	99,3	99	99,9		99,1	99,0	99,1	99,7	99,0	98,7	98,8	99,2	98,9	98,8	99,0	99,0	98,9	98,9	98,8	98,8	
MG434745/CPV2a/Italy 2017	99,4	99,4	99,4	99,1	99,1	99,1		99,5	99,5	99,1	99,0	98,8	98,8	99,5	98,9	98,8	99,0	99,0	98,9	98,9	99,0	99,0	
MF177226/CPV2b/Italy 1999	99,6	99,4	99,4	99,0	99,2	99,2	99,5		99,6	99,2	99,0	98,8	98,8	99,5	98,9	98,8	99,0	99,0	98,9	98,9	98,8	98,8	
AY742934/CPV2b/Germany 1995	99,6	99,3	99,4	99,0	99,1	99,1	99,4	99,7		99,4	99,0	99,0	98,9	99,7	99,0	98,9	99,0	99,0	99,0	99,0	98,9	98,9	
JQ268284/CPV2b-new/China 2011	99,2	99,3	99,4	99,2	99,6	99,7	99,2	99,3	99,3		99,0	98,9	98,9	99,3	99,0	98,9	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	98,9	98,9
MF510157/CPV2c/Italy 2017	99,1	99	99,1	98,8	99,1	99,1	99,1	99,2	99,2	99,2		99,7	99,8	99,1	99,9	99,8	100	100	99,9	99,9	99,8	99,8	
LC214969/CPV2c/Vietnam 2013	98,9	98,8	98,9	98,8	98,8	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,7		99,8	99,1	99,7	99,7	99,7	99,7	99,6	99,6	99,5	99,5	
MT106228/CPV2c/Vietnam 2017	98,9	98,8	98,9	98,8	98,9	98,9	98,9	99,0	99,0	99,0	99,8	99,8		99,0	99,9	99,8	99,8	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	
MF177239/CPV-2c/Italy 2001	99,6	99,3	99,3	99,1	99,1	99,1	99,4	99,6	99,6	99,3	99,2	99,0	99,0		99,0	99,0	99,1	99,1	99,0	99,0	99,0	99,0	
VNUA/CPV152 2018*	99,0	99,0	99,0	98,8	99,0	99,0	99,0	99,1	99,1	99,1	99,9	99,7	99,7	99,1		99,9	99,9	99,9	99,8	99,8	99,7	99,7	
VNUA/CPV153 2018*	99,1	99,0	99,0	98,8	99,0	99,0	99,0	99,2	99,1	99,1	99,9	99,7	99,8	99,2	99,9		99,8	99,8	99,7	99,7	99,7	99,7	
VNUA/CPV175 2019*	99,1	99,0	99,0	98,8	99,0	99,1	99,0	99,2	99,1	99,2	99,9	99,6	99,7	99,2	99,9	99,9		100	99,9	99,9	99,8	99,8	
VNUA/CPV376 2019*	99,1	99,0	99,0	98,8	99,0	99,1	99,0	99,2	99,1	99,2	99,9	99,6	99,7	99,2	99,9	99,9	100		99,9	99,9	99,8	99,8	
VNUA/CPV379 2020*	99,0	98,9	99,0	98,7	99,0	99,0	99,0	99,1	99,1	99,1	99,9	99,6	99,7	99,1	99,8	99,8	99,8	99,8		99,8	99,9	99,9	
VNUA/CPV380 2020*	99,1	99,0	99,0	98,8	99,0	99,1	99,0	99,2	99,1	99,2	99,9	99,6	99,7	99,2	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9		99,7	99,7	
VNUA/CPV384 2020*	99,1	98,9	99,0	98,8	99,0	99,0	99,1	99,2	99,1	99,1	99,9	99,6	99,7	99,2	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8		100	
VNUA/CPV385 2020*	99,1	98,9	99,0	98,8	99,0	99,0	99,1	99,2	99,1	99,1	99,9	99,6	99,7	99,2	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	100	

Ghi chú: \* Các chủng virus phân lập được trong nghiên cứu này.

**Bảng 4. So sánh trình tự nucleotide (NT) và axit amin (AA)  
của các chủng CPV-2 trong nghiên cứu này với các chủng CPV-2 tham chiếu khác**

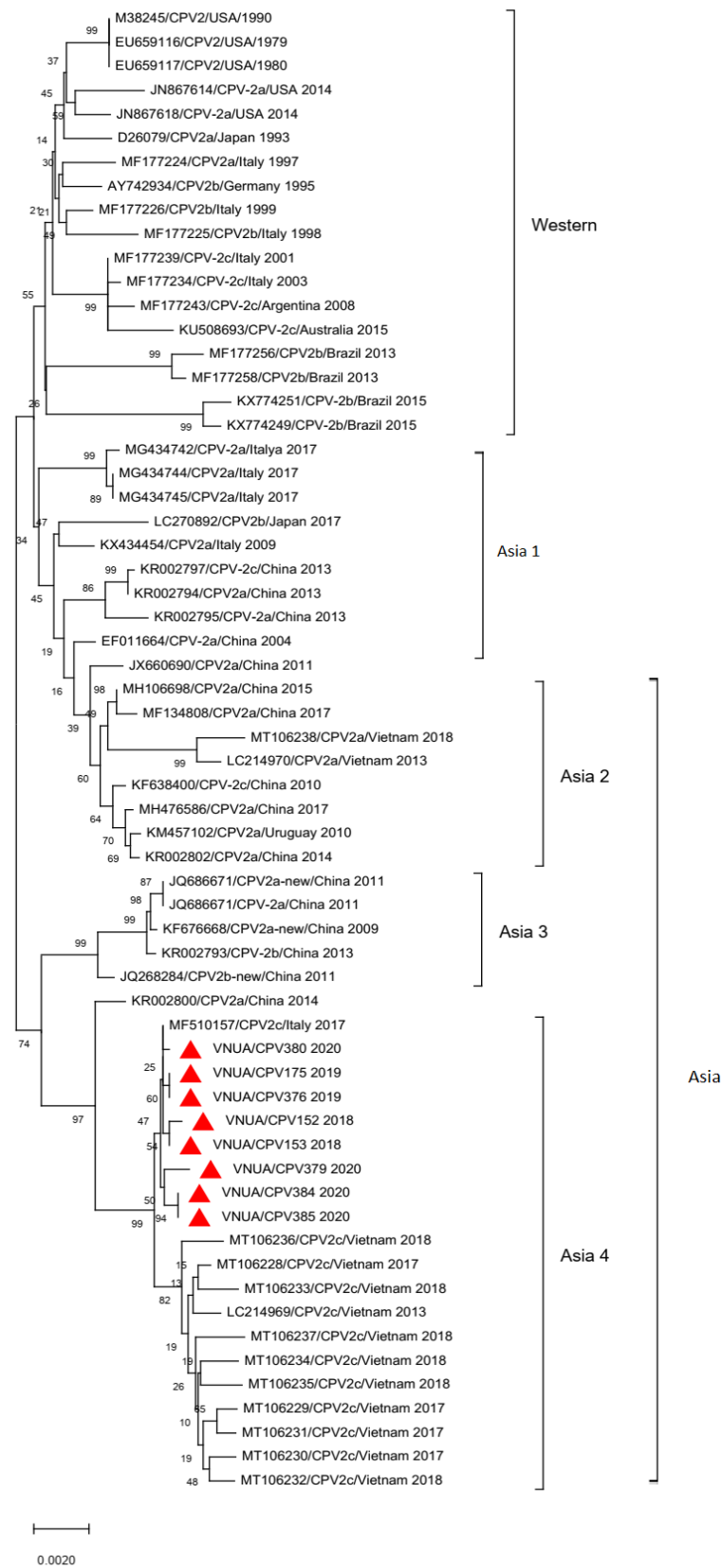
Gen	NS				VP											
					VP1						VP2					
Vị trí Nucleotide	178-180	1630-1632	1633-1635	1888-1890	46-48	91-93	100-102	463-465	13-15	257-259	302-303	799-801	898-900	1108-1110	1276-1278	1339-1341
Vị trí Amino acid	60	544	545	630	16	31	34	155	5	87	101	267	300	370	426	447
EU659117/CPV2/USA/1980	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATA (Met)	ATT (Ile)	TTT (Phe)	GCT (Ala)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
KR002795/CPV-2a/China 2013	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TTT (Phe)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
JX660690/CPV2a/China 2011	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
LC214970/CPV2a/Vietnam 2013	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	ACC (Thr)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
JQ686671/CPV2a-new/China 2011	ATT (Ile)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CTT (Leu)	GTG (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
KF676668/CPV2a/China 2009	ATT (Ile)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CTT (Leu)	GTG (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
MG434745/CPV2a/Italy 2017	ATT (Ile)	TTT (Phe)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TTT (Phe)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	AAT (Asn)	ATA (Ile)
MF177226/CPV2b/Italy 1999	ATT (Ile)	TTT (Phe)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TTT (Phe)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	GAT (Asp)	ATA (Ile)
AY742934/CPV2b/Germany 1995	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTA (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TTT (Phe)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	GAT (Asp)	ATA (Ile)
JQ268284/CPV2b-new/China 2011	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	CTT (Leu)	GTG (Val)	TGT (Cys)	ATA (Ile)	GCC (Ala)	GCA (Ala)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	GAT (Asp)	ATA (Ile)
MF510157/CPV2c/Italy 2017	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	GAA (Glu)	ATA (Ile)
LC214969/CPV2c/Vietnam 2013	GTT (Val)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)
MT106228/CPV2c/Vietnam 2017	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)



Giải mã và phân tích hệ gen của Parvovirus phân lập được trên chó tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam

Gen	NS			VP													
				VP1							VP2						
MF177239/CPV-2c/Italy 2001	ATT (Ile)	TAT (Tyr)	GAA (Glu)	CTT (Leu)	GTG (Val)	TGT (Cys)	GTA (Val)	GCC (Ala)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TTT (Phe)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV152 2018*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CAA (Gln)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV153 2018*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV175 2019*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV376 2019*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV379 2020*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATG (Met)	
VNUA/CPV380 2020*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATA (Ile)	
VNUA/CPV384 2020*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATG (Met)	
VNUA/CPV385 2020*	GTT (Val)	TTT (Phe)	GTA (Val)	CCT (Pro)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GTA (Val)	ACC (Thr)	GGA (Gly)	ATT (Leu)	ACC (Thr)	TAT (Tyr)	GGT (Gly)	CGA (Agr)	GAA (Glu)	ATG (Met)	

Ghi chú: \* Các chủng virus phân lập được trong nghiên cứu.



Ghi chú: Những chủng Parvovirus sử dụng trong nghiên cứu này được đánh dấu hình tam giác màu đỏ.

**Hình 2.** Xây dựng cây phả hệ dựa trên trình tự nt của hệ gen của các chủng virus CPV-2

#### 4. KẾT LUẬN

Đã giải mã thành công trình tự hệ gen của 8 chủng CPV-2 từ mẫu bệnh phẩm của chó mắc bệnh nuôi tại Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Bắc Giang và Hà Nam trong giai đoạn 2018-2020. Trình tự hệ gen thu được của các chủng CPV-2 có chiều dài là 4269 nucleotide (NT), bao gồm hai khung đọc mở (ORF) mã hóa cho NS (2007 nt) và VP (2256 nt), trong đó đoạn gen VP2 có chiều dài 1755 NT. Kết quả phân tích và so sánh về trình tự hệ gen cho thấy 8 chủng virus trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng với nhau về trình tự nt giao động từ 99,8-100% và trình tự amino acid (AA) dao động từ 99,7-100%. Kết quả phân tích trình tự aa và cây phả hệ cho thấy tất cả 8 chủng CPV-2 trong nghiên cứu này đều thuộc chủng CPV-2c, genotype Asia-4. Trình tự hệ gen của 8 chủng CPV-2c trong nghiên cứu đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank, mã số truy cập là OK094438 - OK094445.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Appel M., Cooper B., Greisen H., Scott F. & Carmichael L. (1979). Canine viral enteritis. I. Status report on corona-and parvo-like viral enteritides. *The Cornell veterinarian*. 69(3): 123-133.
- Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N. & Carmichael L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*. 82(12): 3021-3025.
- Charoenkul K., Tangwangvivat R., Janetanakit T., Boonyapisitsopa S., Bunpapong N., Chaiyawong S. & Amonsin, A. (2019). Emergence of canine parvovirus type 2c in domestic dogs and cats from Thailand. *Transboundary and emerging diseases*. 66(4): 1518-1528.
- Chiang S.Y., Wu H.Y., Chiou M.T., Chang M.C. & Lin C.N. (2016). Identification of a novel canine parvovirus type 2c in Taiwan. *Virology journal*. 13(1): 1-7.
- Doan H.T.T., Le X.T.K., Do R.T., Nguyen K.T. & Le T.H. (2021). Canine parvovirus type 2c in Vietnam continues to produce distinct descendants with new mutations restricted to Vietnamese variants. *Archives of Virology*. pp. 1-9.
- Geng Y., Guo D., Li C., Wang E., Wei S., Wang Z., Yao S., Zhao X., Su M., Wang X., Wang J., Wu R., Feng L. & Sun D. (2015). Co-Circulation of the Rare CPV-2c with Unique Gln370Arg Substitution, New CPV-2b with Unique Thr440Ala Substitution, and New CPV-2a with High Prevalence and Variation in Heilongjiang Province, Northeast China. *PLoS One*. 10(9): e0137288.
- Guo L., Yang S.I., Wang C.d., Hou R., Chen S.j., Yang, X.n., Zhang M.I. (2013). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. *Virology journal*. 10(1): 1-7.
- Hayes M., Russel R., Mueller R. & Lewis R. (1979). Myocarditis in young dogs associated with a parvovirus-like agent. *The Canadian Veterinary Journal*. 20(5): 126.
- Hoang M., Lin W.H., Nga B.T.T., Chiou M.T. & Lin C.N. (2019). Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Vietnam from November 2016 to February 2018. *Virology journal*. 16(1): 1-11.
- Kang B.K., Song D.S., Lee C.S., Jung K.I., Park S.J., Kim E.M. & Park B.K. (2008). Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea. *Virus genes*. 36(1): 127-133.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 35(6): 1547.
- Lin Y.C., Chiang S.Y., Wu H.Y., Lin J.H., Chiou M.T., Liu H.F. & Lin C.N. (2017). Phylodynamic and genetic diversity of canine parvovirus type 2c in Taiwan. *International journal of molecular sciences*. 18(12): 2703.
- Mira F., Dowgier G., Purpari G., Vicari D., Di Bella S., Macaluso G., Gucciardi F., Randazzo V., Decaro N. & Guercio A. (2018a). Molecular typing of a novel canine parvovirus type 2a mutant circulating in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*. 61: 67-73.
- Mira F., Purpari G., Lorusso E., Di Bella S., Gucciardi F., Desario C., Macaluso G., Decaro N. & Guercio A. (2018b). Introduction of Asian canine parvovirus in Europe through dog importation. *Transboundary and emerging diseases*. 65(1): 16-21.
- Moon B.Y., Jang J., Kim S.H., Kim Y.H., Lee H.K., So B., Park C.K. & Lee K.K. (2020). Genetic characterization of canine parvovirus type 2c from domestic dogs in Korea. *Transboundary and emerging diseases*. 67(4): 1645-1653.
- Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., Mochizuki M., Phung H.T.T., Nguyen N.H. Huynh L.M.T., Nguyen L.T., Nguyen P.N., Nguyen P.V., Nguyen N.P.T., Akashi H. (2004). A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of Virology*. 149(11): 2261-2269.

- Nguyen Manh T., Piewbang C., Rungsipipat A. & Techangamsuwan S. (2021). Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2C originated from dogs reveals a new Asia-IV clade. *Transboundary and emerging diseases*.
- Niskanen E.A., Ihalainen T.O., Kalliolinna O., Häkkinen M.M., Vihinen-Ranta M. (2010). Effect of ATP binding and hydrolysis on dynamics of canine parvovirus NS1. *Journal of virology*. 84: 5391-5403.
- Niskanen E.A., Kalliolinna O., Ihalainen T.O., Häkkinen M., Vihinen-Ranta M. (2013). Mutations in DNA binding and transactivation domains affect the dynamics of parvovirus NS1 protein. *Journal of virology*. 87: 11762-11774.
- Ohshima T., Hisaka M., Kawakami K., Kishi M., Tohya Y. & Mochizuki M. (2008). Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(8): 769-775.
- Parrish C.R., Aquadro C.F., Strassheim M., Evermann J., Sgro J. & Mohammed H. (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*. 65(12): 6544-6552.
- Reed A.P., Jones E.V. & Miller T.J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of virology*. 62(1): 266-276.
- Simpson A.A., Chandrasekar V., Hebert B., Sullivan G.M., Rossmann M.G. & Parrish C.R. (2000). Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *Journal of Molecular Biology*. 300(3): 597-610.
- Truyen U. & Parrish C.R. (1992). Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: Distinct host cell tropisms of each virus *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Virology*. 66(9): 5399-5408.
- Vickers N.J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current Biology*. 27(14): R713-R715.
- Wang D., Yuan W., Davis I. & Parrish C.R. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology*. 240: 273-281.
- Wang J., Lin P., Zhao H., Cheng Y., Jiang Z., Zhu H., Wu H. & Cheng S. (2016). Continuing evolution of canine parvovirus in China: isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP2 protein. *Infection, Genetics and Evolution*. 38: 73-78.
- Zhao H., Wang J., Jiang Y., Cheng Y., Lin P., Zhu H., Han G., Yi L., Zhang S., Guo L. & Cheng S. (2017). Typing of canine parvovirus strains circulating in North-East China. *Transboundary and emerging diseases*. 64(2): 495-503.