

VIRUS DEL CIMURRO DEL CANE (CDV) E GLOBALIZZAZIONE: DALL'ECOSISTEMA ARTICO ALL'ITALIA

CANINE DISTEMPER VIRUS (CDV): FROM THE ARCTIC ECOSYSTEM TO ITALY

VITO MARTELLA, MARIA STELLA LUCENTE, FRANCESCO CIRONE, ELEONORA LORUSSO,
GABRIELLA ELIA, MICHELE CAMERO, CANIO BUONAVOGLIA

Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano

Riassunto

CDV è un agente patogeno altamente letale che colpisce i cani ed altri mammiferi. Tra i ceppi recenti di CDV ed i vecchi ceppi usati nei vaccini si riscontra un elevato livello di variabilità e tali differenze genetiche ed antigeniche sono considerate come una causa possibile del crescente numero di casi di cimurro nei cani. Il gene dell'emoagglutinina (H) mostra la maggiore variabilità genetica e permette la distinzione di vari lineaggi con un pattern di distribuzione di tipo geografico ma non specie-specifico. Nel presente studio si descrive l'analisi del gene H di virus di campo identificati da cani colpiti da cimurro in Italia. L'analisi filogenetica indica l'esistenza di un gruppo omogeneo di stipiti virali, analoghi agli stipiti circolanti in Europa. Inaspettatamente, tuttavia, sono stati trovati alcuni virus (179/04 e 48/05) analoghi a stipiti CDV identificati nell'ecosistema artico (cani da slitta groenlandesi e foche siberiane) verso la fine degli anni ottanta. Il gene H di uno stipite identificato in una volpe rossa, 207/00, è risultato alquanto diverso dai virus di tipo europeo. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di almeno tre differenti lineaggi CDV in Italia. La presenza di stipiti CDV di tipo artico in Italia può essere attribuita all'importazione di cani dai paesi dell'Europa orientale.

Summary

CDV is a highly contagious viral pathogen causing lethal disease in dogs and other mammals. A high degree of genetic variation is found between recent CDV strains and the old CDV isolates used in the vaccines and the genetic variation is regarded as a possible cause of the increasing number of CDV-related diseases in dogs. The H gene shows the greatest extent of genetic variation that allows for distinction of various lineages, according to a geographical pattern of distribution and irrespective of the species of identification. In the present study, hemagglutinin (H) genes obtained from field strains detected from clinical specimens of Italian dogs were analyzed. Phylogenetic analysis revealed that a homogeneous group of CDV strains is widespread in Italian dogs, all which are included into the European lineage. Unexpectedly, strains 179/04 and 48/05 clustered along with CDVs detected in the Arctic ecosystem (Greenland sledge dogs and Siberian seals) in the late 1980s. The H protein of a red fox strain, 207/00, was unrelated to strains within the major European lineage. These results suggest that at least three different CDV lineages are present in Italy. The existence of CDV strains of the Arctic type in Italy may be accounted for by trading of dogs from Eastern Europe.

INTRODUZIONE

Il virus del cimurro (Canine distemper virus, CDV) appartiene al genere *Morbillivirus* nella famiglia *Paramyxoviridae*, assieme al virus del cimurro delle foche (phocine distemper virus, PDV-1), al virus del morbillo (measles virus, MeV), ai morbillivirus dei ruminanti (rinderpest virus, RPV e peste-des-petits-ruminants virus, PPRV) e dei ceta-

cei. CDV possiede una catena di RNA monocatenario a polarità negativa che codifica per la proteina M envelope-associata, due glicoproteine (l'emoagglutinina/recettore H e la proteina di fusione F), due proteine ad attività trascrittasi (la fosfoproteina P e la proteina maggiore L) e la proteina del nucleocapside N, che protegge l'RNA¹.

Il cimurro è una patologia nota da secoli. Una affascinante ricostruzione storiografica di Blancou² ipotizza che una epidemia di CDV si sia verificata nel 17° secolo in Europa a partire dalle colonie spagnole del Sud America, per poi muoversi lentamente dalla penisola iberica fino ai territori russi.

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 26/6/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 9/1/2007".

CDV è un virus monotipico (un unico sierotipo), come definito mediante uso di sieri policlonali, e l'infezione conferisce una immunità duratura. La proteina H è una struttura chiave sia per CDV che per l'ospite animale^{3,4}. Il virus usa questa proteina per attaccarsi ai recettori cellulari nelle prime fasi dell'infezione ed una valida risposta immunitaria dell'ospite verso tale proteina può prevenire la malattia indotta da CDV. Studi comparativi su diversi stipiti CDV hanno rilevato che il gene H è soggetto a notevole variazione genetica/antigenica e che la variazione di sequenza può alterare siti implicati nella neutralizzazione virale mediante alterazione di importanti epitopi^{5, 6, 7, 8, 9, 10}. È stata osservata una pronunciata diversità genetica nel gene H dei ceppi CDV recenti rispetto ai ceppi CDV usati di solito nei vaccini^{6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16}. L'introduzione dei vaccini vivi attenuati negli anni cinquanta ed il loro largo uso hanno contribuito in modo significativo a tenere sotto controllo il cimurro nella popolazione canina^{3,4,17}. Ciononostante, negli ultimi decenni l'incidenza del cimurro sembra essere aumentata in diverse parti del mondo e sono stati anche osservati diversi episodi di cimurro in cani vaccinati^{12, 18, 19, 20, 21, 22, 23}.

L'analisi di stipiti CDV identificati in varie aree geografiche e da varie specie animali ha messo in evidenza un drift genetico/antigenico a livello di gene/proteina H, che sembra seguire un pattern di tipo geografico. La maggior parte dei ceppi circolanti in natura può essere raggruppata in poche linee genetiche (*lineage*) o genotipi. Virus di due diversi *lineage* circolano nel continente americano; tutti i ceppi CDV isolati prima degli anni cinquanta sono simili tra loro e diversi dagli stipiti più recenti¹⁶, ad eccezione di stipiti CDV identificati a Chicago nel 1998 in un'epidemia di cimurro nei procioni²⁴. La maggior parte dei ceppi CDV americani più recenti fanno parte di un cluster genetico differente ed alquanto eterogeneo. I virus circolanti nel continente asiatico sono distinti in due *lineage*. Un ulteriore genotipo, definito artico, include stipiti CDV identificati alle latitudini settentrionali dell'emisfero boreale. Nella popolazione canina europea invece è stato identificato un unico *lineage* di CDV, mentre stipiti CDV atipici sono stati identificati nei carnivori selvatici^{6, 8, 11, 15, 16, 25}.

In questo lavoro si riporta la caratterizzazione genetica di stipiti CDV identificati in cani in Italia. Inoltre si riporta la caratterizzazione di uno stipite CDV identificato in una volpe rossa selvatica.

MATERIALI E METODI

Virus e campioni clinici

Sono stati analizzati nove stipiti CDV, di cui otto provenienti da cani con sintomi neurologici, sintomi enterici o sintomi respiratori, ed un ceppo (207/00) identificato da una volpe rossa con gravi sintomi neurologici²⁶. I campioni dei cani sono stati inviati da cliniche veterinarie del Sud Italia nel periodo 2000-2005. Strisci congiuntivali e/o di cervello sono stati sottoposti a screening iniziale con una metodica di immunofluorescenza indiretta con anticorpi monoclonali specifici per CDV e successivamente testati mediante reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR), usando la coppia di primer P2-P7 che amplifica un frammento di 478-bp del gene N di CDV²⁷. Il profilo dei vari stipiti CDV è riassunto nella tabella 1, mentre l'origine geografica è illustrata nella figura 1.

Retrotrascrizione e amplificazione PCR

La retrotrascrizione e l'amplificazione PCR del gene sono state ottenute seguendo protocolli descritti in precedenza con qualche modifica¹⁶. L'RNA totale è stato ottenuto da 25 mg di omogenato tissutale. L'RNA è stato estratto usando il kit RNeasy Kit (Qiagen, GmbH, Germania) seguendo le indicazioni del costruttore. L'RNA è stato retrotrascritto ed amplificato in un volume di 50 µl contenente 0.5 µl di ciascun primer CDV-F8 e CDV-R8 (50 pmol/µl), 0.2 mM di ciascun dNTP, 1.2 mM MgSO₄ ed 1µl di una mix contenente gli enzimi SuperScript II H- Reverse Transcriptase e Platinum Taq HiFi (Invitrogen - Life Technologies, Milano, Italia). L'RNA è stato retrotrascritto ed immediatamente sottoposto ad amplificazione PCR in una procedura one-step, usando la SuperScript One-Step RT-PCR kit (Invitrogen).

Tabella 1
Elenco degli stipiti CDV analizzati in questo studio

Ceppo	Specie	Età	Origine	Segni clinici	Vaccino
207/00	Volpe	Adulto	Lecce	Sintomi nervosi	No
178/02	Cane	53 giorni	Bari	Febbre + vomito	No
265/02-3	Cane	70 giorni	Bari	Vomito + diarrea	No
111/03A	Cane	45 giorni	Bari	Anoressia + sintomi respiratori + scolo oculare + enterite	Sì
111/03B	Cane	45 giorni	Bari	Anoressia + sintomi respiratori + scolo oculare + enterite	Sì
324/03	Cane	6 mesi	Matera	Sintomi nervosi + scolo oculare	*
179/04	Cane	80 giorni	Messina	Vomito + diarrea + sintomi nervosi	Sì
312/04	Cane	Adulto	Bari	Sintomi nervosi + scolo oculare	No
48/05	Cane	2 mesi	Roma	Sintomi nervosi	No

* dato non disponibile.



FIGURA 1 - Provenienza geografica dei vari stipiti CDV italiani.

gen - Life Technologies, Milano, Italia). La retroscrittura è stata effettuata a 48°C per 60 min, e la retroscrittura è stata subito denaturata a 95°C per 2 min. L'amplificazione è stata effettuata con 35 cicli termici di 30 s a 94°C (denaturazione), 1 min a 55°C (annealing), e 1 min a 68°C (estensione), seguiti da 10 min di estensione finale a 68°C. Per ottenere prodotti PCR adatti per il sequenziamento, un paio di primer interni RH-3 ed RH-4 è stato usato per amplificare in nested PCR l'intero gene H. Circa 0.5 µl di ciascun primer RH-3 ed RH-4 (50 pmol/µl) sono stati aggiunti in un totale di 49 µl di mix di reazione, contenente 0.5 µl di una diluizione 1:100 del primo prodotto PCR, 0.25 µl di TaKaRa LA Taq (5 U/µl) (Cambrex Bio Science Milano, Italia), 5 µl di tampone 10×PCR, 8 µl di una mix 2.5 mM di dNTP, e 35.75 µl di acqua distillata. L'amplificazione è stata condotta in 25 cicli termici a 94°C per 1 min (denaturazione), 50°C per 2 min (annealing), e 68°C per 2 min (estensione), seguiti da 10 min di estensione finale a 68°C.

Sequenziamento

I prodotti PCR RH3-RH4 sono stati purificati in Ultrafree-DA Columns (Amicon, Millipore). Il DNA è stato quindi usato come template per sequenziamento diretto, usando i primer conservati RH3 e RH4 e dei primer specifici disegnati secondo una strategia per sovrapposizione. Le sequenze sono state assemblate, usando il software Bioedit 2.1²⁸, e comparate con sequenze analoghe nei database usando i programmi BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>). Le sequenze del gene H degli stipiti 'artici' CDV sono disponibili con i numeri di accesso DQ226087 e DQ226088, per gli stipiti 179/04 e 48/05, rispettivamente. Il numero di accesso per il gene H del ceppo 207/00 è DQ228166. Le sequenze del gene H di altri stipiti CDV sono liberamente disponibili su richiesta.

Analisi filogenetica

Le sequenze nucleotidiche sono state allineate con sequenze note del gene H usando il software Mega 3.0²⁹. Il morbillivirus della foca PDV-1 è stato usato come out-group. La filogenesi è stata elaborata usando il modello di correzione della distanza di Kimura ed il metodo neighbor-joining.

La significatività statistica dell'analisi filogenetica è stata determinata mediante analisi bootstrap in 1000 repliche. L'analisi è stata inoltre effettuata con il metodo della parsimonia. L'analisi euristica è stata effettuata usando il modello Close-Neighbor-Interchange, mediante generazione casuale degli alberi iniziali. La significatività statistica dell'analisi filogenetica è stata determinata mediante analisi bootstrap in 100 repliche.

RISULTATI

Analisi filogenetica delle sequenze del gene H

La figura 2 mostra l'albero filogenetico consensus ottenuto con il metodo della parsimonia che illustra le correlazioni tra i vari ceppi CDV sulla base dell'allineamento nucleotidico del gene H. La maggior parte dei ceppi CDV italiani (178/02, 265/02-3, 111/03A e 111/03B, 324/03 e 312/04) è stata riunita in un gruppo ben definito (valore bootstrap 99%) composto esclusivamente da ceppi europei. La variazione all'interno di questo gruppo è < 3.5% aa, mentre la variazione rispetto agli altri gruppi è >4%.

Il virus di volpe 207/00, assieme agli stipiti di visone DK86 (Danimarca), e di furetto 1493, sono abbastanza distanti dai virus di tipo europeo. La proteina H dello stipite 207/00 ha una variazione > 4.2% aa rispetto a tutti i ceppi CDV, ad eccezione del virus A75/17 (3.7% aa).

Gli stipiti 179/04 e 48/05 sono stati raggruppati in un gruppo ben definito (valore bootstrap 99%), noto come genotipo 'Artico' e costituito dal virus di foca PDV-2 (Lago Baikal, Siberia) e dai virus di cane GR88 (Groenlandia del Nord) e Liud (Cina). La variazione all'interno di questo genotipo è < 3.6% aa, mentre la variazione rispetto ad altri genotipi è sempre > 4% aa.

Mediante l'analisi filogenetica sono stati identificati due ulteriori cluster, Asia-1 ed Asia-2 (valori di bootstrap 99 ed 83%). Il cluster Asia-1 include ceppi giapponesi e cinesi, KDK-1-simili. Il cluster Asia-2 include solo virus giapponesi (prototipo 98-002). I virus all'interno di questi due gruppi sono strettamente correlati tra loro (variazione < 2% aa), mentre la variazione verso virus di altri lineage è sempre > 4%.

I vecchi stipiti CDV, Onderstepoort, Convac, e Snyder Hill, tutti isolati tra il 1930 ed il 1950, ed il virus di procione 98-2654 e 98-2646, identificati nel 1998, formano un gruppo distinto (valore bootstrap 99%). La variazione aa tra questi virus è < 4.2%, mentre la variazione rispetto a stipiti CDV di altri genotipi è > 8%. Poiché tutti gli stipiti sono stati identificati nel continente americano, tale lineage è designato come America-1. Diversi stipiti americani identificati da diverse specie animali (procione, cane e felidi selvatici) sono stati raggruppati in un secondo lineage (valore bootstrap 95%), definito America-2.

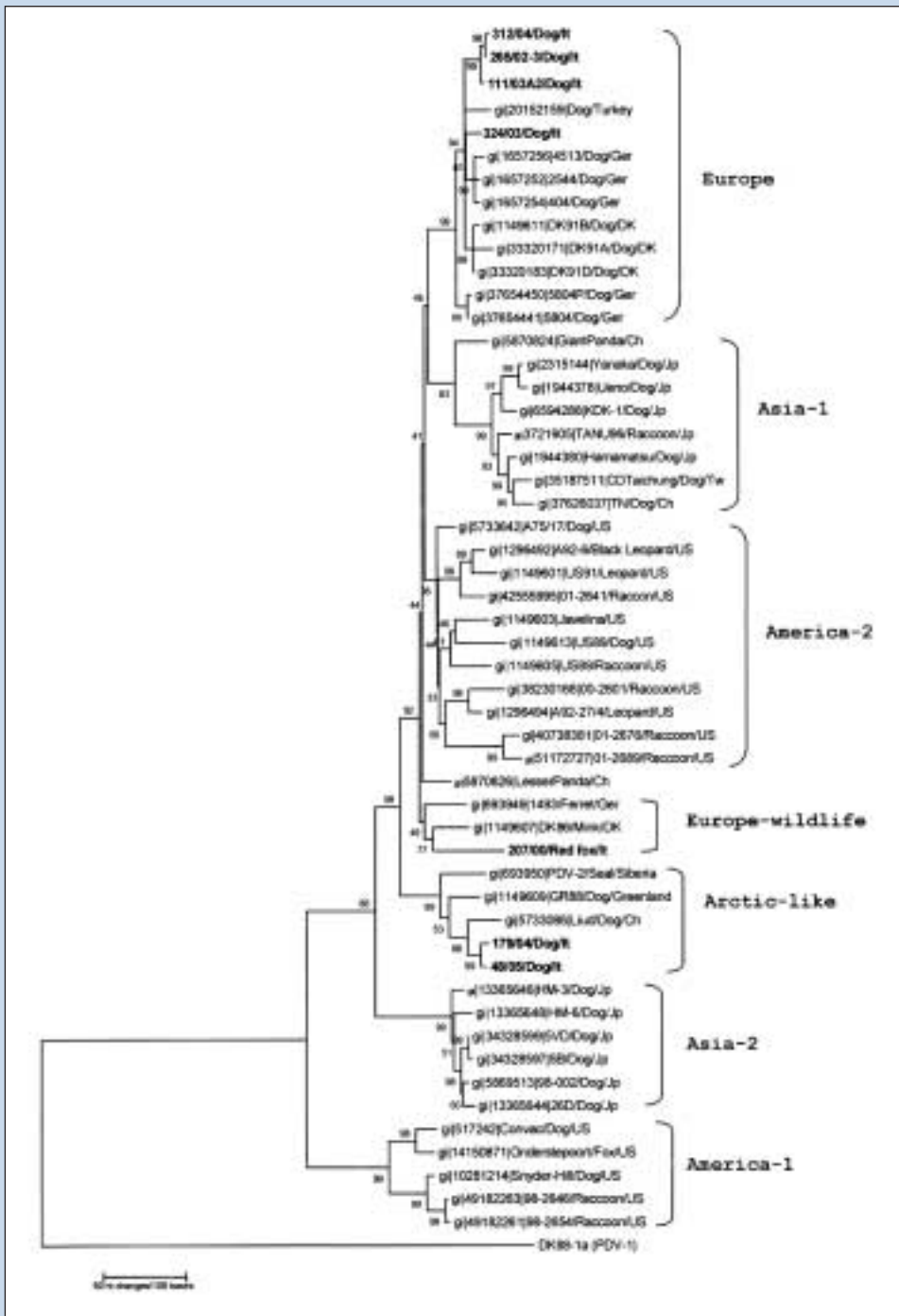


FIGURA 2 - Albero filogenetico costruito usando il gene H di stipiti CDV. Il morbillivirus di tipo 1 della foca (PDV-1) è stato usato come outgroup. Abbreviazioni: It, Italia; US, Stati Uniti; Ch, Cina; Ger, Germania; DK, Danimarca; Tw, Taiwan; Tr, Turchia; Jp, Giappone.

Analisi della sequenza aminoacidica del gene H degli stipiti CDV italiani

Il gene H degli stipiti CDV è lungo 1824 basi e codifica per una sequenza di 607 aminoacidi. Sulla base della topologia dell'albero filogenetico, è stata elaborata una matrice di comparazione. Il gene H dei virus 111/03A e 111/03B è identico al 100% a livello nucleotidico (nt). Analogamente, il gene del virus 312/04 è identico al 100% nt al gene H dei virus 265/02-3 e 178/02. Pertanto, solo i virus 111/03B e 265/02-3 sono stati inclusi nella comparazione. I virus 324/03, 265/02-3 e 111/03B hanno mostrato elevata omologia verso virus di tipo europeo (98.3- 99.0% nt e 97.0-99.0% aa). Il virus di volpe 207/00 ha mostrato ele-

vata omologia (96.3% aa e 96.3% nt) verso il virus A75/17, isolato in USA nel 1975. L'omologia ai virus europei oscilla tra il 94.6 ed il 95.8% aa ed il 95.1 ed il 96.2% nt. L'omologia nei confronti dei virus atipici europei DK86 (visone) e 1493 (furetto) è del 95.8% aa (96.3% nt) e 95.0% aa (95.8% nt).

Il virus 179/04 mostra la più elevata omologia (96.4-98.0% aa e 97.0-98.1% nt) verso i virus 'artici' GR88, Liud e PDV-2. Lo stipite 48/05 mostra la maggiore omologia verso il virus GR88 (98.4% aa e 97.7% nt). L'omologia nei confronti dei virus europei è del 93.0-94.7% aa (94.2-95.2% nt), mentre verso i virus di genotipo America-1 varia tra 90.8 e 91.7% aa (92.3 e 92.7% nt). I virus 179/04 e 48/05 hanno omologia tra loro del 99.4% aa e 99.6% nt.

DISCUSSIONE

La maggior parte degli stipiti CDV identificati nei cani nella presente indagine è risultata far parte di un gruppo omogeneo nel *lineage* europeo, evidenziando elevata omologia aa (99.0%) nei confronti dello stipite di cane 5804, identificato in Germania nel 1990. In modo alquanto inaspettato, i virus 179/04 e 48/05 hanno mostrato maggiore omologia (fino a 98.4% aa) verso stipiti CDV di *lineage* artico, che include il virus di cane GR88 identificato in Nord Groenlandia nel 1988⁵, il morbillivirus della foca PDV-2, identificato nel 1988 da una foca siberiana (*Phoca siberica*) del lago Baikal³⁰ ed un virus di cane, stipite Liud, identificato in Cina a metà degli anni novanta. La prima descrizione di morbillivirus nell'ecosistema artico risale alla fine degli anni ottanta, quando furono osservate epizootie da morbillivirus in foche nel Nord Europa ed in Siberia^{30, 31, 32, 33}. Successivamente, l'analisi genetica ha dimostrato che le due epizootie descritte nel 1987-1988 erano epidemiologicamente distinte l'una dall'altra poiché causate dal morbillivirus della foca, PDV-1, e da un virus CDV-simile, denominato PDV-2. Stipiti PDV-2-simili continuarono a circolare nel lago Baikal almeno fino al 1992 ed è stato ipotizzato che cani selvatici e domestici attorno al lago fungessero da fonte di infezione per le foche del lago, anche se virus PDV-2-simili non furono evidenziati nei cani³⁴. Più o meno negli stessi anni (1988), uno stipite CDV, GR88, strettamente correlato a PDV-2, fu identificato da un focolaio di cimurro in cani da slitta in un remoto villaggio Inuit della Groenlandia del Nord⁵. Pertanto, entrambi i virus (PDV-2 e GR88) furono considerati prototipi di un genotipo a parte di CDV, che circolava nell'ecosistema artico nelle specie suscettibili al virus del cimurro, quali l'orso polare e le volpi artiche^{6, 11, 35, 36}. Il virus 'artico' 179/04 è stato ritrovato in un cane di 3 mesi in Sicilia. Il cucciolo, vaccinato nei confronti di CDV all'età di 2 mesi, aveva presentato una forma gastroenterica e sintomi nervosi. Il virus 48/05 è stato identificato a Roma in un cane non vaccinato di 2 mesi, che presentava sintomi nervosi. L'identificazione di stipiti CDV 'Artici' in cuccioli da diverse aree geografiche solleva interrogativi sull'origine e la diffusione di questo nuovo virus. Una possibile spiegazione è che uno o più stipiti CDV di tipo artico siano stati introdotti in Italia da cani importati dall'Europa dell'Est, o dall'Asia del Nord, e che tali ceppi si siano successivamente diffusi nella popolazione canina. Quest'ipotesi, molto probabile, evidenzia quanto sia potenzialmente pericolosa per la salute dei cani l'importazione spesso non controllata di cuccioli dai Paesi dell'Est, un fenomeno che si è andato intensificando negli ultimi decenni in Italia. Indagini epidemiologiche su larga scala sono indispensabili per capire se tali virus insoliti rappresentino un ritrovamento occasionale o meno.

In questo studio è stata inoltre effettuata l'analisi del gene H di uno stipite CDV (207/00) identificato nel 2000 da una volpe rossa con gravi sintomi nervosi²⁶. Tale virus è risultato alquanto diverso (94.6-95.8% aa) dagli stipiti CDV di lineage europeo, compresi i virus identificati nei cani in Italia. Studi sierologici in cani di aree urbane e sub-urbane³⁷ suggeriscono che la trasmissione di CDV dai cani ai carnivori selvatici e viceversa avvenga abbastanza frequentemente. Inoltre, la mancanza di pattern evolutivi specie-specifici è compatibile con una libera circolazione di CDV

tra le varie specie animali. Tuttavia, nei selvatici europei (visone, furetto, volpe) sono stati sinora descritti virus diversi da quelli descritti nei cani presenti sullo stesso territorio (Fig. 2). Questi dati sono apparentemente in contrasto con l'ipotesi che diversi stipiti CDV possano circolare liberamente tra le diverse specie animali sensibili ed indicano piuttosto l'esistenza di distinti cicli epidemiologici tenuti ben separati dalle barriere ecologiche.

Non è chiaro se l'efficacia dei vaccini attualmente in uso possa essere compromessa parzialmente dal fenomeno di drift genetico/antigenico descritto a carico della proteina H. Titoli di anticorpi neutralizzanti fino a 10 volte superiori verso il virus omologo rispetto agli stipiti vaccinali di CDV sono stati evidenziati in sieri ottenuti usando stipiti CDV di campo⁸. Pertanto, il drift genetico/antigenico descritto negli stipiti CDV attualmente circolanti potrebbe essere alla base dell'apparente recrudescenza di casi di cimurro osservati nei cani vaccinati. L'analisi di stipiti CDV identificati in varie parti del mondo e da varie specie animali può pertanto essere di ausilio nel comprendere meglio la complessa ecologia di CDV e nel fornire le basi per future strategie vaccinali.

Parole chiave

Cimurro, cani, emoagglutinina.

Key words

Distemper, dogs and hemagglutinin.

Bibliografia

1. van Regenmortel HM, Fauquet CM, Bishop DHL, et al: Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, New York, 2000.
2. Blancou J: Dog distemper: imported into Europe from South America? *Hist Med Vet* 29: 35-41, 2004.
3. Appel MJ: Canine distemper virus. In: *Virus infections of carnivores*. Ed. by Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1987, pp.133-159.
4. Greene CE, Appel MJ: Canine distemper. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd ed. Ed. By C. E. Greene. W. B. Saunders Co, Philadelphia, 1998, pp. 9-22
5. Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Appel M, et al: Antigenic relationship between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Arch Virol* 123: 279-294, 1992.
6. Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, et al: Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res* 48: 165-171, 1997a.
7. Harder TC, Klusmeyer K, Frey HR, et al: Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid distemper morbillivirus isolates by kinetic neutralization using a novel immunoplaque assay. *J Virol Methods* 41: 77-92, 1993.
8. Harder TC, Kenter M, Vos H, et al: Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J Gen Virol*. 77: 397-405, 1996.
9. Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, et al: Antigenic difference in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet Microbiol* 71: 281-286, 2000.
10. Örvell C, Blixenkrone-Møller M, Svansson V, Have P: Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 71: 2085-2092, 1990.
11. Bolt G, Jensen TD, Gottschalck E, et al: Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J Gen Virol* 78: 367-372, 1997.
12. Gemma T, Watari T, Akiyama K, et al: Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J Vet Med Sci* 58: 547-550, 1996a.

13. Haas L, Harder T, Liermann H, et al: Zur Situation der Hundestaupe in Deutschland. *Kleintierpraxis* 42: 613-620, 1997b.
14. Hiram K, Goto Y, Uema M, et al: Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civets (*Paguma larvata*). *J Vet Med Sci* 66: 1575-1578, 2004.
15. Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, et al: Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol* 78: 373-380, 1997.
16. Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, et al: Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol* 37: 2936-2942, 1999.
17. Appel MJG, Summers BA: Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol* 44: 187-191, 1995
18. Blixenkron-Møller M, Svansson V, Have P, et al: Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet Microbiol* 37: 163-73, 1993.
19. Decaro N, Camero M, Greco G, et al: Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *The new Microbiologica* 27: 177-182, 2004.
20. Gemma T, Iwatsuki K, Shin YS, et al: Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *J Vet Med Sci* 58: 791-794, 1996b.
21. Kai C, Ochikubo F, Okita M, et al: Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J Vet Med Sci* 55: 1067-1070, 1993.
22. Patronek GJ, Glickman LT, Johnson R, Emerick TJ: Canine distemper infection in pet dogs: II. A case-control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. *J Am Anim Hosp Assoc* 31: 230-235, 1995.
23. Scagliarini A, Battilani M, Ciulli S, et al: Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. *Veterinary Research Communications* 27: 355-357, 2003.
24. Lednicky JA, Dubach J, Kinsel MJ, et al: Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virology Journal* 1-2: 1-14, 2004.
25. Carpenter MA, Appel MJG, Roelke Parker ME, et al: Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Vet Immunol Immunopathol* 65: 259-266, 1998.
26. Martella V, Pratelli A, Cirone F, et al: Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and Cellular Probes* 16: 77-83, 2002.
27. Shin YS, Mori T, Okita M, et al: Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Science* 57: 439-445, 1995.
28. 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.
29. Kumar S, Tamura K, Nei M: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163, 2004
30. Visser IKG, Kumarev VP, Orvell C, et al: Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Arch Virol* 111: 149-164, 1990.
31. Likhoshway YV, Grachev MA, Kumarev VP, et al: Baikal seal virus. *Nature* 339: 266, 1989.
32. Osterhaus AD, Vedder EJ: Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature* 335: 20, 1988.
33. Titenko AM, Borisova TI, Zorin VL, et al: Antibodies to morbilli virus of the Baikal seal in its natural host. *Vopr Virusol* 35: 502-503, 1990.
34. Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, et al: Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet Microbiol* 44: 251-259, 1995.
35. Cattet MR, Duignan PJ, House CA, Aubin DJ: Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from the Canadian arctic. *J Wildl Dis* 40: 338-342, 2004.
36. Harder TC, Osterhaus AD: Canine distemper virus: a morbillivirus in search of new hosts?. *Trends Microbiol* 5: 120-124, 1997.
37. Frolich K, Czupalla O, Haas L, et al: Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet Microbiol* 74: 283-92, 2000.



MI E' SEMBRATO DI ... VEDERE UN GATTO

PER SAPERNE DI PIU'...
QUEI GENI DEI GATTI

Maria Cristina Crosta - Lisa Stein

1a ed. 2007 Edizioni Lillia Stein
Volume cartonato
191 pagine - 370 fotografie a colori
Formato cm. 21,5 x 30,5
PREZZO DI COPERTINA EURO 60,00
PREZZO SCONTATO EURO 50,00

Il testo dedica un'importante sezione agli aspetti sanitari del gatto, in particolare alle predisposizioni genetiche legate alla razza del felino, ed è estremamente utile al Medico Veterinario che si occupa di Medicina Felina o che sta avvicinandosi ad essa.

Dieci capitoli per parlare geneticamente del gatto, trattando esaurientemente le sue peculiarità (pelo, mantello, struttura morfologica).
Ogni razza è analizzata dettagliatamente mediante una scheda (Razza-Codifica Standard Origine e Storia - Selezione e Colori - Caratteristiche - Genetica - Genotipo - Tipo Morfologico - Accoppiamenti Permessi) corredata da splendide fotografie.

PER ORDINI E INFORMAZIONI
EDIZIONI VETERINARIE
Tel. 0372/463507-403508 Fax 0372/403591
E-mail editoriale@edv.it www.edv.it/edvonline

