

# USO DI UNA DUPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION PER LA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA HERPESVIRUS FELINO E CHLAMYDOPHILA SPP. IN TAMPONI MUCOSALI DI GATTI

MARSILIO FULVIO, DI MARTINO BARBARA

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete  
Università degli Studi di Teramo

## Riassunto

Quaranta tamponi oculari e trentasette tamponi faringei provenienti da 40 gatti con sintomatologia respiratoria a carico delle prime vie respiratorie, sono stati esaminati tramite una duplex-PCR al fine di valutare la presenza dell'herpesvirus felino di tipo 1 e di *Chlamydophila spp.* I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i due patogeni sono presenti nella popolazione di gatti sottoposta ad indagine e che per la diagnosi di certezza di queste infezioni è necessario il prelievo di entrambi i tamponi. Infine, tutti i ceppi di *Chlamydophila spp.* sono stati sottoposti ad analisi con enzimi di restrizione e si sono dimostrati appartenere alla specie *Chlamydophila felis*.

## Summary

Forty ocular and thirty-seven pharyngeal swabs collected from 40 cats with respiratory syndrome, were analyzed by a duplex-PCR to evaluate the presence of feline herpesvirus type 1 and *Chlamydophila spp.* The results outline both pathogens are in the populations of cats and it is necessary to collect both swabs for definitive diagnosis. At the end, all *chlamydophila* strains analyzed by endonuclease restriction were classified as *Chlamydophila felis*.

## INTRODUZIONE

Le patologie respiratorie sono particolarmente diffuse nella popolazione di gatti e spesso risultano associate all'intervento di più patogeni; tra questi, prevalgono l'*Herpesvirus felino di tipo 1* (FHV-1), la *Chlamydophila spp.* e il *Calicivirus felino* (FCV); mentre, probabili microrganismi di irruzione secondaria, sono i virus parainfluenzali, reovirus, *Mycoplasma spp.*, *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*<sup>1</sup>.

Alcuni studi epidemiologici hanno dimostrato che FHV-1 può essere causa di sindrome respiratoria nel 17,3% dei casi<sup>2</sup> e che in una recente indagine condotta in Giappone, l'agente infettivo più comunemente associato a U.R.T.D. (Upper Respiratory Tract Disease) è risultato *Chlamydophila felis* con una prevalenza del 59%<sup>3</sup>.

La diagnosi di certezza di herpesvirosi e di chlamydo-filosi felina prevede l'isolamento dei rispettivi agenti eziologici, in quanto il solo esame sierologico non permette di distinguere gli animali infetti da quelli vaccinati. Per quanto riguarda FHV-1 l'isolamento in coltura cellulare viene facilmente eseguito anche se alcuni soggetti risultano negativi per l'esigua quantità di virus presente nel tampone oculare o faringeo oppure per la presenza nei liquidi extra-cellulari di anticorpi in grado di bloccare la replicazione *in vitro* del virus oppure per la contemporanea presenza nel campione di FCV che potrebbe mascherare l'effetto citopatico indotto da FHV-1. Per la *Chlamydophila felis* a questi problemi si aggiunge anche l'oggettiva difficoltà dell'isolamento che può essere eseguito solo attraverso l'inoculazione delle uova embrionate di pollo.

Per ovviare a questi inconvenienti è utile ricorrere alle tecniche di biologia molecolare quali la polymerase chain reaction la quale è in grado di mettere in evidenza specifiche sequenze di DNA. Inoltre, dagli amplificati è possibile, dopo trattamento con enzimi di restrizione, procedere

<sup>1</sup> "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 5/3/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 23/6/2003".

alla speciazione delle chlamydofile. Ciò è particolarmente utile al fine di valutare dal punto di vista epidemiologico le specie più prevalenti nel territorio sottoposto ad indagine.

Scopo del presente lavoro è, da un lato, riportare i risultati di uno studio eseguito su una popolazione di 40 gatti con sintomi riferibili a U.R.T.D. al fine di valutare la prevalenza di due degli agenti patogeni più comunemente associati alle infezioni respiratorie del gatto utilizzando come test diagnostico una duplex PCR specifica per *FHV-1* e *Chlamydomphila spp.* e, dall'altro, eseguire tramite enzimi di restrizione la speciazione dei ceppi di chlamydomphila.

## MATERIALI E METODI

### a) Campioni mucosali

Nel periodo compreso tra ottobre 2002 e gennaio 2003 sono stati prelevati 40 campioni mucosali costituiti ciascuno, da un tampone faringeo ed un tampone congiuntivale, provenienti da gatti con sintomatologia respiratoria riferibile a U.R.T.D. I campioni sono stati raccolti presso ambulatori privati e pubblici delle province di Isernia, Ascoli Piceno e Teramo. Al momento del prelievo, per ogni gatto in esame è stata compilata una scheda di rilevamento anamnestica in cui sono state raccolte informazioni relative al tipo di tampone prelevato, alla sintomatologia in atto e ad eventuali trattamenti farmacologici o vaccinali. Da 3 gatti non è stato possibile eseguire il tampone faringeo.

I 77 campioni sono stati collezionati utilizzando degli appositi tamponi sterili immersi subito dopo il prelievo in terreno D-MEM addizionato di antibiotici; quindi sono stati mantenuti durante il trasporto al laboratorio a temperatura di +4°C ed ivi giunti, conservati a -80°C fino al momento dell'esecuzione della prova.

### b) Estrazione degli acidi nucleici

Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato utilizzato il kit QIAamp UltraSens Virus (Qiagen), in grado di estrarre sia DNA che RNA da liquidi poveri di cellule. La metodologia utilizzata è quella consigliata dalla Ditta Produttrice. In breve, ciascun campione raccolto in provette *Rnasi e Dnase free*, è stato dapprima sottoposto a trattamento con proteinasi K addizionata del Buffer AR e successivamente trasferito all'interno di un'apposita colonnina provvista di una membrana al silicio in grado di legare selettivamente gli acidi nucleici. I contaminanti e gli inibitori enzimatici eventualmente presenti, sono stati allontanati lavando la membrana con i tamponi AW1 e AW2 e infine il DNA estratto è stato eluito in 30 µl di tampone AVE.

I campioni così trattati sono stati sottoposti dapprima alle singole PCR specifiche per FHV-1 e *Chlamydomphila spp.* e successivamente alla duplex-PCR.

### c) PCR singola specifica per FHV-1

La sequenza bersaglio per la reazione di amplificazione per FHV-1 ha una lunghezza di 321 bp ed è inclusa nel gene TK che codifica per l'enzima timidino-chinasi<sup>13</sup>.

Le coppie di primers impiegate nella reazione sono le seguenti:

- i) FHV-F: 5'-TGT CCG CAT TTA CAT AGA TGG-3' sense primer;
- ii) FHV-R: 5'-GGG GTG TTC CTC ACA TAC AA-3' antisense primer.

La reazione di amplificazione del frammento bersaglio è stata allestita in 50 µl di volume totale contenente DNA campione nella quantità di 2 µl, Buffer 1X, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 200 µM di ciascuna base azotata, 2,5 Unità di AmpliTaq Gold polimerasi (Applied Biosystems), 0,02 µM di FHV-F e 0,02 µM di FHV-R. La miscela di reazione è stata sottoposta ad una fase di attivazione enzimatica a 94°C per 10 minuti, a 35 cicli di denaturazione a 94°C per 60 secondi, annealing a 58°C per 60 secondi, estensione a 72°C per 60 secondi e a una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti. Come campione positivo è stato utilizzato un ceppo di campo di FHV-1 isolato precedentemente.

### d) PCR singola specifica per *Chlamydomphila felis*

La sequenza bersaglio per la reazione di amplificazione per *Chlamydomphila spp.* è rappresentata da un frammento di lunghezza di 590 bp comune a tutte le specie di *Chlamydomphila spp.*<sup>4</sup>, incluso nel gene OMP2 che codifica per la proteina esterna di membrana.

Le coppie di primers impiegate nella reazione sono le seguenti:

- i) Chla AF : 5'-ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3' sense primer;
- ii) Chla AR: 5'-CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA-3' antisense.

La miscela di reazione è stata preparata in 50 µl di volume totale costituito da DNA campione nella quantità di 2 µl, Buffer 1X, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 200 µM di ciascuna base azotata, 2,5 Unità di AmpliTaq Gold polimerasi (Applied Biosystems), 0,2 µM di Chla-AF e 0,2 µM di Chla-AR.

Dopo attivazione enzimatica a 94°C per 10 minuti, la miscela è stata sottoposta a 35 cicli di denaturazione a 94°C per 60 secondi, annealing a 56°C per 60 secondi e estensione a 72°C per 60 secondi, seguiti da una estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Come campione positivo è stato utilizzato un estratto di DNA di *Chlamydomphila felis* gentilmente fornito dal dr. Chris Helps dell'Università di Bristol (UK).

### e) Duplex-PCR per *Chlamydomphila spp.* e FHV-1

Le sequenze bersaglio così come le coppie di primers utilizzati nella reazione sono quelle già descritte nelle singole PCR.

L'amplificazione contemporanea dei due frammenti bersaglio è stata eseguita in un volume totale di 50 µl contenente DNA campione nella quantità complessiva di 4 µl, buffer HotMaster Taq 1X, 200 µM di ciascuna base azotata, 2,5 Unità di HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf), 0,04 µM di FHV-F e FHV-R e 0,2 µM di Chla-AF e Chla-AR. La miscela di reazione è stata sottoposta a 35 cicli di denaturazione a 94°C per 60 secondi, annealing a 58°C per 60 secondi, estensione a 72°C per 60 secondi e

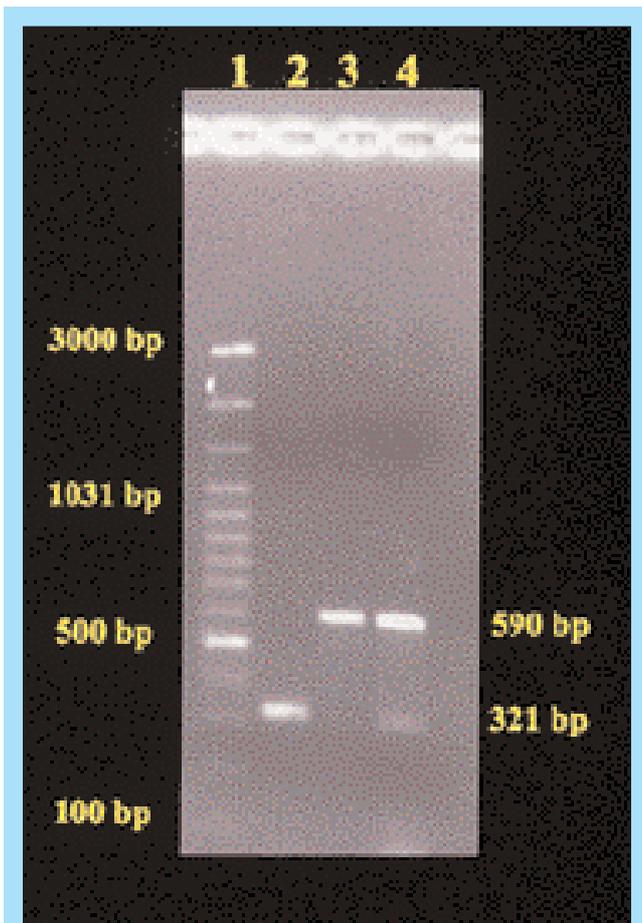


FIGURA 1 - PCR-duplex per FHV-1 e *Chlamydomphila* spp.  
 Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder PlusP (MBI Fermentas GmbH, Germania). Corsia 2: PCR per FHV-1 (amplificato di 321 bp).  
 Corsia 3: PCR per *Chlamydomphila* spp. (amplificato di 590 bp). Corsia 4: PCR-duplex.

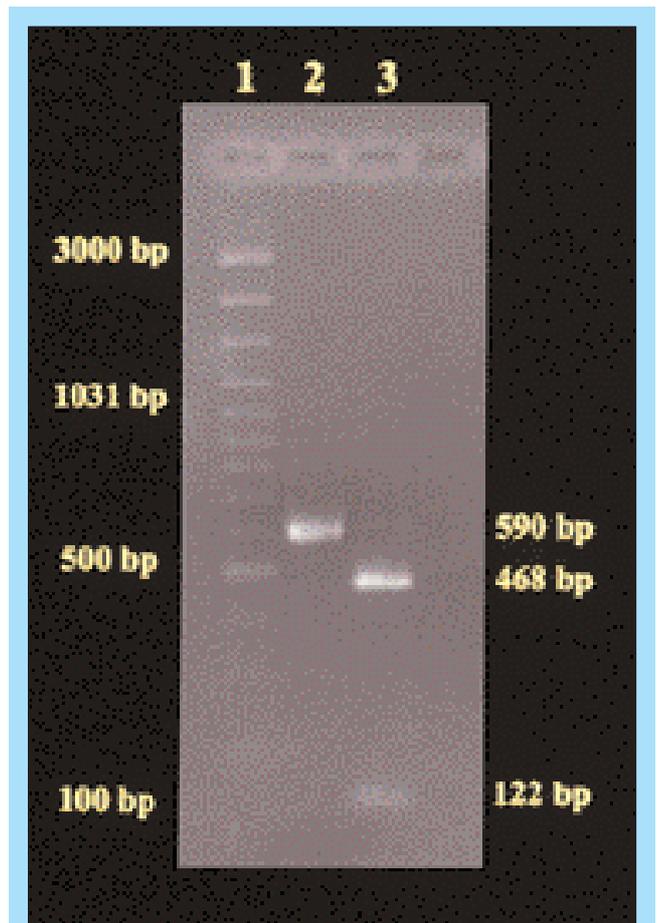


FIGURA 2 - Pattern di restrizione di *Chlamydomphila felis*.  
 Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder PlusP (MBI Fermentas GmbH, Germania). Corsia 2: amplificato di *Chlamydomphila* spp. (590 bp).  
 Corsia 3: amplificato di *Chlamydomphila* spp. digerito con HINDIII (468 bp e 122 bp) e specifico per *Chlamydomphila felis*.

ad una fase di estensione finale a 72°C per 7 minuti. La visualizzazione degli amplificati è avvenuta mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2%, colorazione con etidio bromuro e illuminazione con luce ultravioletta (Fig. 1).

#### f) PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP)

L'identificazione di specie dei campioni positivi per *Chlamydomphila* spp., è stata eseguita attraverso l'analisi di restrizione dei prodotti di PCR, utilizzando l'enzima HINDIII (Biolabs, New England). Quest'ultimo, infatti, riconoscendo la sequenza A<sub>1</sub>AGCTT, è in grado di tagliare l'amplificato positivo per *Chlamydomphila felis* in due frammenti rispettivamente di 122 bp e 468 bp, differenziando così quest'ultima da tutte le altre specie.

La digestione enzimatica è avvenuta attraverso incubazione per 2 h a 37 °C, in un volume totale di 20 µl costituiti da 10 µl del prodotto di PCR, 1 Unità di enzima HINDIII, 2 µl di 10X buffer e 8 µl di acqua.

I prodotti digeriti sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 3% (Applied Biosystem), colorazione con etidio bromuro e visualizzazione al transilluminatore UV (Fig. 2).

#### g) Prova di sensibilità delle PCR

Al fine di valutare la sensibilità delle tecniche allestite, sono state eseguite delle diluizioni scalari in base 10 dei DNA provenienti da un ceppo di FHV-1 e da un ceppo di *Chlamydomphila* spp. (concentrazione iniziale di 172 ng/µl per FHV-1 e di 48 ng/µl per *Chlamydomphila* spp.). Ogni diluizione è stata quantificata allo spettrofotometro ed utilizzata sia in singola che in duplex-PCR. La sensibilità è stata determinata come la più alta diluizione in grado di fornire un amplificato visibile al transilluminatore<sup>13</sup>.

#### RISULTATI

I risultati delle prove eseguite nelle singole e nella duplex-PCR per la diagnosi delle infezioni sostenute da FHV-1 e *Chlamydomphila* spp. su 77 tamponi congiuntivali e faringei, provenienti da 40 gatti, sono riportati in Tabella 1. Più in particolare, sono risultati positivi per FHV-1 24 tamponi congiuntivali pari al 60% di quelli esaminati e 21 tamponi faringei pari al 56,70%, mentre per *Chlamydomphila* spp. solo 9 tamponi congiuntivali pari al 22,50%. Inoltre, otto animali hanno mostrato positività per entrambi i patogeni. È importante sottolineare che i tamponi risultati

**Tabella 1**  
Risultati dell'applicazione delle singole PCR e duplex PCR FHV-1 e *Chlamydomphila* spp. sui campioni mucosali

Tamponi	N° tamponi	PCR FHV-1	PCR <i>Chlamydomphila</i> spp	Duplex PCR	
				<i>Chlamydomphila</i> spp	FHV-1
Congiuntivale	40	24	9	9	24
Faringeo	37	21	0	0	21

**Tabella 2**  
Suddivisione dei campioni mucosali positivi FHV-1 in base all'avvenuta vaccinazione

Gatti	Numero campioni	PCR FHV-1 Tamponi oculare	PCR FHV-1 Tamponi faringeo
Vaccinati	14	4	3
Non vaccinati	26	21	20

**Tabella 3**  
Suddivisione dei campioni mucosali positivi a *Chlamydomphila* spp. in base ai trattamenti antibiotici

Gatti	Numero campioni	PCR Chlam Tamponi oculare	PCR Chlam Tamponi faringeo
Trattati	13	2	0
Non trattati	27	7	0

positivi alle singole PCR sono risultati positivi alla PCR-duplex per gli stessi patogeni.

Le diluizioni seriali di FHV-1 e di *Chlamydomphila* spp. hanno dimostrato che sia le singole che la duplex-PCR sono in grado di individuare  $\geq 10$  copie del genoma virale e  $\geq 69$  copie di quello batterico<sup>13</sup>.

Dei 40 gatti esaminati, 14 erano stati sottoposti a vaccinazione nei confronti di FHV-1, mentre nessuno nei confronti di *Chlamydomphila* spp. I risultati ottenuti, suddividendo i campioni a seconda dell'avvenuta vaccinazione nei confronti di FHV-1 (Tab. 2), rivelavano che la maggior parte dei tamponi positivi (21/26) proveniva da animali non sottoposti a vaccinazione ( $\chi^2 = 10,58$ ;  $P = 0,0011$ ).

Per quanto riguarda *Chlamydomphila* spp. (Tab. 3) il numero più alto di tamponi positivi (7/27) proveniva da soggetti non sottoposti a terapia antibiotica specifica ( $\chi^2 = 0,5592$ ;  $P = 0,4546$ ).

Un altro aspetto interessante riguarda il tipo di tampone prelevato. Mentre per *Chlamydomphila* spp. tutti i tamponi positivi sono risultati solo quelli oculari, per FHV-1 la situazione è più articolata. Infatti 3 sono risultati positivi solo al tampone faringeo, 4 solo a quello oculare e 18 ad entrambi.

Per 3 animali non è stata possibile la raccolta del tampone faringeo. Ad ogni modo 2 di questi soggetti hanno mostrato positività al tampone oculare.

Infine, l'analisi di restrizione eseguita su tutti gli amplificati positivi per *Chlamydomphila* spp. condotta con l'enzima HINDIII, ha mostrato lo stesso pattern di reazione per tutti gli amplificati e quindi ha rivelato l'appartenenza dei nove ceppi alla specie *Chlamydomphila felis*.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati che scaturiscono da questa indagine permettono di evidenziare innanzitutto come le infezioni da FHV-1 e *Chlamydomphila* spp. risultino presenti nei tamponi mucosali provenienti da gatti con sintomatologia respiratoria residenti nelle diverse aree geografiche oggetto dell'indagine.

Come già accennato, nel corso di un recente studio epidemiologico condotto in Giappone<sup>3</sup>, è stato dimostrato che l'agente infettivo più frequentemente associato a U.R.T.D. è rappresentato da *Chlamydomphila felis* con una prevalenza del 59%; al contrario, nel corso della nostra indagine, l'infezione maggiormente presente risulta essere quella sostenuta da *feline herpesvirus 1* con una prevalenza del 60% sui tamponi oculari e del 56,70% sui tamponi faringei; mentre, soltanto il 22,50% dei tamponi oculari esaminati, risulta positivo all'infezione da *Chlamydomphila* spp. I nostri risultati si discostano anche da quelli ottenuti in un precedente studio condotto in Italia<sup>5</sup>, nel corso del quale la presenza delle infezioni sostenute da FHV-1 e *Chlamydomphila* spp., riferita ai soli soggetti sintomatici, è risultata pari rispettivamente al 20% e al 40%.

Relativamente a quest'ultima indagine, la discordanza dei dati ottenuti, potrebbe essere attribuibile alle caratteristiche della popolazione di gatti esaminata. Infatti, mentre nell'indagine condotta da Di Francesco *et al.* (2001)<sup>5</sup> è stata esaminata una colonia proveniente dallo stesso gattile e costituita prevalentemente da animali sottoposti ad un intervento vaccinale, nel nostro caso, è stata analizzata una popolazione abbastanza eterogenea, in quanto proveniente da diverse aree geografiche e costituita per il 67,50% da soggetti mai precedentemente immunizzati.

Altrettanto non si può dire per la sperimentazione condotta in Giappone<sup>3</sup>, dove peraltro non sono riportate informazioni riguardanti eventuali trattamenti immunizzanti.

Per quanto riguarda l'infezione duplice da parte di FHV-1 e *Chlamydomphila* spp. è interessante notare l'associazione di entrambi i patogeni in otto gatti, pari al 20% di quelli esaminati. L'infezione contemporanea da parte di entrambi i patogeni risulta un evento comune nella popolazione esaminata in Giappone (10,60%)<sup>3</sup> (Cai *et al.*, 2002), mentre appare meno frequente in Australia (0,6%) e in USA (1,6%)<sup>6,7</sup>. Tuttavia, il dato particolar-

mente interessante rilevato nel corso della nostra indagine è rappresentato dalla positività nei confronti di *Chlamydophila spp.*, quasi sempre associata all'infezione da FHV-1, fatta eccezione per un caso, dove si osserva la singola positività.

Per quanto riguarda i quattro gatti sottoposti a regolare vaccinazione e risultati positivi all'infezione da FHV-1, le ricerche condotte in proposito<sup>8</sup>, hanno dimostrato che la vaccinazione di gatti SPF, successivamente sottoposti a *challenge* con ceppi selvaggi FHV-1, non è sempre in grado di prevenire l'infezione e l'eliminazione del virus nell'ambiente. Nell'indagine da noi condotta è stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi di animali, dimostrando l'utilità della vaccinazione nella profilassi di questa infezione.

Per quanto concerne la positività riscontrata nei confronti di *Chlamydophila spp.* è importante sottolineare che il numero più alto di tamponi positivi, proveniva da gatti non sottoposti a trattamenti terapeutici (7/27); nei soggetti trattati (13/40), la cui anamnesi riferiva che il problema primario era rappresentato dalla congiuntivite, l'infezione è stata diagnosticata soltanto in due casi (2/13). La possibile efficacia di un eventuale trattamento antibiotico nei gatti infetti, anche se avvalorata da altri Autori<sup>9</sup>, non è stata dimostrata nella nostra indagine probabilmente per l'esiguo numero di campioni.

Un altro aspetto interessante, è quello relativo al tipo di tampone da inviare in laboratorio. Infatti, va sottolineato che mentre per *Chlamydophila spp.*, la positività è stata riscontrata soltanto a partire dai tamponi congiuntivali, nel caso di FHV-1 l'infezione è stata diagnosticata su entrambi i tipi di tampone. Tuttavia, dal momento che in 4 soggetti la positività è stata ottenuta solo sul tampone oculare, così come in 3 casi a partire dal tampone faringeo, si deduce che un approccio diagnostico corretto deve prevedere l'invio in laboratorio di entrambi i tamponi, al fine di eseguire una diagnosi di certezza.

La reazione di PCR per la ricerca di *Chlamydophila spp.* è stata allestita utilizzando una coppia di primers complementare a parte del gene OMP2 ed in grado di amplificare un tratto genomico comune a tutte le specie di *Chlamydophila spp.*<sup>4</sup>. L'applicazione di una metodica in grado di identificare anche soggetti eventualmente infettati con altre specie, scaturisce da alcuni studi sierologici condotti a riguardo<sup>10</sup>, nel corso dei quali è stato dimostrato che il gatto risulta recettivo a diverse specie di *Chlamydophila spp.*; inoltre, altri Autori<sup>11</sup> riferiscono della possibile trasmissione di *C. psittaci* da uccelli portatori al gatto. L'analisi di restrizione applicata successivamente agli amplificati positivi, ha permesso di evidenziare una sostanziale uniformità dei nove ceppi, e quindi, identificabili tutti, come appartenenti alla specie *Chlamydophila felis*.

La corrispondenza dei risultati ottenuti tra le singole PCR specifiche per ciascun patogeno e la duplex, dimostra che quest'ultima possiede caratteristiche diagnostiche identiche alle singole applicazioni. L'uso di un unico test in grado di evidenziare simultaneamente entrambi i pato-

geni, assume particolare importanza, dato che permette di effettuare una diagnosi più precoce, utilizzando una metodica che, rispetto alle tecniche tradizionali, risulta dotata di maggiore sensibilità e specificità<sup>8,12</sup>.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il sig. Ottavio Palucci per l'eccellente assistenza tecnica. Inoltre, un doveroso grazie va al prof. Andrea Boari e ai dottori Paolo Accica, Claudio D'Antonio e Luigi Grosso per averci aiutato nella raccolta dei campioni.

## Parole chiave

Gatto, herpesvirus, chlamydiafilosi, diagnosi, duplex-PCR.

## Key words

Cat, herpesvirosis, chlamydiafilosis, diagnosis, duplex-PCR.

## Bibliografia

- Gaskell R, Dawson S: Feline Respiratory disease. In: Infectious Diseases of the dog and cat. Greene C.E. (ed), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, pp. 97-106.
- Sykes JE, Allen JL, Studdert VP, et al: Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and Chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet. Microbiol.*, 81: 95-108, 2001.
- Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, et al: An Etiological Investigation of Domestic Cats with Conjunctivitis and Upper respiratory Tract Disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 64: 215-219, 2002.
- Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, et al: PCR Detection and Molecular Identification of Chlamydiae species. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3072-3079, 2001.
- Di Francesco A, Carelle MS, Balzelli R: Evidenziazione del DNA di Chlamydia psittaci e herpesvirus felino tipo 1 mediante Polymerase Chain reaction (PCR). *Summa*, 8: 51-54, 2001.
- Mard PN, James SJ, Jerry BS, et al: Clinical and laboratory findings in chronic conjunctivitis in cats. *JAVMA*, 203: 834-837, 1993.
- Sykes JE, Anderson GA, Studdert VP, et al: Prevalence of feline Chlamydia psittaci and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. *J.Vet. Intern. Med.*, 13: 153-162, 1999.
- Sykes JE, Browning GF, Anderson G, et al: Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. *Arch. Virol.*, 142: 65-74, 1997.
- Nelson RW, Couto GC: Afezioni delle cavità nasali. In: Medicina Interna del cane e del gatto. Nelson R.W., Couto G.C. (Ed), Masson, EV, pp.163-172, 1995.
- Pudjiamoko S, Fukushi H, Ochai Y, et al: Seroepidemiology of feline chlamydiosis by microimmunofluorescence assay with multiple strains as antigens. *Microbiol. Immunol.*, 40: 755-759, 1996.
- Lipman NS, Yan LL, Murphy JC: Probable transmission of Chlamydia psittaci from a macaw to a cat. *JAVMA*, 204: 1479-1483, 1996.
- Sykes JE, Studdert VP, Browning GF: Comparison of the polymerase chain reaction and culture for the detection of feline Chlamydia psittaci in untreated and doxycycline treated experimentally infected cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 13: 146-152, 1999.
- Weigler BJ, Babineau CA, Sherry B, et al.: High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent Feline Herpesvirus-1 in domestic cats. *Vet. Rec.*, 140: 335-338, 1997.