

# CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DI UN CEPPLO DI CALICIVIRUS FELINO ISOLATO DALLE FECI DI UN CUCCIOLO DI CANE

## GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF A FELINE CALICIVIRUS STRAIN ISOLATED FROM PUPPY STOOLS

B. DI MARTINO, C. DI ROCCO, F. MARSILIO

Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Università degli Studi di Teramo, Piazza Aldo Moro, 45, 64100 - Teramo

### Riassunto

**Introduzione e scopo del lavoro** - Sebbene il calicivirus felino (FCV) risulti in grado di infettare solo membri della fam. *Felidae*, in alcune occasioni ceppi FCV-like sono stati isolati anche dal cane. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di studiare le caratteristiche genotipiche e fenotipiche di un ceppo di FCV isolato dalle feci di un cucciolo di cane con gastroenterite. **Materiali e metodi** - Successivamente all'isolamento, il ceppo virale è stato analizzato mediante RT-PCR e gli amplificati ottenuti sottoposti a sequenziamento. Lo studio delle caratteristiche fenotipiche ha riguardato le dimensioni delle placche, la resistenza termica e la velocità di crescita. È stata infine eseguita un'indagine sierologica su n° 86 sieri di cane per valutare la presenza di anticorpi neutralizzanti per il ceppo FCV-like isolato e per quello vaccinale FCV-F9. **Risultati** - L'analisi comparativa nucleotidica e aminoacidica ha evidenziato che il nuovo isolato, designato FCV 10/Te/07, presenta la più elevata omologia nei confronti del ceppo FCV-F65. Relativamente alle caratteristiche replicative di FCV 10/Te/07 queste sono risultate analoghe a quelle dei ceppi FCV associati a viremia sistemica (VSD-FCV: Virulent Systemic Disease-FCV) nel gatto. L'indagine sierologica ha evidenziato la presenza di anticorpi neutralizzanti per il ceppo FCV-F9 nel 63,9% (55/86) dei sieri esaminati, mentre solo n° 7 sieri (8,13%) sono risultati positivi a 10/Te/07. **Discussione** - I nostri risultati confermano la circolazione interspecifica di FCV un aspetto questo da un lato epidemiologicamente rilevante e dall'altro che meriterebbe ulteriori indagini finalizzate a valutare sia il reale potere patogeno nel cane sia l'eventuale trasmissione ad altri mammiferi.

### Summary

**Introduction and aim of the study** - Although feline calicivirus (FCV) can infect only felids, occasionally FCV-like strains have been isolated from dogs. The aim of the study was to perform genotypic and phenotypic characterization of a FCV strain isolated from a puppy showing enteritis. **Material and methods** - After isolation in cell cultures, the strain was analysed by RT-PCR and the amplicons obtained were sequenced. In order to characterize the growth properties of the isolate we evaluate the size of the plaques, the temperature of inactivation and the kinetic of growth. To investigate the presence of neutralizing antibodies against the vaccinal strain FCV-F9 and the strain FCV-like isolated, we analysed n. 86 canine serum samples. **Results** - The comparative analysis of nucleotide and amino acid sequences of the new isolate, named FCV 10/Te/07, revealed the highest similarity to strain FCV-F65. The growth properties showed that strain 10/Te/07 possesses viral characteristics similar to those of the FCV strains associated with virulent systemic (VS) disease (VSD-FCV). The serological investigation revealed neutralizing antibodies against the strain F9 in 63.9% (55/86) of samples analysed, while antibodies against 10/Te/07 were found in 7 sera (8.13%). **Discussion** - Our results confirm the interspecific circulation of FCV strains among different animal species, but new investigations are necessary to understand the effective FCV pathogenicity for the dog and the role of other mammals in the infection spreading.

### INTRODUZIONE

Il calicivirus felino (FCV), appartenente alla famiglia *Caliciviridae* genere *Vesivirus*, è un piccolo virus sprovvisto di envelope del diametro approssimativo di 35-38 nm. Il ge-

noma costituito da una singola molecola di RNA monocatenario a polarità positiva e di lunghezza approssimativa di 7,7 kb, è organizzato in tre *open reading frames* (ORFs): ORF1 che codifica per le proteine non strutturali del virione denominate p5.6, p32, p39 (NTPase), p30, p13 (VPg) e p76 (Pro-Pol)<sup>1</sup>; il gene ORF2 che codifica per il precursore capsidico (pre-VP1) di 73 kDa il quale, in seguito a clivaggio proteolitico, dà origine alla principale proteina capsidica VP1 del peso molecolare di 60 kDa<sup>2, 3</sup> ed infine

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 11/07/2008 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 26/09/2008”.

ORF3 localizzato all'estremità 3' dell'RNA genomico che codifica per una piccola proteina strutturale (12,2 kDa) di 106 amminoacidi, denominata VP2, probabilmente coinvolta nei processi di replicazione del virus e nell'assemblaggio delle particelle infettanti<sup>4</sup>.

Nonostante FCV appartenga ad un unico sierotipo, in natura sono stati isolati numerosi ceppi in grado di adattarsi a condizioni largamente eterogenee e ciò sembrerebbe dovuto all'elevata capacità sia dei calicivirus umani che di quelli animali di ricombinarsi a livello di giunzione ORF1/ORF2 attraverso un meccanismo simile al *crossing-over* con frequenze dell'ordine del 10% nel caso di infezioni multiple con diversi ceppi virali<sup>5</sup>.

In natura l'infezione sostenuta da FCV colpisce i felidi, in particolare il gatto, rendendosi responsabile nella maggior parte dei casi di sintomi localizzati soprattutto a carico delle vie respiratorie superiori; tuttavia, nel corso degli ultimi anni, ceppi altamente virulenti sono stati associati anche a sindromi sistemiche (VSD-FCV: Virulent Systemic Disease-FCV)<sup>6</sup> caratterizzate da infiammazione diffusa, coagulazione intravasale disseminata, dermatite, necrosi pancreatica e splenica, spesso ad esito fatale<sup>7</sup>, nonché a forme articolari (*limping syndrome*)<sup>8,9</sup>, dermatiti ed aborto<sup>10</sup>.

Occasionalmente calicivirus non correlati a FCV e per questo considerati nuova specie virale (Canine Calicivirus: CaCV)<sup>11,12</sup> o geneticamente e antigenicamente correlati a FCV (ceppi FCV-like, feline-like calicivirus) sono stati isolati anche a partire da campioni fecali di cuccioli di cane<sup>13,14,15,16</sup>. Tuttavia, ad eccezione del ceppo CaCV/48 e di due isolati di FCV-like, rappresentati dal Sapporo/283<sup>15</sup> e dal 213/95<sup>16</sup>, che sono stati sottoposti ad analisi molecolare, la caratterizzazione degli altri ceppi si è basata esclusivamente sulle proprietà colturali o su test sierologici.

Precedenti indagini su base sierologica effettuate in Italia<sup>17</sup>, indicano che l'infezione sostenuta da FCV è ampiamente diffusa nella popolazione di cani; tuttavia le informazioni riguardanti il ruolo del virus nel determinismo delle gastroenteriti e soprattutto le caratteristiche dei ceppi coinvolti, risultano ancora scarse, e ciò potrebbe essere attribuibile al ridotto numero di isolamenti virali da campioni di feci di cane con diarrea e alla difficoltà di alcuni ceppi di adattarsi a replicare su substrato cellulare.

Al fine di dare un ulteriore contributo allo studio delle caratteristiche dei ceppi FCV-like isolati dal cane, nel presente lavoro vengono riportati i dati ottenuti mediante lo studio genotipico e fenotipico di un ceppo di FCV-like isolato dalle feci di un cucciolo di cane con grave sintomatologia gastroenterica.

## MATERIALI E METODI

### a) Isolamento virale

L'indagine virologica è stata effettuata su un campione di feci proveniente da un cane meticcio di circa tre mesi che all'esame clinico manifestava gastroenterite grave con anoressia, vomito e diarrea emorragica. Il campione dopo opportuna omogenizzazione in Minimum Essential Medium modificato di Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium, D-MEM) e filtrazione, è stato inoculato sulle seguenti linee cellulari: cellule in linea continua di rene di ca-

ne (Madin-Darby canine kidney, MDCK), cellule in linea continua di rene di gatto (Crandell feline kidney, CrFK) e cellule in linea continua di adenocarcinoma di cane (A72).

A 4 giorni post-infezione su tutti i monostrati cellulari sia in assenza che in presenza di effetto citopatico (ecp), è stato effettuato un test di immunofluorescenza indiretta (IFI), utilizzando un siero iperimmune di gatto anti-FCV-F9, un siero canino positivo per il coronavirus del cane (CCoV) ed un siero positivo nei confronti di adenovirus canini (CAV). Sia il campione fecale che i monostrati inoculati, sono stati analizzati per la ricerca del Parvovirus canino (CPV) mediante test di emoagglutinazione (HA) utilizzando globuli rossi di suino all'1% a + 4°C e reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction, PCR)<sup>18</sup>. Infine, per la ricerca di eventuali rotavirus il campione di feci è stato analizzato mediante test enzime-linked immunosorbent assay (ELISA) utilizzando il Rotavirus ELISA kit (Biox diagnostics).

### b) Retrotrascrizione e amplificazione PCR

Il campione di feci del cucciolo e i monostrati cellulari di CrFK nei quali era stato evidenziato ecp, sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA mediante l'impiego del kit RNeasy mini (Qiagen, GmbH, Germania), secondo la metodica indicata dalla Ditta Produttrice. Per l'identificazione virale, sono state impiegate due coppie di primer specifiche, Cali1/Cali2 e CaCV1/CaCV2, in grado di amplificare rispettivamente un frammento del gene ORF2 di FCV<sup>19</sup> e l'intero gene capsidico CaCV<sup>20</sup>. Inoltre, è stata eseguita una terza RT-PCR utilizzando una coppia di primer generici per i calicivirus (289/290)<sup>21</sup> ed in grado di amplificare un frammento di circa 287 bp della regione genomica che codifica per l'enzima RNA polimerasi. Tutte le reazioni di RT-PCR sono state sviluppate secondo il protocollo suggerito dagli Autori<sup>19,20,21</sup>.

### c) Sequenziamento e analisi filogenetica

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati da gel di agarosio mediante il kit Qiaex Gel Extraction Kit (Qiagen, GmbH, Germania) e quindi sottoposti a sequenziamento diretto presso la ditta Eurofins MWG/DNA (GmbH), usando entrambe le coppie di primer 289/290 e Cali1/Cali2. Sulla base delle sequenze ottenute, sono stati disegnati altri primer posizionati nel gene ORF1 e ORF2. Tutte le sequenze sono state assemblate usando il software BioEdit 2.1<sup>22</sup> e comparate con analoghe sequenze disponibili nel database di GenBank mediante il programma BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Infine, le sequenze sono state allineate e sottoposte ad analisi filogenetica usando il programma MEGA 3<sup>23</sup>.

### d) Caratterizzazione fenotipica

La caratterizzazione fenotipica dell'isolato è stata eseguita mediante metodo delle placche comparando la curva di crescita [a 4, 8, 12, 24 ore post-infezione (PI) secondo gli

indici di molteplicità (MOI) di 10 e 0,02] e la resistenza termica (a 41,8, 46,2 e 52,2°C, per 30 min) di quest'ultimo, con quelle del ceppo vaccinale FCV F9, secondo quanto suggerito da Ossiboff e coll.<sup>29</sup>.

### e) Indagine sierologica mediante test di virus-neutralizzazione

L'indagine sierologica è stata condotta su n° 86 sieri di cani adulti. Ciascun siero è stato esaminato per valutare la presenza di anticorpi neutralizzanti per il ceppo FCV-like isolato e per quello vaccinale F9.

Il test di virus-neutralizzazione è stato eseguito come descritto da Povey<sup>24</sup>. Brevemente, per l'esecuzione del test sono state utilizzate piastre da microtitolazione a 96 pozzetti. Ciascun siero è stato sottoposto a diluizioni per raddoppio partendo da 1:2 e successivamente messo a contatto per 1 ora a 37° C con 100 TCID<sub>50</sub> di ciascuno dei ceppi virali in esame. Trascorso tale tempo, sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 2x10<sup>5</sup> cellule/ml di cellule CrFK. Le piastre sono state, quindi, incubate per 3 giorni a 37° C in presenza di CO<sub>2</sub>. Per ciascun siero il test è stato ripetuto tre volte.

## RISULTATI

A partire dal primo passaggio, sulla linea cellulare CrFK è stato osservato ecp, caratterizzato da aumentata rifrangenza cellulare, arrotondamento e distacco simile a quello che si manifesta in seguito a replicazione di FCV tipici; inoltre, il test IFI eseguito con l'impiego di un siero iperimmune anti-FCV-F9, ha permesso di evidenziare una tipica fluorescenza intracitoplasmatica (Fig. 1). Al contrario, non è stata osservata crescita virale nei monostrati cellulari di MDCK e A72 e le prove di IFI per FCV, CCov e CAV effettuate sulle colture inoculate hanno dato esito negativo. Per quanto riguarda la ricerca di CPV e rotavirus, tutti i tests applicati sono risultati negativi.

Relativamente alle prove di RT-PCR, il segnale di amplificazione è stato ottenuto nelle reazioni allestite con le coppie di primer 289/290 e Cali1/Cali2 che hanno permesso di evidenziare due bande di altezza corrispondente al peso molecolare atteso (Fig. 2). Non è stato osservato alcun segnale di amplificazione con l'impiego dei primer specifici per CaCV.

Sulla base dei risultati ottenuti mediante l'analisi di sequenza nucleotidica, il nuovo isolato è stato denominato FCV 10/Te/07. In particolare, il sequenziamento di un frammento di 1557 bp del gene ORF1 (corrispondente alle posizioni nucleotidiche 3176-4733 di FCV-F9; numero di accesso in Genbank: M86379) ha mostrato un'omologia del 78,4% nei confronti del ceppo vaccinale F9 e la maggiore identità con il ceppo FCV-F65 isolato nel Regno Unito (80,9%) (Fig. 3). L'identità nucleotidica con CaCV/48 (numero di accesso in Genbank: AB070225) è risultata pari a 56,8%.

Il gene ORF2 presenta nei diversi ceppi di FCV una lunghezza di circa 2024 nucleotidi e codifica per il precursore capsidico (pre-VP1) di 669 aminoacidi (aa). Relativamente al ceppo 10/Te/07, l'impiego di una coppia di primer disegnata sulla base della sequenza ottenuta con Cali1/Cali2,

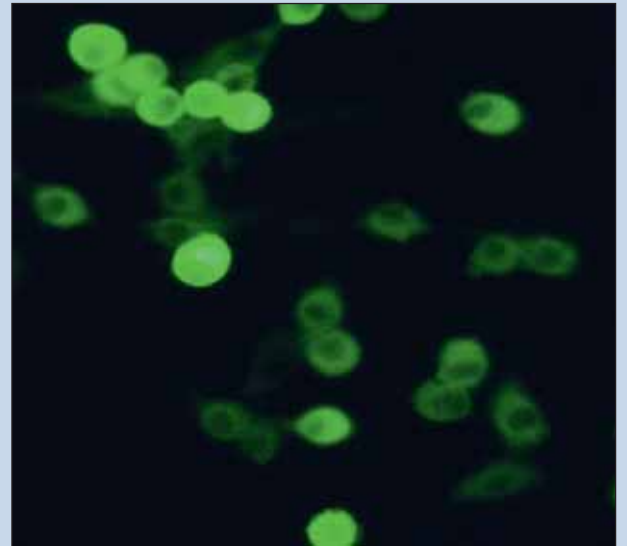


FIGURA 1 - Cellule CrFK infettate con l'isolato 10/Te/07. Fluorescenza intracitoplasmatica. Ingrandimento 40x.

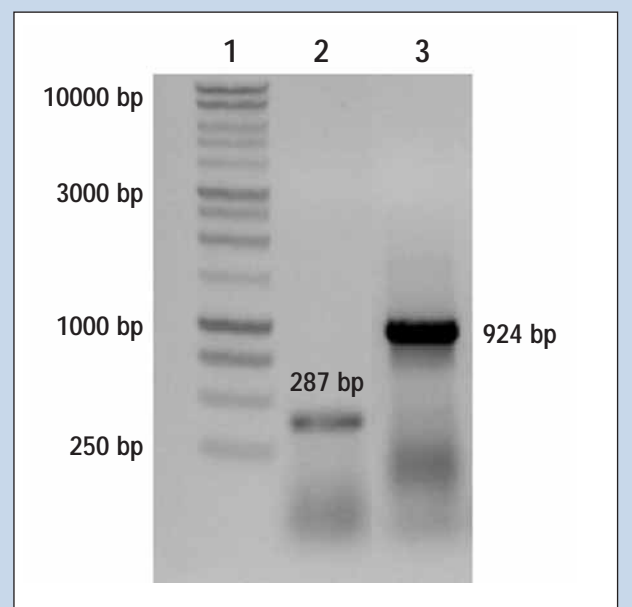


FIGURA 2 - RT-PCR con le coppie di primer 289/290 e Cali1/Cali2. Corsia 1: marker (Promega 1 kb DNA ladder); corsia 2: amplificato ottenuto con primer generici per calicivirus (289/290) di circa 287 bp; corsia 3: amplificato ottenuto con primer specifici per FCV (Cali1/Cali2) di 924 bp.

ha permesso di amplificare e sequenziare un frammento di 1860 bp (posizioni nucleotidiche 5371-7260 di FCV-F9) e di 626 aa, corrispondente alle regioni A, B, C, D, E della proteina capsidica VP1. L'allineamento con analoghe sequenze aminoacidiche di FCV disponibili nel database di GenBank, ha confermato che il nuovo isolato mostra la più elevata omologia verso il ceppo F65 (88%) (Fig. 4). L'analisi comparativa della regione ipervariabile E che include i principali epitopi immunodominanti e che si estende dal residuo aa 426 al residuo aa 523, ha mostrato anche in questo caso la più elevata omologia nei confronti del ceppo F65 (90%), mentre l'omologia nei confronti dello stipite vaccinale è risultata dell'83%.

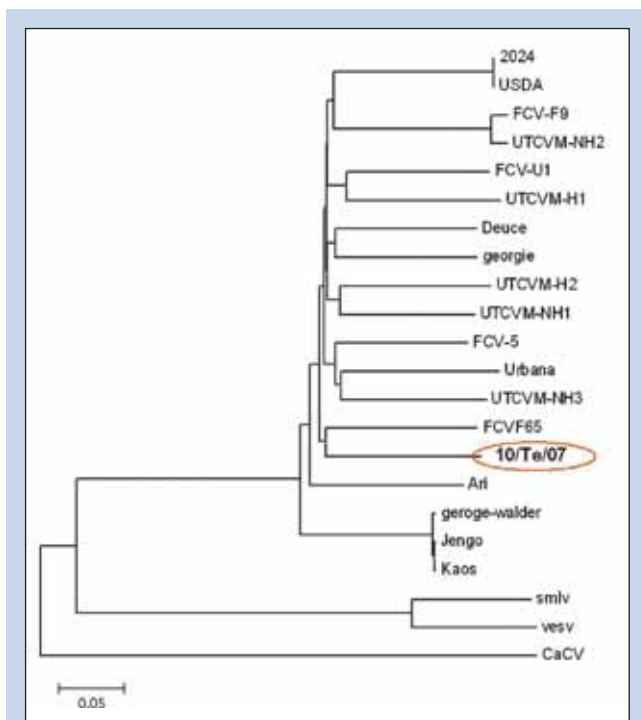


FIGURA 3 - Albero filogenetico costruito usando parte del gene ORF1 (1557bp) di FCV 10/Te/07 e sequenze analoghe di ceppi FCV disponibili sul database della GenBank. Metodo Neighbor-Joining, bootstrapping in 1000 repliche.

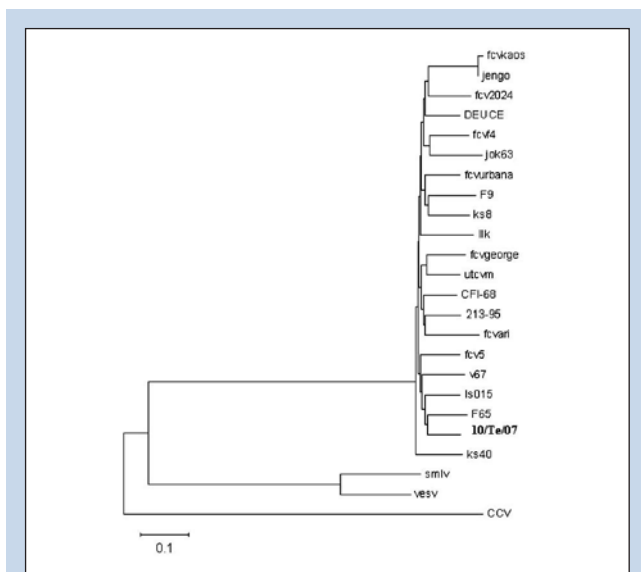


FIGURA 4 - Albero filogenetico costruito usando la sequenza aminoacidica della proteina capsidica VP1 (608 aa) di FCV 10/Te/07 e sequenze analoghe di ceppi FCV disponibili sul database della GenBank. Metodo Neighbor-Joining, bootstrapping in 1000 repliche.

Per quanto riguarda lo studio delle caratteristiche fenotipiche, la valutazione del titolo virale iniziale, ha permesso di evidenziare una prima differenza di crescita tra i due ceppi esaminati relativamente alla grandezza delle placche. In particolare, la replicazione del ceppo 10/Te/07 ha determinato la formazione di placche più grandi rispetto a quelle ottenute durante la crescita del ceppo vaccinale F9 (Fig. 5).

Lo studio della cinetica replicativa a ciclo singolo (MOI: 10) ha evidenziato che il massimo picco di crescita

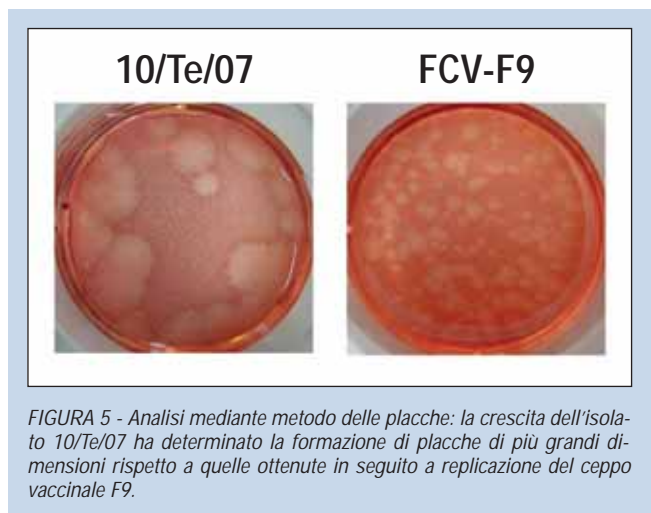


FIGURA 5 - Analisi mediante metodo delle placche: la crescita dell'isolato 10/Te/07 ha determinato la formazione di placche di più grandi dimensioni rispetto a quelle ottenute in seguito a replicazione del ceppo vaccinale F9.

del ceppo 10/Te/07 si realizza tra  $T_1$  (4h P.I.) e  $T_2$  (8h P.I.), a differenza di FCV F9 in cui il picco viene raggiunto tra  $T_3$  (12h P.I.) e  $T_4$  (24h P.I.). Comportamento analogo è stato osservato nell'infezione a ciclo multiplo (MOI: 0,02) in cui il ceppo 10/Te/06 ha mostrato il picco di crescita a  $T_1$  (4h P.I.) (Tab. 1). Le prove di resistenza termica hanno mostrato per entrambi i ceppi in esame una progressiva riduzione del titolo virale quando esposti a temperature superiori a 41,8°C fino alla completa assenza di crescita virale (Tab. 2).

Come descritto nella Tabella 3, il test di virus-neutralizzazione ha messo in evidenza la presenza di anticorpi neutralizzanti per il ceppo FCV-F9 nel 63,9% (55/86) dei sieri esaminati con titoli compresi tra 1:4 e 1:16. Tra questi n° 7 (8,13%) sieri sono risultati positivi anche per FCV 10/Te/07, ma con titoli inferiori, ad eccezione di un campione in cui è stato rilevato un titolo anticorpale superiore (2 logaritmi) rispetto al ceppo F9. In nessuno dei sieri esaminati sono stati evidenziati anticorpi rivolti soltanto nei confronti del ceppo 10/Te/07.

## DISCUSSIONE

Nel determinismo delle gastroenteriti dei cuccioli, i virus svolgono un ruolo fondamentale e tra questi CPV-2, CCoV e i rotavirus rappresentano gli agenti patogeni di più frequente riscontro, mentre adenovirus, astrovirus, paramyxovirus, parainfluenzavirus e calicivirus, sono stati segnalati solo occasionalmente<sup>25</sup>. Più in particolare, gli isolamenti di calicivirus nel cane in corso di forme diarroiche risultano piuttosto scarsi e la loro effettiva patogenicità non è ancora del tutto chiara nonostante le elevate percentuali di positività sierologica riscontrate nei confronti di FCV<sup>17</sup>.

Inoltre, la variabilità genetica che caratterizza FCV ha determinato l'esistenza in natura di numerosi ceppi in grado di adattarsi alle condizioni più eterogenee, rendendosi quindi responsabili di quadri clinici atipici nell'ospite specifico<sup>8, 9, 10, 6, 26, 27</sup>, così come di salti di specie.

Nel presente lavoro, l'indagine virologica condotta su un campione di feci diarroiche di un cucciolo di cane ha permesso di isolare un ceppo di FCV, il quale successivamente è stato sottoposto a tipizzazione molecolare e fenotipica. Un



**Tabella 1**  
Studio della cinetica replicativi a ciclo singolo (MOI:10) e ciclo multiplo (MOI 0.02)

	MOI 10				MOI 0,02			
	4h (T <sub>1</sub> )	8h (T <sub>2</sub> )	12h (T <sub>3</sub> )	24h (T <sub>4</sub> )	4h (T <sub>1</sub> )	8h (T <sub>2</sub> )	12h (T <sub>3</sub> )	24h (T <sub>4</sub> )
FCV-F9	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,6 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>7</sup>
FCV-10/Te/07	1 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>8</sup>	8 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>	2 x 10 <sup>7</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>

**Tabella 2**  
Risultati delle prove di resistenza termica

Ceppo FCV	Titolo iniziale	37°C	41,8°C	46,2°C	52,2 °C
FCV-F9	1 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup>	4,3 x 10 <sup>4</sup>	Assenza di crescita
FCV-10/Te/07	1,6 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	2,8 x 10 <sup>6</sup>	Assenza di crescita

**Tabella 3**  
Risultati delle prove di virus neutralizzazione eseguite su n° 86 sieri di cane

CEPPI	POSITIVI							
Titolo anticorpale	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Sieri positivi per FCV F9	7	5	18	15	-	-	-	-
Sieri positivi per FCV10/Te/07	-	1	2	4	-	-	-	-

primo aspetto emerso nel corso dello studio, è la mancata evidenziazione di altri patogeni virali sia nei tentativi di isolamento su cellule che nelle prove di identificazione diretta dell'antigene e degli acidi nucleici. Infatti sono tuttora in corso test per escludere in maniera definitiva la presenza di CCoV tramite RT-PCR specifiche. È quindi ipotizzabile il ruolo di FCV come unico agente virale causa di gastroenterite nel cane, in contrasto con quanto riportato nel corso di precedenti segnalamenti<sup>13, 16</sup>, in cui particelle FCV-like sono state identificate in associazione con altre infezioni virali. Tuttavia, dal momento che non è stato possibile effettuare esami batteriologici, non è da escludere il coinvolgimento di patogeni di origine batterica.

L'analisi filogenetica del ceppo 10/Te/07, ha confermato in analogia con quanto osservato da altri Autori<sup>28, 9</sup>, l'assenza di *markers* genetici o sequenze aminoacidiche che permettano di raggruppare i diversi ceppi FCV in base al quadro clinico<sup>29</sup>, spettro d'ospite e origine geografica<sup>16</sup>.

Tuttavia, l'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche dei geni ORF1 e ORF2 ha evidenziato che FCV 10/Te/07 mostra la più elevata omologia verso il ceppo F65 (UK/1990) isolato in un gatto che presentava febbre, sinovite acuta, dolorabilità articolare e ulcerazioni del cavo orale (*limping syndrome*). Quest'ultimo, analogamente ai ceppi VSD-FCV associati a sindrome sistemica nel gatto, mostra una scarsa correlazione sierologica con il ceppo vaccinale F9<sup>8</sup>. Tale dato trova conferma in campo in

quanto, i gatti normalmente sottoposti a profilassi immunizzante nei confronti della calicivirosi, non risultano protetti verso l'infezione sostenuta da ceppi VSD-FCV<sup>8</sup>. I risultati dell'indagine sierologica nella popolazione di cani sembrerebbero dimostrare che il ceppo da noi isolato si comporta in maniera analoga, in quanto a fronte di un'elevata positività sierologica nei confronti dello stipite F9, la presenza di anticorpi neutralizzanti per il ceppo 10/Te/07 è stata rilevata soltanto in sette sieri; inoltre, un solo siero ha mostrato una positività sierologica superiore nei confronti di 10/Te/07 rispetto a F9.

Accanto all'approccio molecolare, sono stati condotti alcuni studi finalizzati ad individuare nei diversi ceppi FCV eventuali differenze fenotipiche relativamente alle modalità di crescita *in vitro*<sup>30, 31</sup>, alla cinetica replicativa e alla resistenza allo stress termico<sup>28</sup>. Analizzando le caratteristiche di crescita del ceppo 10/Te/07, abbiamo osservato relativamente alle dimensioni delle placche e alla cinetica replicativa, un comportamento simile a quello dei ceppi VSD-FCV, che risultano essere ceppi a maggior virulenza e per questo associati a quadri patologici atipici.

In conclusione, l'isolamento del virus e le indagini da noi condotte confermano, come già riportato in precedenti studi, la circolazione interspecifica di FCV, un aspetto questo che meriterebbe ulteriori indagini finalizzate a valutare se la trasmissione di tale specie virale è limitata soltanto al cane e gatto o se coinvolge anche altri mammiferi, uomo

compreso. Inoltre tale studio pone le basi per intraprendere ulteriori indagini sulla reale diffusione di FCV quale agente causale di gastroenterite nel cane e sul ruolo di quest'ultimo quale ospite accidentale o eventuale serbatoio di infezione.

## Parole chiave

*FCV, cane, genotipo, fenotipo.*

## Key words

*FCV, dog, genotype, phenotype*

## Bibliografia

- Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY: Processing map and essential cleavage sites of the non-structural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J. Virol.*, 76: 7060-7072, 2002.
- Carter MJ, Milton ID, Turner PC, et al (Meanger, J., Bennett, M., Gaskell, R. M.): Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch. Virol.* 122: 223-235, 1992.
- Sosnovtsev SV, Sosnovtsev SA, Green KY: Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.*, 72: 3051-3059, 1998.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al: Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.*, Apr: 4012-4024, 2005.
- Coyne KP, Reed FC, Porter CJ, et al: Recombination of feline calicivirus within an endemically infected cat colony. *J. Gen. Virol.*, 87: 921-926, 2006.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, et al: An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.*, 73: 281-300, 2000.
- Pesavento PA, MacLachlan NJ, Dillard-Telm L, et al: Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Vet. Pathol.*, 41: 257-263, 2004.
- Dawson S, Bennett D, Carter SD, et al: Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.*, 56: 133-143, 1994.
- Geissler K, Schneider K, Platzer G, et al: Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestation. *Virus Res.*, 48 (2): 193-206, 1997.
- Van Vuuren M, Geissler K, Gerber D, et al: Characterisation of a potentially abortifigen strain of feline calicivirus isolated from a domestic cat. *Vet. Rec.*, 144: 636-638, 1999.
- Schaffer FL, Soergel ME, Black JW, et al: Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog. *Arch. Virol.*, 84: 181-195, 1985.
- Mochizuki M, Kawanishi A, Sakamoto H, et al: A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet. Rec.*, 132: 221-222, 1993.
- Evermann JF, Bryan GM, McKeirnan: Isolation of a calicivirus from a case of canine glossitis. *Canine Pract.*, 8: 36-39, 1981.
- Evermann JF, McKeirnan AJ, Smith AW, et al: Isolation and identification of caliciviruses from dogs with enteric infections. *Am. J. Vet.*, 46: 218-220, 1985.
- Gabriel S, Tohya Y, Mochizuki M: Isolation of a calicivirus antigenically related to feline caliciviruses from feces of a dog with diarrhoea. *J. Vet. Med. Sci.*, 58: 1041-1043, 1996.
- Martella V, Pratelli A, Gentile M, et al: Analysis of the capsid protein gene of a feline-like calicivirus isolated from a dog. *Vet. Microbiol.*, 85: 315-22, 2002.
- Pratelli A, Greco G, Camero M, et al: Isolation and identification of a calicivirus from a dog with diarrhoea. *The New Microbiologica* 23: 257-60, 2000.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, et al.: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J. Gen. Virol.*, 82: 1555-1560, 2001.
- Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, et al: A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.*, 105: 1-7, 2005.
- Roerink F, Hashimoto M, Tohya Y, et al: Organization of the canine calicivirus genome from the RNA polymerase gene to the Poly(A) tail. *J. Gen. Virol.*, 80: 929-935, 1999.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al: Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 83: 145-54, 1999.
- Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98, 1999.
- Kumar S, Tamura K, Nei M: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 153-163, 2004.
- Povey RC: Serological relationship among feline caliciviruses. *Infect. Immun.*, 10: 1307-1314, 1974.
- Pratelli A, Buonavoglia D, Martella V, et al.: Enteriti virali del cane: risultati di un'indagine virologica. *Veterinaria* 6: 57-63, 1999.
- Coyne KP, Jones RD, Kipar A, et al: Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.*, 158: 544-550, 2006.
- Ohe K, Takahashi T, Hara D, et al: FCV-VBS isolated from cats with typical symptoms caused VSD in experimental cats. *Vet. Res. Communications*, in press.
- 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.
- Ossiboff RJ, Sheh A, Shotton J, et al: Feline calicivirus (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *J. Gen. Virol.*, 88: 506-517, 2007.
- Ormerod E, Jarrett OJ: A classification of feline calicivirus isolates based on plaque morphology. *Gen. Virol.*, 39: 537-540, 1978.
- Fujita Y, Sato Y, Ohe K, et al: Capsid protein genetic analysis and viral spread to the spinal cord in cats experimentally infected with feline calicivirus (FCV). *Vet. Res. Communications*, 29: 517-526, 2005.

## CAB ABSTRACTS



CAB Abstracts è il database bibliografico più grande al mondo nel settore della medicina veterinaria. CAB Abstracts, coprendo praticamente tutte le pubblicazioni scientifiche mondiali (riviste e atti congressuali) di medicina veterinaria, permette di fare ricerche bibliografiche complete e mirate. A differenza di PubMed, il data base gratuito finanziato dal Governo Americano che copre prevalentemente la medicina umana, l'accesso a CabAbstract normalmente non è libero ma prevede un abbonamento individuale. Da quest'anno questo servizio straordinario è offerto gratuitamente ai soci delle

Società SCIVAC, SIVAR, SIVE, SIVAE, SIVAL, AIVEMP ed ai soci delle Società Specialistiche SCIVAC e SIVE in regola con il pagamento della quota associativa per l'anno in corso.

Per accedere al servizio è necessario entrare nella propria pagina di Ego al sito <http://ego.evsrl.it> tramite le user name e password stampate su tutte le ricevute di iscrizioni associative o versamento di caparre rilasciate da EV. Se hai smarrito o non hai mai ricevuto il nome utente e la password per accedere a Ego, puoi riceverla compilando il box on line apposito nel sito <http://ego.evsrl.it> o scrivendo a [info@scivac.it](mailto:info@scivac.it) o telefonando alla Segreteria EV allo 0372 46040.

**IMPORTANTE: il servizio funziona solo se il browser consente l'apertura delle finestre a comparsa (popup).**

È quindi necessario disattivare, PRIMA di effettuare l'accesso, qualsiasi strumento di blocco popup (ad es.: blocco popup di Internet Explorer, Google Toolbar, Yahoo Toolbar; funzione "Blocca finestre a comparsa" di Safari, nel menu "Safari"; etc.).

