

DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA CALICIVIRUS DEL GATTO MEDIANTE NESTED-PCR

BARBARA DI MARTINO, FULVIO MARSILIO

Dipartimento di Scienze Biomediche Compare - Università degli Studi di Teramo - Piazza Aldo Moro, 45 - Teramo

NICOLA DECARO, CANIO BUONAVOGLIA

Dipartimento di Sanità, Patologia, Farmaco-Tossicologia e Benessere degli Animali - Str. prov. per Casamassima km 3 - Valenzano (BA)

Riassunto

È stata allestita una nested-RT-PCR per la diagnosi di calicivirosi nel gatto; il test viene eseguito in due fasi rappresentate da una one-step RT-PCR e una nested-PCR. La metodica è stata applicata su quarantasette tamponi congiuntivali e quaranta tamponi faringei provenienti da n° 47 gatti con sintomatologia respiratoria; tra gli 87 campioni in esame 18 tamponi congiuntivali e 23 tamponi faringei sono risultati positivi in n-PCR. La sensibilità della n-PCR è stata comparata con altre tecniche diagnostiche quali l'isolamento su colture cellulari e l'RT-PCR; i risultati ottenuti hanno evidenziato che la nested-PCR possiede una sensibilità maggiore della prova di isolamento su colture cellulari e della RT-PCR e che può essere utilizzata per la diagnosi di infezione da FCV nei gatti.

Summary

A diagnostic test for feline calicivirus infection based on a nested polymerase chain reaction (n-PCR) assay was developed; the assay was carried out in two phases represented by one-step RT-PCR and nested-PCR. The test was applied on forty-seven ocular and forty pharyngeal swabs collected from 47 cats with respiratory syndrome; of 87 samples examined 18 ocular and 23 pharyngeal swabs resulted positive in n-PCR assay. The sensitivity of n-PCR was compared with other diagnostic techniques, such as virus isolation using CrFK cell line and RT-PCR; the results outline n-PCR has a higher sensitivity than isolation on cell culture and RT-PCR and can therefore be used for the diagnosis of FCV infections in cats.

INTRODUZIONE

Il *calicivirus felino* (FCV) è uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni delle prime vie respiratorie (U.R.T.D. = *Upper Respiratory Tract Disease*) del gatto ed in particolare per gli animali che vivono in colonie¹. Ciò è dovuto a due motivi principali:

- presenza di animali portatori: i soggetti guariti possono rimanere eliminatori persistenti di virus anche per anni²;
- capacità di FCV di resistere in ambiente esterno³.

L'infezione da FCV, sebbene possa decorrere anche in forma subclinica, nella maggior parte dei casi si manifesta in forma acuta determinando la comparsa di sintomi a carico delle vie respiratorie superiori (starnuti, scolo nasale e congiuntivite). Spesso si osservano ulcerazioni del cavo orale, gengiviti croniche ed una forma transitoria di zoppia⁴; generalmente la malattia ha un decorso benigno ed eventuali complicazioni possono derivare da contempo-

ranee infezioni con virus immunosoppressori quali il virus dell'immunodeficienza felina (FIV) ed il virus della leucemia felina (FeLV) o con batteri di irruzione secondaria.

La diagnosi di certezza di calicivirosi non può essere emessa soltanto sulla base dell'anamnesi e del riscontro clinico, a causa della mancanza di segni clinici considerabili patognomonici che permettano di differenziare FCV da altri agenti infettivi responsabili di patologie respiratorie. Il ricorso ad esami specifici di laboratorio è finalizzato all'identificazione del patogeno mediante l'isolamento su colture cellulari, le tecniche di immunofluorescenza e l'amplificazione degli acidi nucleici tramite la *polymerase chain reaction* (PCR). L'isolamento virale a partire da tamponi nasali, congiuntivali e orofaringei risulta facilmente eseguibile, anche se a volte si possono avere false negatività conseguenti, ad esempio, ad un'esigua quantità di virus presente nel campione di partenza o alla presenza nei liquidi extracellulari di anticorpi che inibiscono la replicazione del virus *in vitro*. L'immunofluorescenza finalizzata all'evidenziazione diretta del patogeno è considerata meno sensibile rispetto all'isolamento soprattutto in corso di infezioni cronicizzate o recrudescenti, mentre risulta atten-

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 1/9/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 26/1/2004".

dibile per l'identificazione degli stipiti virali cresciuti su colture cellulari⁵.

Relativamente alle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici, è bene considerare che, nel caso dei virus a RNA, la sensibilità della reverse transcriptase (RT)-PCR convenzionale nell'individuare anche esigue quantità di virus nei campioni mucosali, può subire una riduzione conseguente sia alla presenza di ribonucleasi nelle secrezioni mucosali in grado di degradare l'RNA, sia alla variabilità genomica tipica di questi virus^{6,7}. Un aumento della sensibilità può essere ottenuto con la nested RT-PCR, come proposto da Radford *et al.*⁸.

Scopo del presente lavoro è di riportare i risultati dell'allestimento ed applicazione di una one-step nested RT-polymerase chain reaction per la diagnosi di FCV eseguita su tamponi congiuntivali e faringei provenienti da gatti con sintomatologia respiratoria. È stata, inoltre, comparata la sensibilità della metodica con le tecniche tradizionali quali l'isolamento virale e la successiva identificazione mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) ed RT-PCR.

MATERIALI E METODI

a) Stipite virale e linea cellulare

Per l'allestimento della metodica è stato utilizzato il ceppo vaccinale F9 di FCV coltivato su linea cellulare CrFK (Crandell Feline Kidney) fatta sviluppare in terreno minimo essenziale modificato da Dulbecco (D-MEM) arricchito del 10% di siero fetale bovino. In presenza di effetto citopatico le cellule infette sono state conservate a -80°C fino al momento del loro utilizzo per l'estrazione degli acidi nucleici.

b) Campioni mucosali

Nel periodo compreso tra ottobre 2002 e marzo 2003 sono stati prelevati n° 47 campioni costituiti ciascuno da un tampone faringeo ed un tampone congiuntivale provenienti da gatti con sintomi respiratori riconducibili a U.R.T.D. La raccolta dei tamponi è stata eseguita presso ambulatori delle province di Teramo, Isernia e Ascoli Piceno. Al momento del prelievo, per ogni gatto in esame è stata compilata una scheda di rilevamento anamnestica con informazioni relative al tipo di tampone prelevato, alla sintomatologia in atto e ad eventuali trattamenti farmacologici o vaccinali.

Da n° 7 gatti non è stato possibile eseguire il tampone faringeo.

I 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 $+4^{\circ}\text{C}$ ed ivi giunti, conservati a -80°C fino al momento dell'esecuzione della prova.

c) Isolamento virale

Le prove di isolamento sono state effettuate su monostrati di CrFK sviluppati su piastre a 24 pozzetti e incubati a 37°C in incubatore a CO_2 per 4 giorni.

Ogni giorno le cellule sono state osservate al microscopio per valutare l'eventuale comparsa dell'effetto citopatico riferibile a FCV. Sia in assenza che in presenza di effetto citopatico, sono stati effettuati un secondo ed un terzo passaggio.

d) Identificazione degli stipiti virali

Per l'identificazione degli stipiti virali, tutti i campioni sono stati sottoposti ad un quarto passaggio cellulare effettuando il test IFI. A tale scopo sono state inoculate le cellule CrFK fatte sviluppare su vetrini multispot a 16 pozzetti (TC Chamber Slide, Nunclon).

È stato utilizzato un siero di gatto risultato positivo a FCV e negativo a Feline Herpesvirus type 1 (FHV-1) in sironneutralizzazione e in IFI.

La reazione è stata visualizzata con siero anti-IgG di gatto coniugato con isotiocianato di fluoresceina (*Sigma-Aldrich Co.*). Il campione veniva considerato positivo in presenza di una tipica fluorescenza giallo-verde in sede citoplasmatica.

e) Estrazione degli acidi nucleici

Per l'allestimento delle tecniche di PCR, è stato utilizzato un estratto del ceppo F9 di FCV fatto crescere su cellule CrFK. L'estrazione è stata eseguita con il kit RNeasy Mini (*Qiagen*), applicando il seguente protocollo: le cellule CrFK infettate sono state dapprima sottoposte a tre cicli di congelamento e scongelamento per favorire la lisi cellulare; la distruzione delle cellule è stata completata aggiungendo a 1 ml del campione, 350 μl di tampone RLT contenente β -Mercaptoetanol e sottoponendo la soluzione ottenuta ad una accurata omogenizzazione. Il campione liso è stato trasferito in una apposita colonnina dotata di una membrana in grado di legare selettivamente l'RNA; dopo una serie di lavaggi mediante brevi centrifugazioni l'RNA estratto, è stato eluito in 50 μl di RNasi-free water.

Per l'estrazione del RNA virale da n° 87 tamponi mucosali è stato utilizzato il kit QIAamp UltraSens Virus (*Qiagen*), in grado di estrarre contemporaneamente sia RNA che DNA da liquidi poveri o completamente privi di cellule. La metodica utilizzata è quella consigliata dalla Ditta Produttrice.

f) Scelta dei primers

Per l'allestimento di entrambe le tecniche, le coppie di primers sono state scelte in base ai risultati ottenuti dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche del gene ORF2 dei principali stipiti FCV: F9, 6411, C28, F65, LS012, FCL3E, F4, LLK, PPKS8, 2280, 2024, 255, V179 (Genbank Accession Numbers M86379, Z11536, AF260319, AF109465, AF109467, D90357, D31836, UO6649, X99449, AF 479590, FCUO7130, AF031870) utilizzando i programmi DAMBE⁹ e MEGA¹⁰.

g) One-step RT-PCR

Per l'allestimento della one-step RT-PCR la sequenza bersaglio per la reazione di amplificazione di FCV ha una

lunghezza di 924 bp ed è rappresentata da un frammento del gene ORF2 che codifica per la proteina del capsido.

La coppia di primer impiegata nella reazione è la seguente:

- *Cali 1* 5'- aac ctg cgc taa cgt gct ta- 3' (5322-5341);
- *Cali 2* 5'- cag tga caa tac acc cag aag- 3' (6401-6419).

Le miscele per il processo di retrotrascrizione e PCR sono state allestite in un'unica reazione (one-step) nel volume totale di 50 µl contenenti 5 µl di Buffer HotMaster Taq 10X, 3,5 mM di MgCl₂, 200 µM di ogni base azotata, 10 U di RNasi inhibitor, 50 U di enzima MuLV (Applied Biosystems), 2,5 Unità di enzima HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf) e 100 pmol di *Cali 1* e *Cali 2*.

L'estratto di FCV è stato aggiunto nella quantità di 5 µl. La sintesi di cDNA si è svolta a 42°C per 45 minuti seguita da una fase finale di 2 minuti a 94°C per l'inattivazione della MuLV; il prodotto di amplificazione è stato ottenuto con 35 cicli di denaturazione a 94°C per 60 secondi, annealing a 57°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 60 secondi. La fase finale di estensione è stata realizzata a 72°C per 7 minuti.

La metodica così allestita, è stata applicata su n° 87 tamponi mucosali, includendo in ciascuna prova un controllo positivo rappresentato da un estratto di FCV F9 e un controllo negativo costituito da un estratto di cellule CrFK non infette.

h) Nested-PCR (n-PCR)

Il prodotto della prima amplificazione è stato sottoposto ad una seconda reazione, utilizzando la seguente coppia di primers interni in grado di amplificare un frammento di lunghezza di 467 bp:

- *Cali 3* 5'- tgg tga tga tga atg ggc atc-3' (5514-5535);
- *Cali 4* 5'- aca cca gag cca gag ata ga-3' (5971-5991).

La n-PCR è stata preparata in un volume di 50 µl, contenenti 1 µl del primo prodotto di amplificazione, 5 µl di Buffer 10X, 100 µM di ogni base azotata, 1,25 U di enzima HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf) e 100 pmol di *Cali 3* e *Cali 4*. La miscela di reazione è stata sottoposta a 35 cicli utilizzando stessi tempi e temperature applicate nella prima amplificazione.

Anche in questo caso la metodica è stata applicata su n° 87 tamponi mucosali, includendo in ciascuna prova un controllo positivo rappresentato da un estratto di FCV F9

e un controllo negativo costituito da un estratto di cellule CrFK. Al fine di evitare contaminazioni da parte dei prodotti delle diverse PCR, durante ciascuna prova è stato esaminato un numero massimo di quattro campioni per volta ed inoltre sono state rigorosamente separate le aree di lavoro ed utilizzati puntali sterili provvisti di filtro.

i) Valutazione della sensibilità della one-step RT-PCR e n-PCR

Al fine di valutare la sensibilità delle tecniche allestite, sono state eseguite delle diluizioni scalari in base 10 di un estratto di RNA proveniente dal ceppo F9 di FCV (concentrazione iniziale di 33,74 ng/µl). Ogni diluizione è stata quantificata allo spettrofotometro e sottoposta dapprima a one-step RT-PCR e successivamente a n-PCR. La sensibilità è stata determinata come la più alta diluizione in grado di fornire un amplificato visibile al transilluminatore.

Inoltre, diluizioni seriali in base 10 (da 10⁻¹ a 10⁻¹²) del sierotipo FCV F9 sono state inoculate su monostrati di cellule CrFK sviluppati su piastre da microtitolazione. Dopo 4 giorni di incubazione a 37°C in presenza di CO₂ sono stati eseguiti sia il calcolo della TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose) sia i test di one-step RT-PCR e n-PCR su tutte le diluizioni.

i) Sequenziamento ed analisi della sequenza

I prodotti della n-PCR di cinque campioni scelti casualmente e risultati positivi a FCV, sono stati purificati e sequenziati (*Genome Express; Labo Grenoble*). Le sequenze sono state confrontate con analoghe sequenze disponibili sul database della Genbank ed analizzate con i programmi MEGA e DAMBE.

RISULTATI

Relativamente alle prove di isolamento virale, n° 18 campioni hanno prodotto un effetto citopatico riconducibile a FCV e caratterizzato da arrotondamento, aumento della rifrangenza e degenerazione cellulare (Figg. 1 e 2); più in particolare, in n° 4 animali il *calicivirus* è stato isola-



FIGURA 1 - Monostrato di CrFK non infetto (x40).

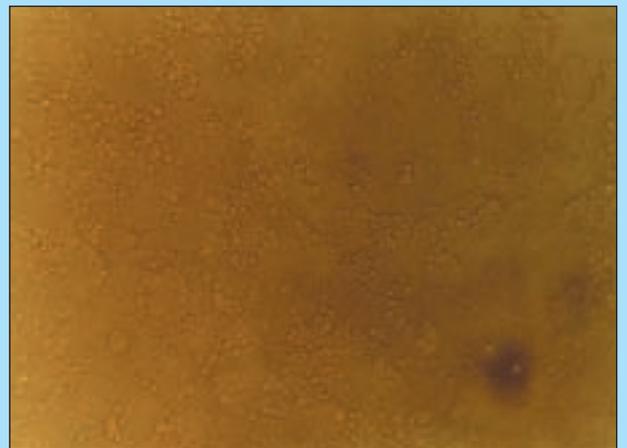


FIGURA 2 - Monostrato di CrFK infetto con FCV (x40).

to a partire sia da tamponi congiuntivali che faringei, mentre in n° 9 gatti l'isolamento è avvenuto soltanto dai tamponi faringei e in un unico animale dal tampone congiuntivale: da questo stesso gatto non era stato possibile eseguire il tampone faringeo. La prova in IFI ha confermato l'isolamento di 18 stipiti FCV (Fig. 3). L'applicazione della one-step RT-PCR (Fig. 4) ha permesso di identificare FCV in n° 5 tamponi congiuntivali (10,60%) e n° 12 tamponi faringei (30,00%) mentre, per quanto riguarda le prove eseguite con la n-PCR (Fig. 5) sono risultati positivi all'in-

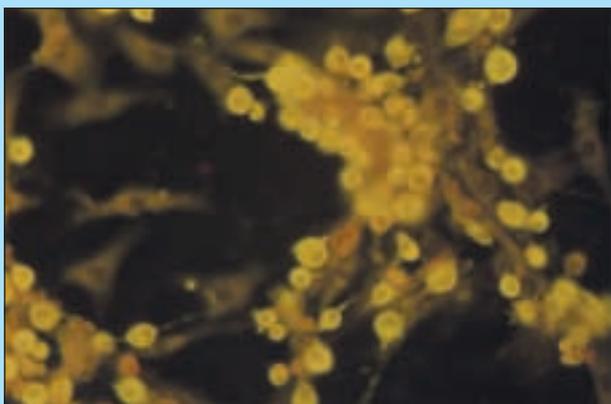


FIGURA 3 - Immunofluorescenza indiretta positiva per FCV eseguita su CrFK (x40).



FIGURA 4 - One step RT-PCR. Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder PlusP (MBI Fermentas GmbH, Germany). Corsia 2: amplificato da 924 bp positivo per FCV.

fezione da FCV, n° 18 tamponi congiuntivali pari al 38,29% di quelli esaminati e n° 23 tamponi faringei pari al 57,50% (Tab. 1).

Considerando i risultati ottenuti con la n-PCR, n° 9 animali sono risultati positivi ad entrambi i tipi di tampone, n° 14 animali solo al tampone faringeo e n° 9 animali solo al tampone oculare; tra quest'ultimi, in tre soggetti non è stato possibile eseguire la raccolta del tampone faringeo.

Dei n° 47 gatti esaminati, n° 17 erano stati sottoposti a regolare vaccinazione nei confronti di FCV e di questi n° 10 sono risultati positivi a FCV. Più in particolare n° 4 animali hanno mostrato positività alla n-PCR in entrambi i tipi di tampone, n° 4 per il tampone faringeo, mentre n° 2 solo per il tampone congiuntivale. Tra gli stessi, da n° 4 soggetti è stato possibile isolare il virus a partire dal tampone faringeo (Tab. 2).

La valutazione statistica eseguita con il test del χ^2 non ha mostrato alcuna differenza ($\chi^2 = 1,0514$; $P = 0,3052$) tra i due gruppi (vaccinati e non vaccinati).

Le diluizioni seriali di FCV hanno dimostrato che la one-step RT-PCR è in grado di amplificare circa $1,3 \times 10^5$ copie del genoma virale¹¹; mentre la n-PCR è risultata in grado di individuare fino a $1,3 \times 10^2$ copie (Fig. 6).

Nei monostrati di cellule CrFK utilizzati per la titola-

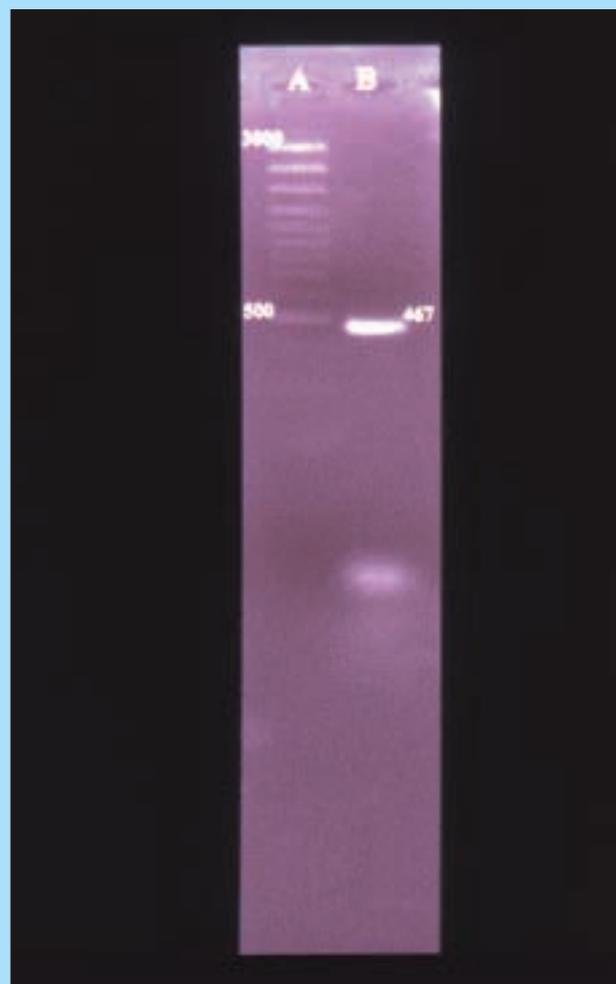


FIGURA 5 - Nested-PCR. Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder PlusP (MBI Fermentas GmbH, Germany). Corsia 2: amplificato da 467 bp positivo per FCV.

Tabella 1
Risultati dell'isolamento virale, one-step RT-PCR e n-PCR per FCV su tamponi di gatti

Campioni	N°	VI		RT-PCR		n-PCR	
		Pos	%	Pos	%	Pos	%
TC	47	5 (1)*	10,60	5	10,60	18 (9)*	38,29
TF	40	13 (9)*	32,50	12	30,00	23 (14)*	57,50

TC: tampone congiuntivale; TF: tampone faringeo.

VI: isolamento virale; N°: campioni esaminati.

Pos: campioni positivi.

*In parentesi gli animali positivi solo al tipo di tampone indicato.

Tabella 2
Isolamento di FCV e n-PCR su gatti vaccinati e non vaccinati nei confronti di FCV

Animali	N°	VI				n-PCR			
		Pos	TC	TF	TC/TF	Pos	TC	TF	TC/TF
Vaccinati	17	4	0	4	0	10	2	4	4
Non vaccinati	30	14	1	5	8	22	7	10	5
Totale	47	18	1	9	8	32	9	14	9

TC: tampone congiuntivale; TF: tampone faringeo.

VI: isolamento virale; N°: gatti esaminati.

Pos: campioni positivi.

zione virale, l'effetto citopatico e l'amplificazione dell'RNA di FCV mediante one-step RT-PCR sono stati entrambi evidenziati fino alla diluizione 10^{-8} ; mentre la n-PCR è risultata in grado di amplificare l'RNA virale fino alla diluizione 10^{-11} .

Il sequenziamento degli amplificati ha mostrato, attraverso il confronto con sequenze analoghe presenti sul database della Genbank, che i cinque ceppi possiedono una sequenza riferibile a FCV.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le difficoltà riscontrabili nell'individuazione di FCV nei tamponi mucosali tramite l'isolamento in colture cellulari oppure tramite una RT-PCR convenzionale, sono attribuibili (i) all'esigua quantità di virus nel tampone di partenza, (ii) alla presenza negli escreti mucosali di ribonucleasi responsabili della degradazione dell'RNA e (iii) alla variabilità genetica tipica di questi virus. Sulla base di tali problematiche si è ritenuto utile mettere a punto una nested-PCR che essendo dotata di un'elevata sensibilità, ha permesso di superare tali limitazioni. Infatti, analogamente a quanto riportato da altri Autori¹² non è stata osservata differenza tra l'isolamento su colture cellulari e la RT-PCR, mentre tale differenza è stata rilevata comparando le due metodiche con la n-PCR.

Inoltre, nell'allestimento della metodica, considerando la notevole eterogeneità genotipica¹³ che caratterizza FCV, uno degli obiettivi è stato quello di identificare una regione genomica conservata tra i diversi ceppi; in particolare, il frammento bersaglio selezionato è incluso nel gene ORF2 in grado di codificare per i domini della proteina capsidica A, B, C e D che risultano essere le zone dotate di maggiore conservabilità^{14,15,16}. La variabilità di FCV interessa in particolare il dominio E, principale bersaglio degli anticorpi neutralizzanti il virus¹⁷.

La prevalenza di FCV riscontrata nel corso di questa indagine appare più elevata rispetto a quanto riportato in



FIGURA 6 - Prova di sensibilità per one step RT-PCR (corsie B-H) e per nested-PCR (corsie I-T). Corsia A: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder PlusP (MBI Fermentas GmbH, Germany).

uno studio condotto in Australia⁶, dove soltanto il 18,80% dei tamponi mucosali sottoposti ad RT-PCR è risultato positivo a FCV. Nel corso della nostra indagine, sia l'isolamento virale che l'RT-PCR hanno permesso di identificare il patogeno nel 10,60% dei tamponi congiuntivali e nel 30,00% dei tamponi faringei; applicando sugli stessi campioni la n-PCR, la positività all'infezione da FCV ha subito un ulteriore incremento, con una prevalenza del 38,29% a partire dai tamponi congiuntivali e del 57,50% dai tamponi faringei. La maggiore prevalenza osservata nel presente studio potrebbe essere attribuibile oltre che alla maggiore sensibilità del test applicato, anche alle caratteristiche della popolazione di gatti esaminata; infatti, mentre nell'indagine condotta da Sykes *et al.*⁶ è stato esaminato un campione costituito per circa il 76,00% da animali sottoposti almeno ad un intervento immunizzante, nel nostro caso è stata analizzata una popolazione abbastanza eterogenea in cui soltanto il 36,00% dei soggetti aveva subito una vaccinazione nei confronti di FCV. Al contrario, i risultati da noi ottenuti non si discostano da quelli riferiti da Cay *et al.*¹⁸ in una recente indagine condotta in Giappone.

Un altro aspetto interessante emerso nel corso della presente sperimentazione, riguarda il tipo di tampone da inviare in laboratorio; infatti, i dati rilevati per mezzo dell'isolamento confermano che l'orofaringe rappresenta il sito anatomico d'elezione per la diagnosi di FCV a partire dalle colture cellulari^{1,12}. Considerando però i risultati ottenuti in n-PCR (n° 9 soggetti positivi solo al tampone oculare e n° 14 soggetti al faringeo), si deduce che un approccio diagnostico corretto dovrebbe prevedere l'invio in laboratorio di entrambi i tamponi.

Un dato che meriterebbe un ulteriore approfondimento riguarda la positività riscontrata nei gatti sottoposti a vaccinazione nei confronti di FCV. La valutazione statistica ha dimostrato che tra i due gruppi di animali (vaccinati e non vaccinati) non esiste differenza significativa relativamente alla presenza del calicivirus nei tamponi mucosali. Tale situazione potrebbe essere spiegata con l'incapacità dei vaccini attualmente disponibili di proteggere i gatti dall'infezione. Alcune ricerche in proposito^{19,20} hanno evidenziato che gli stipiti FCV circolanti in Italia risultano scarsamente correlati sul piano antigenico allo stipite vaccinale F9. Inoltre, nel corso di uno studio²¹ condotto su una colonia di gatti infetta ma precedentemente vaccinata, è stata osservata una stretta correlazione filogenetica tra i ceppi FCV patogeni e il virus vaccinale. Gli Autori hanno ipotizzato che il virus vaccinale attenuato persista nell'ambiente subendo delle modificazioni a livello dei principali determinanti antigenici che gli permetterebbero di acquisire la capacità di indurre la malattia.

In conclusione, l'elevata sensibilità della n-PCR (superiore a tre logaritmi rispetto alla RT-PCR) da noi allestita si rende utile ai fini diagnostici per l'individuazione di esigue quantità di virus nei campioni mucosali di partenza. Inoltre, considerando la positività riscontrata in entrambi i tipi di tampone (oculare e faringeo), la n-PCR potrebbe essere utilizzata per intraprendere ulteriori studi e ricerche finalizzati ad approfondire i meccanismi della patogenesi e della persistenza di FCV nei soggetti portatori.

Parole chiave

Gatto, infezioni respiratorie, calicivirosi, diagnosi, nested-PCR.

Key words

Cat, respiratory infections, calicivirosis, diagnosis, nested-PCR.

Bibliografia

- Gaskell RM, Dawson S: Viral-induced upper respiratory tract disease. *Feline Medicine and Therapeutics* (2nd edn). Chandler E.A., Gaskell C.J., Gaskell R.M., (eds). Oxford, Blackwell Scientific Publications: 453-472, 1994.
- 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.
- Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, et al: Inactivation of feline calicivirus a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, 41: 51-57, 1999.
- Dawson S, Bennett D, Carter SD, et al: Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.*, 56: 133-43, 1994.
- Gaskell RM, Dennis PE, Goddard LE, et al: Isolation of felid herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia latently infected cats. *J. Gen. Virol.*, 66: 391-394, 1985.
- 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.
- Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD: Sensitive Detection of RNA Viruses Associated with Gastroenteritis by a Hanging-Drop Single-Tube Nested reverse transcription-PCR Method. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 4091-4099, 2002.
- Radford AD, Bennett M, McArdle F, et al: The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and vaccine failures. *Vaccine*, 15: 1451-1458, 1997.
- Xia X, Xie Z: DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373, 2001.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al: Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245, 2001.
- 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.
- Sykes JE, Studdert VP, Browning GF: Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. *Arch Virol*, 143: 1321-1334, 1998.
- Glenn M, Radford AD, Turner PC, et al: Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCV strains. *Vet. Microbiol.*, 67: 175-193, 1999.
- Neill JD: Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea lion virus; identification of conserved and non conserved amino acid sequences among calicivirus sequences. *Virus Res.*, 24: 211-222, 1992.
- Seal BS: Analysis of capsid protein gene variation among divergent isolates of feline calicivirus. *Virus Res.*, 33: 39-53, 1994.
- Seal BS, Neill JD: Capsid protein gene sequence of feline calicivirus isolates 255 and LLK: further evidence for capsid protein configuration among feline calicivirus. *Vir. Genes*, 9: 183-187, 1995.
- Radford AD, Turner PC, Bennett M, et al: Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats. *J. Gen. Virol.*, 79: 1-10, 1998.
- 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.
- Buonavoglia D, De Palma MG, Camero M, et al: Correlazione sierologica fra gli stipiti di calicivirus felino (FCV) isolati in Italia e lo stipite vaccinale F9. *Veterinaria*, 14: 65-68, 2000.
- Accia P: Studio delle correlazioni sierologiche fra stipiti di calicivirus felino e lo stipite vaccinale F9. Tesi di laurea, Università degli studi di Teramo, 2002.
- Radford AD, Sommerville LM, Dawson S, et al: Molecular analysis of isolates of feline calicivirus from a population of cats in a rescue shelter. *Vet. Rec.*, 149: 477- 481, 2001.