

Allestimento di un test ELISA per l'evidenziazione di anticorpi nei confronti di norovirus in gatti domestici

RIASSUNTO

Introduzione e scopo del lavoro. Recentemente sono stati identificati calicivirus enterici geneticamente correlati a norovirus (NoV) umani di genogruppo IV nelle feci di carnivori (leone e cane), dimostrando per la prima volta la possibile circolazione di tali virus nei carnivori. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di anticorpi anti-NoVs in una popolazione di gatti, mediante l'impiego di una metodica ELISA basata sulla proteina capsidica VP1 del ceppo NoV di leone (Pistoia/387/06/ITA).

Materiali e metodi. Per l'espressione della proteina capsidica VP1, il gene ORF2 è stato clonato nel vettore pRN16 ed impiegato per transfettare con il DNA linearizzato del baculovirus le cellule di insetto. La proteina ricombinante VP1 è stata quindi impiegata per l'allestimento di un kit ELISA per valutare la presenza di anticorpi anti-NoV in 211 sieri di gatto.

Risultati e discussione. Dei 211 campioni testati, 34 (16,11%), presentavano anticorpi nei confronti della proteina VP1 del ceppo NoV di leone. Valutando la prevalenza anticorpale in base alla provenienza dei soggetti esaminati, la più elevata positività è stata dimostrata nei gatti del Bioparco di Roma con valori pari al 32,43% (12/37). Tali risultati indicano che l'infezione da NoVs è comune nella popolazione felina.

INTRODUZIONE

I *Norovirus* (NoV) sono piccoli virus non coltivabili *in vitro*, appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*, attualmente riconosciuti come una delle principali cause di gastroenterite di origine non batterica nell'uomo^{1,2,3}. Sebbene l'infezione sostenuta da NoV presenti solitamente decorso acuto autolimitante⁴, la ridottissima dose infettante e la resistenza nell'ambiente di tali virus favoriscono epidemie anche molto vaste coinvolgendo soprattutto contesti comunitari quali ad esempio ospedali, mense e scuole. La trasmissione avviene attraverso il contatto diretto, per via oro-fecale o aerosol, oppure tramite acqua o alimenti contaminati, ma anche per contatto con superfici contaminate.

Sulla base dell'analisi di sequenza del gene ORF2 codificante per la proteina capsidica VP1, i NoV vengono suddivisi in cinque genogruppi (G)⁵. I virus di genogruppo GI, GII e GIV sono riconosciuti come causa di gastroenterite nell'uomo. Virus di genogruppo GII sono stati identificati anche nei suini. Virus di genogruppo GIII sono stati identificati nei bovini, mentre virus GV sono stati identificati nel topo. Il genogruppo GII include 17 genotipi identificati nell'uomo, ma i virus di genotipo GII.4 sono quelli di più frequente riscontro. Poiché manca un sistema di coltivazione *in vitro* e poiché sistemi diagnostici per NoV sono stati sviluppati solo di recente, i dati sull'epidemiologia dei NoV sono limitati. Recentemente, è stato possibile acquisire nuove informazioni in merito alla diversità genetica e alla diffusione di questi patogeni nell'uomo e in altre specie animali grazie all'adozione su larga scala di tecniche diagnostiche molecolari, quali la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), e alla produzione di antigeni sintetici utilizzati per l'allestimento di kit diagnostici di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)⁶.

Recenti studi hanno messo in evidenza una elevata omologia tra alcuni ceppi NoV animali e NoV umani. In Giappone⁶, Europa^{7,10} e Stati Uniti⁸ sono stati identificati NoV simili ai NoV umani GII. Inoltre, è stato dimostrato che suini gnotobiotici possono essere infettati per via orale con un ceppo NoV GII.4 umano HS66 (HuNoV-HS66)⁹, evidenziando la possibilità di una trasmissione interspecifica dei NoV. Recentemente è stata anche descritta in Italia l'infezione da NoV nel contenuto intestinale di un cucciolo di leone morto in cattività a seguito di grave enterite emorragica (ceppo Pistoia/387/06/ITA)¹¹ e nelle feci di un cucciolo di cane (ceppo Bari/170/07-4/ITA)¹², affetto da grave gastroenterite. I due virus sono risultati molto simili tra di loro a livello genetico, con una omologia aminoacidica (aa) nella proteina capsidica VP1 pari al 90,1%, e sono entrambi geneticamente correlati a virus umani di genogruppo GIV (Alphatron-like). Tale dato merita ulteriori approfondimenti per conoscere meglio l'epidemiologia e la diffusione di que-

B. Di Martino¹, C. Di Rocco¹, E. Lorusso²,
A. Radogna², O. Pattacini³, C. Norcio³,
L. Carnevali³, K.G. Friedrich⁴, V. Martella²

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete,
Università degli Studi di Teramo

² Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali,
Università di Bari

³ Servizio Veterinario - Azienda USL di Reggio Emilia

⁴ Giardino Zoologico di Roma - Bioparco S.p.A.

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 28/11/2008 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 11/06/2009".

sti nuovi virus nei carnivori, in quanto potenziale serbatoio di NoV trasmissibili all'uomo. Seguendo i criteri attualmente utilizzati per la classificazione dei NoV⁵, i due nuovi ceppi sono stati classificati come genotipo IV.2, mentre i NoV umani sono inclusi nel genotipo IV.1.

Nel cane è stata occasionalmente descritta la presenza di calicivirus correlati al calicivirus del gatto (FCV) ma anche di altri vesivirus, di cui è prototipo il virus 48. FCV sono stati isolati anche nei felidi selvatici. Per contro, NoV non erano mai stati segnalati nei carnivori. La presenza di NoV in un felino selvatico solleva quesiti interessanti in merito alla possibile circolazione dei NoV nei gatti. Al fine di acquisire ulteriori informazioni sulla diffusione di tali patogeni, è stata effettuata un'indagine sierologica in gatti domestici e di strada, utilizzando un test ELISA preparato con la proteina capsidica VP1 ricombinante, prodotta a partire dal NoV Pistoia/387/06/ITA identificato nel leone.

MATERIALI E METODI

a) Espressione della proteina ricombinante VP1 e produzione di virus like- particles (VLPs)

Per la produzione delle VLPs è stato impiegato il ceppo NoV GIV.2/Pistoia/387/06/ITA identificato in un campione fecale proveniente da un cucciolo di leone morto in seguito ad una grave forma di gastroenterite emorragica¹¹. Il baculovirus ricombinante basato sul virus poliedrico *Autographa californica* (AcNPV) è stato propagato sulle linee cellulari continue *Spodoptera frugiperda* (Sf9 e Sf21) come descritto da King e Possee²⁰. L'intero gene ORF2 codificante per la proteina capsidica VP1 del ceppo NoV di leone, è stato amplificato mediante PCR impiegando una coppia di primers che includevano all'estremità 5' il sito di restrizione per *BamHI*. Il gene amplificato è stato clonato nel sito di multiclonaggio del vettore pRN16 (SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PstI, SphI, SmaBI), sotto il controllo del promotore della poliedrina. Il clonaggio del vettore ingegnerizzato è stato eseguito mediante trasformazione di cellule competenti *E. coli* DH5 alfa. Il corretto orientamento degli inserti è stato verificato tramite mappatura con gli enzimi di restrizione e sequenziamento nucleotidico. Il vettore contenente il gene codificante per la proteina capsidica VP1 e il DNA linearizzato di AcNPV sono stati impiegati per la co-transfezione della linea cellulare di insetto Sf21. Il baculovirus ricombinante è stato quindi selezionato e purificato mediante il metodo delle placche, sulla base dell'abilità del baculovirus wild-type, in possesso del gene lacZ, di dare placche di colore blu in presenza del substrato cromogeno X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Al fine di verifi-

care l'avvenuta espressione della proteina ricombinante, tutte le placche selezionate sono state dapprima amplificate su cellule Sf9 e successivamente risospese in buffer di lisi (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% sodium dodecyl sulfate [SDS]; 20% glycerol; 0,2% bromophenol blue; 2% β-mercaptoethanol) e analizzate mediante elettroforesi in gel di acrilamide al 10% (SDS-PAGE). Sulla base dei risultati ottenuti, il baculovirus ricombinante è stato dapprima amplificato su cellule Sf9 (8x10⁵ cellule/ml in un volume totale di 50 ml) e quindi titolato in unità formanti placche (PFU) su cellule Sf21 secondo la metodica riportata da Di Martino e coll.²¹. Per la produzione della VLP, 100 ml di cellule Sf9 (1 x 10⁶ cellule/ml) (cresciute in sospensione) sono state infettate con baculovirus ricombinante impiegando una Molteplacità di Infezione di 3 (PFU/cellula). A 48 ore post-infezione (p.i.) il surnatante è stato separato dalle cellule lisate (la lisi è stata indotta dalla replicazione virale) mediante centrifugazione a 8000 rpm per 20 minuti e utilizzato al fine di ottenere la proteina ricombinante purificata. Le VLPs sono state quindi concentrate su cuscino di saccarosio al 30% in buffer TEN (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA and 1 M NaCl) mediante centrifugazione a 76221 g per 2 ore nel rotore Beckman SW28. Il pellet ottenuto è stato risospeso in gradiente discontinuo di saccarosio 10-30-40-60% in buffer TEN e centrifugato per 2 ore a 96467 g nel rotore Beckman SW 28 secondo quanto descritto da Oehmig e coll.²². L'espressione della proteina ricombinante è stata valutata sottoponendo tutte le frazioni purificate a corsa elettroforetica in gel di acrilamide al 10% (SDS-PAGE). Al fine di studiare la morfologia delle proteine ricombinanti e verificare l'avvenuto assemblaggio di VP1 in VLPs, 20 μl di ciascuna frazione contenente la proteina purificata sono stati fissati su retini (400-Mesh) per microscopia elettronica per circa 15 min, e dopo colorazione negativa con acido fosfotungstico al 2% (pH 7,2) per 1 min, sono stati esaminati al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

b) Produzione del siero iperimmune anti-VP1 NoV

Due conigli provenienti da un allevamento indenne per la malattia emorragica del coniglio e sieronegativi per FCV, sono stati immunizzati per via sottocutanea con 1 ml di VLP purificata (1 mg/ml) mescolata ad un eguale volume di adiuvante incompleto di Freund (Sigma), come precedentemente descritto²¹. Successivamente, sono state effettuate quattro ulteriori inoculazioni per via sottocutanea a distanza di 15 giorni l'una dall'altra. Dopo 7 giorni dall'ultima inoculazione, è stato prelevato il sangue per verificare mediante Western Blotting (WB)²¹ l'avvenuta produzione di anticorpi anti-VP1 ricombinante.

c) Allestimento della metodica ELISA ricombinante e indagine sierologica nei gatti

La proteina ricombinante VP1 del ceppo NoV (di leone) NoV GIV.2/Pistoia/387/06/ITA, è stata impiegata come antigene per l'allestimento di un sistema ELISA per la ricerca degli anticorpi. La quantità di antigene ricombinante purificato è stata determinata con lo spettrofotometro e analisi densitometrica in SDS/PAGE impiegando degli standards di riferimento di sieralbumina bovina (BSA). In questo modo è stato possibile definire la concentrazione iniziale della proteina ricombinante. Per l'allestimento della metodica, diluizioni seriali dell'antigene (1000 µg, 100 µg, 10 µg, 1 µg, 0,1 µg) in tampone carbonato-bicarbonato (pH 9,6) sono state poste in piastre a 96 pozzetti EIA/RIA e lasciate adsorbire per una notte a +4°C. Successivamente le piastre sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS pH 7,2 contenente Tween/20 (PBS/T) e saturate con una soluzione di PBS pH 7,2 contenente BSA all'1% a temperatura ambiente per 2 ore. Successivamente per ciascuna diluizione dell'antigene, sono state utilizzate diverse diluizioni seriali del siero iperimmune positivo e di un siero negativo di coniglio, al fine di stabilire la diluizione d'uso dei campioni di siero. Dopo incubazione a 37°C per 1 ora, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS/T e sono state aggiunte anti-IgG di coniglio coniugate con perossidasi (1:1000) per 1 ora a 37°C. Dopo l'aggiunta del substrato cromogeno la lettura della piastra è stata eseguita mediante spettrofotometro a 405 nm. Il valore di cut-off è stato stabilito come la media dei valori netti delle assorbanze a 405 nm dei controlli negativi, rappresentati oltre che dal siero di controllo incluso nella prova, da n° 25 sieri di gatto (in questo caso sono state impiegate anti-IgG di gatto coniugate con perossidasi alla diluizione di 1:2000) risultati negativi in WB più due deviazioni standard. Sono stati esaminati complessivamente 211 sieri di gatto, la cui provenienza era la seguente:

- n° 96 sieri raccolti presso gli ambulatori veterinari privati della provincia di Teramo;
 - n° 44 sieri provenienti da colonie feline stanziate all'interno del comune di Reggio Emilia;
 - n° 37 sieri provenienti da colonie feline stanziate all'interno del Bioparco di Roma;
 - n° 34 forniti dal Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia dell'Università degli Studi di Bari.
- Tutti i sieri sono stati testati alla diluizione di 1:50 ed in ciascuna prova sono stati inclusi come controlli negativi un siero iperimmune di gatto anti-FCV F9 e due sieri iperimmuni di coniglio rispettivamente anti-FCV F9²³ e anti-VP1 FCV F9²¹.

RISULTATI

L'espressione della proteina ricombinante VP1 e la successiva produzione delle VLPs, sono state con-

fermate dall'analisi mediante elettroforesi in gel di acrilamide che ha rivelato la presenza di una banda del peso molecolare di circa 60 kDa corrispondente al peso molecolare atteso della proteina capsidica del ceppo NoV di leone GIV.2/Pistoia/387/06/ITA. L'identità della proteina è stata successivamente confermata mediante WB utilizzando un siero iperimmune anti-VP1 prodotto nel coniglio (Fig. 1). L'osservazione al TEM ha permesso di rilevare la presenza delle VLPs nel surnatante raccolto 48 p.i. e purificato in gradiente di saccarosio (Fig. 2A e 2B).

Relativamente all'allestimento del test ELISA, il valore di cut-off è risultato di 0,60 di densità ottica (DO₄₀₅), come valore medio di assorbanza più due deviazioni standard dei venticinque sieri di gatto risultati negativi in WB. Come riportato nella Tabella 1, dei 211 sieri testati, n° 34 (16,11%), presentavano anticorpi rivolti nei confronti della proteina VP1 del ceppo NoV leone/GIV.2/Pistoia/387/06/ITA. Valutando la prevalenza anticorpale in base alla provenienza dei soggetti esaminati, si è rilevato la più elevata positività nei gatti del Bioparco di Roma pari al 32,43% (12/37), mentre nei gatti provenienti dalle cliniche di Teramo, Bari e Reggio Emilia la prevalenza è risultata rispettivamente del 14,58% (14/96), 14,70% (5/34) e 6,81% (3/44).

I sieri risultati positivi in ELISA, sono stati confermati anche nel test WB.

DISCUSSIONE

I calicivirus (famiglia *Caliciviridae*) sono molto diffusi e possono essere causa di infezioni e patologie a carico di diversi organi e apparati nelle varie specie animali. Nel corso degli ultimi anni, la maggior parte degli studi si sono focalizzati sul

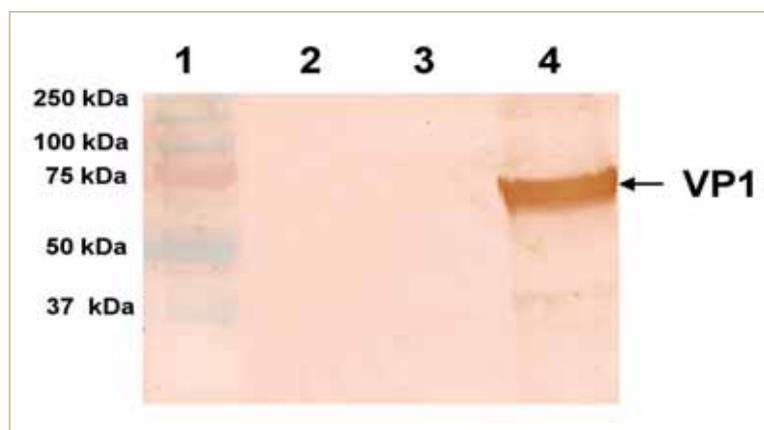


FIGURA 1 - Analisi mediante Western Blotting della proteina capsidica VP1 del ceppo NoV di leone Pistoia/387/06/ITA. Corsia 1: Protein standards (Precision Plus Protein Standards, Biorad); corsia 2: cellule Sf9 non infette; corsia 3: cellule Sf9 infettate con il baculovirus ricombinante VP1 di FCV; corsia 4: cellule Sf9 infettate con il baculovirus ricombinante VP1 del ceppo NoV di leone.

ruolo dei calicivirus quali agenti entero-patogeni, con particolare attenzione nei confronti dei NoV, attualmente riconosciuti come una delle principali cause di gastroenterite non batterica nell'uomo, ed indicati come potenziali agenti

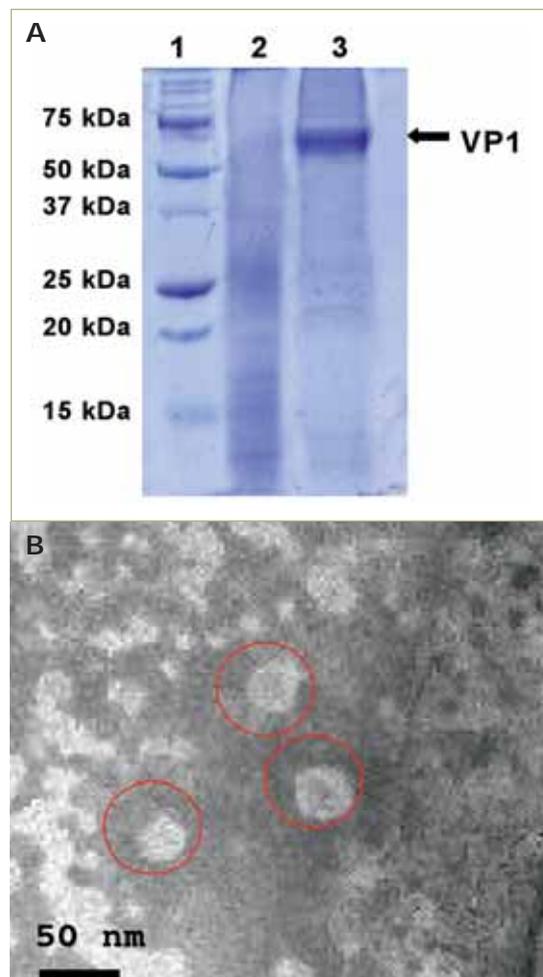


FIGURA 2 - A) Analisi mediante SDS/PAGE (12%) della proteina capsidica VP1 del ceppo NoV di leone Pistoia/387/06/ITA dopo purificazione in gradiente di saccarosio. Corsia 1: Protein standards (Precision Plus Protein Standards, Biorad); corsia 2: cellule Sf9 non infette; corsia 3: cellule Sf9 infettate con il baculovirus ricombinante VP1 di FCV. B) Osservazione al microscopio elettronico delle VLPs ottenute in seguito a concentrazione e purificazione della proteina ricombinante VP1 del ceppo NoV di leone (80.000x).

zoonosici^{1,2,3}. In considerazione dell'importanza di tale ultimo aspetto, risulta necessario quindi intraprendere ulteriori ricerche per studiare e definire l'epidemiologia dei NoV negli animali. Sinora gli studi effettuati hanno raccolto informazioni frammentarie ed incomplete a causa dell'impossibilità di coltivare tali virus *in vitro*. L'applicazione di metodiche diagnostiche biomolecolari ha permesso di evidenziare una possibile circolazione interspecie dei NoV anche se, al momento, non è stato possibile effettuare studi epidemiologici su larga scala nelle varie specie animali. L'indagine sierologica è sicuramente più facile da sviluppare e quindi meno costosa ma molto affidabile in quanto la risposta immunitaria nei confronti di NoV tende ad essere genotipo-specifica e quindi scevra di reattività crociate. In questa ottica il sistema ELISA, basato sulla proteina ricombinante VP1 del NoV Pistoia/387/06/ITA, può rappresentare uno strumento di indagine fondamentale. La scelta di utilizzare tale sistema di espressione è legata alla necessità di avere a disposizione una proteina simile a quella originaria in termini di struttura secondaria e terziaria al fine di mantenere inalterati gli epitopi lineari e conformazionali, in modo da aumentare l'affidabilità e da facilitare la standardizzazione del sistema diagnostico attraverso l'utilizzo di antigeni altamente purificati. La proteina sintetica VP1 dei norovirus infatti tende ad assemblarsi a formare strutture capsidiche (virus-like particles, VLP) molto simili alle particelle virali infettanti. Indagini analoghe condotte attraverso l'utilizzo di VP1 ricombinante sono state eseguite anche in altre specie animali²⁴ dimostrando l'affidabilità di questo approccio investigativo.

L'indagine suggerisce che i NoV possano circolare nei gatti con una prevalenza media, nella popolazione da noi studiata, del 16,11%. La prevalenza più elevata (32%) è stata riscontrata nella colonia dei gatti del Bioparco di Roma. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che si tratta di un gruppo di gatti che convivono negli stessi spazi e che sono quindi in grado di infettarsi tra di loro, oppure potrebbe derivare dalla esposizione nei confronti di NoV circolanti in altri felini presenti nel Bioparco.

I dati ottenuti nel presente studio dimostrano per la prima volta che i gatti sono esposti all'infezione da NoV. Sono stati identificati anticorpi per NoV di genotipo GIV.2, finora identificati solo nei carnivori^{11,12}. Il ruolo patogeno dei NoV nei carnivori non è chiaro, e andrebbe verificato sperimentalmente. Sebbene la valutazione dell'attitudine patogena dei NoV nei carnivori sia un aspetto di notevole interesse, è altresì interessante la conferma che tali NoV circolino nei carnivori e la loro somiglianza con i virus umani GIV.1 (Alphatron-like). I virus umani GIV.1, di cui è prototipo il ceppo Alphatron, sono stati identificati nell'uomo in modo occasionale e sono geneticamente mol-

TABELLA 1

Risultati dell'indagine sierologica eseguita mediante il test ELISA su n° 211 sieri di gatto

Numero Sieri	Provenienza	Positivi	Negativi
96	Teramo	14 (14,58%)	82 (85,42%)
44	Reggio Emilia	3 (6,81%)	41 (93,19%)
37	Bioparco Roma	12 (32%)	25 (68%)
34	Bari	5 (14,07%)	29 (85,93%)
211	Totale sieri esaminati	34 (16,11%)	177 (83,89%)

to ben conservati, caratteristica che suggerisce un'origine recente a partire da un unico evento zoonosico. La scarsa diffusione, inoltre, potrebbe essere indice di uno scarso adattamento a replicare nell'uomo. Un recente studio in Messico ha messo in evidenza che la presenza di un cane in ambiente domestico aumenta significativamente la possibilità di avere anticorpi per NoV²⁵. Diversi studi hanno dimostrato in modo inequivocabile che l'uomo può infettarsi con virus enterici di cane e gatto^{26,27}. L'analisi di sequenza degli stipti rotavirus G3P[3] umani Ro1845 e HCR3A ha dimostrato che tali virus sono del tutto simili ai ceppi di rotavirus del cane CU-1, K9 e A79-10 ed al ceppo di rotavirus felino Cat97 in tutti i segmenti del genoma²⁸. L'ipotesi che i carnivori domestici possano rappresentare un reservoir di virus enterici per l'uomo ed aver contribuito in un recente passato alla creazione di nuovi ceppi NoV umani è molto suggestiva e merita sicuramente di essere approfondita.

■ **Development of a recombinant Elisa kit to identify antibodies against noroviruses in domestic cats**

Summary

Introduction and aim of the study. Recently, novel enteric caliciviruses closely related to human norovirus (NoVs) of genogroup IV have been detected from the stools of carnivores (a captive lion cub and a young pup), suggesting the existence of a new clade of NoVs in carnivores. In order to investigate the prevalence of antibodies against NoVs in cats, we expressed in the baculovirus system the capsid protein VP1 of the lion NoV strain (Pistoia/387/06/ITA) and we used the recombinant antigen for the development of an ELISA test.

Material and methods. For the expression of the lion NoV VP1 capsid protein, the full-length ORF2 gene was cloned into the *Bam*H1 site of the pRN16 vector. The construct was used to transfect insect cells along with the baculovirus linearized DNA. The recombinant VP1 protein was used to develop an ELISA test that was used to screen 211 sera of cat for the presence of antibodies against NoVs.

Results and discussion. The overall prevalence of GIV NoV-specific antibodies was 16,11% (34/211). The prevalence was higher (32%) in free-ranging cats living in Rome Bioparco than in domestic cats. Our preliminary results indicate that NoVs infection may be common among cats.

BIBLIOGRAFIA

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al.: Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 607-625, 1999.
2. Koopmans M, Vinje J, de Wit M, et al.: Molecular epidemiology of human enteric calicivirus in The Netherlands. *J. Inf. Dis.*, 181: S262-S269, 2000.
3. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al.: Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Inf. Dis.*, 186: 1-7, 2002.
4. Di Bartolo I, Magnino S, Monini M, et al.: Clonaggio, espressione e caratterizzazione antigenica della proteina del capsido di un ceppo di Norovirus. *Il Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria*, 27, 7-8 giugno 2007.
5. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al.: Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346: 312-23, 2006.
6. Sugjeda M, Nagaoka H, Kakishima Y, et al.: Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch. Virol.*, 143: 1215-21, 1998.
7. van Der Poel WH, Vinje J, van Der Heide R, et al.: Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg. Infect. Dis.*, 6: 36-41, 2000.
8. Wang QH, Han MG, Cheetham S, et al.: Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 1874-81, 2005.
9. Cheetham S, Souza M, Meulia T, et al.: Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J. Virol.*, 80: 10372-81, 2006.
10. Mattison K, Shukla A, Cook A, et al.: Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1184-1188, 2007.
11. Martella V, Campolo M, Lorusso E, et al.: Norovirus in Captive Lion Cub (*Panthera leo*). *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1071-1073, 2007.
12. Martella V, Lorusso E, Decaro N, et al.: Detection and characterization of a canine norovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1306-1308, 2008.
13. 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.
14. Mochizuki M, Kawanishi A, Sakamoto H, et al.: A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet. Rec.*, 132: 221-222, 1993.
15. Evermann JF, Bryan GM, McKeirnan: Isolation of a calicivirus from a case of canine glossitis. *Canine Pract.*, 8: 36-39, 1981.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Packer C, Altizer S, Appel M, et al.: Viruses of the Serengeti: patterns of infection and mortality in African lions. *J. Anim. Ecol.*, 68: 1161-78, 1999.
20. King LA, Possee RD: *The Baculovirus expression system: a laboratory guide*. Chapman and Hall; London, England, 1992.
21. Di Martino B, Marsilio F, Roy P: Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Vet Microbiol.*, 120: 173-8, 2007.
22. Oehmig A, Buttner M, Weiland F, et al.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin. *J. Gen. Virol.*, 84: 2837-2845, 2003.
23. Buonavoglia D, De Palma MG, Camero, et al.: Correlazione sierologica fra gli stipti di calicivirus felino (FCV) isolati in Italia e lo stipte vaccinale F9. *Veterinaria*, 14: 65-68, 2000.
24. Kamata K, Shinozaki K, Okada M, et al.: Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.*, 76: 129-136, 2005.
25. Peasey AE, Ruiz-Palacios GM, Quigley M, et al.: Seroepidemiology and risk factors for sporadic norovirus/Mexico strain. *J. Infect. Dis.*, 189: 2027-2036, 2004.
26. De Grazia S, Giammanco GM, Martella V, et al.: Human/feline G3P[9] rotaviruses in Italian children with enteritis. *J Clin Microbiol.*, 46: 357-360, 2008.
27. De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, et al.: Iturriza-Gomara M, Ramirez S, Cascio A, Colomba C, Arista S. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.*, 13: 1091-1093, 2007.
28. Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*, 380(2): 344-53, 2008.