

VALIDAZIONE DEL TEST RAPIDO “SNAP COMBO PLUS” (IDEXX) E CORRELAZIONE CON WESTERN BLOTTING (WB) E POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA FIV

FULVIO RIONDATO¹, ROBERTA GUGLIELMINO¹, BARBARA MINISCALCO¹,
ANTONIO BORRELLI¹, ALBERTO TARDUCCI¹, MARIA ALICE GOMES-KELLER², HANS LUTZ²

¹Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino

²Clinical Laboratory, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, 8057 Zurich, Switzerland

Riassunto

Al fine di verificare l'attendibilità del test rapido SNAP Combo Plus (IDEXX) nella diagnosi di infezione da FIV, abbiamo analizzato 104 campioni di sangue periferico di gatto confrontando i risultati del test SNAP con quelli del Western Blotting e della PCR. Il test SNAP è risultato avere una sensibilità pari al 90% e una specificità del 98%, con conseguenti valore predittivo positivo e negativo rispettivamente del 97% e 94%, a fronte di una prevalenza dell'infezione nel gruppo del 37,5%. Viene inoltre discusso il ruolo del WB e della PCR nella diagnosi dell'infezione sostenuta da FIV.

Summary

To assess sensitivity and specificity of the SNAP Combo Plus test kit (IDEXX) and the predictive value of its positive and negative results in the diagnosis of FIV infection, peripheral blood samples from 104 cats were evaluated comparing the results of SNAP, Western Blotting and PCR. The SNAP characteristics were: sensitivity 90%, specificity 98%, positive predictive value 97%, negative predictive values 94%. The prevalence of the infection in the group of 104 cats evaluated was 37.5%. The role of WB as a gold standard and confirmation test is discussed.

INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza felina (FIV) è un Lentivirus della famiglia Retroviridae caratterizzato dalla presenza di una DNA-polimerasi RNA-dipendente, chiamata trascrittasi inversa. Questo enzima permette la retrotrascrizione dell'RNA virale in un DNA a doppia elica (provirus) che si integra nel genoma della cellula ospite. Il DNA provirale si comporta come parte del patrimonio genetico del soggetto e viene trasmesso dalla cellula infetta alle cellule figlie durante la normale replicazione cellulare. Si tratta quindi di un'infezione persistente: il gatto, una volta contratta l'infezione, rimane portatore per tutta la vita. Ne consegue che lo sviluppo di anticorpi specifici anti-FIV indica la presenza del virus nell'organismo; il rileva-

mento di tali anticorpi acquisisce quindi significato diagnostico. Negli ultimi anni sono stati sviluppati e commercializzati numerosi test rapidi per l'identificazione degli anticorpi anti-FIV, basati su metodiche immunocromatografiche o immunoenzimatiche, che consentono una facile e rapida diagnosi ambulatoriale attraverso un semplice prelievo di sangue periferico.

La metodica utilizzata per la conferma dei risultati ottenuti con i test commerciali è il Western Blotting (WB). Esso consente l'identificazione di anticorpi specifici nel siero o nel plasma, catturandoli su apposite membrane contenenti gli antigeni virali, previamente purificati, separati e trasferiti su di esse mediante elettroforesi. Il WB possiede specificità maggiore dei test rapidi ed è riconosciuto come gold standard nella valutazione di tali test. Gli anticorpi ricercati possono differire per tipo e numero a seconda degli antigeni utilizzati (core, matrice, envelope, virus intero) e la definizione di positività del risultato può seguire criteri più o meno restrittivi.

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/3/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 25/6/2005”.

La ricerca degli anticorpi anti-FIV non consente però di rilevare l'infezione negli stadi precoci, prima cioè che si abbia la sierconversione anticorpale, o nei casi in cui quest'ultima sia ritardata, e fornisce risultati falsamente positivi nei primi mesi di vita in soggetti portatori di anticorpi materni. Inoltre, parallelamente a quanto avviene per l'infezione da HIV nell'uomo, è stato dimostrato che il virus può essere isolato da gatti sieronegativi^{1,2}, suggerendo che il FIV può mantenere in vivo uno stato latente senza alcuna espressione di RNA o proteina virale. Falsi negativi possono infine essere determinati da una produzione parziale di anticorpi: la ricerca anticorpale può cioè dare esito negativo, pur in presenza di una risposta umorale specifica, se tra gli anticorpi prodotti non sono presenti quelli diretti contro gli antigeni impiegati nel test utilizzato. Al contrario, risultati falsi positivi si possono avere per la produzione di anticorpi aspecifici che cross-reagiscono con quelli specifici.

In tutti questi casi l'infezione può essere diagnosticata identificando direttamente la presenza del virus tramite isolamento. Oggi è inoltre possibile raggiungere il medesimo obiettivo avvalendosi di una metodica meno laboriosa e dispendiosa ed altrettanto efficace, la Polymerase Chain Reaction (PCR).

La PCR è una metodica di biologia molecolare il cui campo di applicazione è divenuto negli ultimi anni vastissimo ed è tuttora in espansione. Consente, grazie a primers appositamente disegnati, di riconoscere sequenze specifiche del genoma virale e, grazie all'attività dell'enzima polimerasi, di moltiplicare tali sequenze in modo esponenziale ad ogni ciclo di amplificazione. Si ottengono, alla fine del processo, milioni di copie del segmento target (specifico del virus), che diviene così rilevabile dopo migrazione elettroforetica. Possono essere rilevate sequenze provirali (DNA) o virali (RNA; RT-PCR). Specificità e sensibilità della PCR dipendono dai primers utilizzati (dalla sequenza amplificata) e dai reagenti e protocolli impiegati. In particolare, la sensibilità va determinata per ogni singola metodica.

Negli ultimi anni, anche grazie al fatto che l'infezione da FIV nel gatto è considerata un ottimo modello animale per l'HIV nell'uomo, sono state eseguite numerose ricerche che hanno evidenziato l'utilità della PCR anche nello studio delle retrovirus felini³⁻¹¹. Parimenti a quanto verificatosi in campo umano per l'HIV, la PCR può assumere un importante ruolo anche in campo veterinario nella diagnosi e prognosi delle infezioni da FIV. La ricerca del DNA provirale e la titolazione della carica virale plasmatica tramite PCR sono da qualche anno eseguite routinariamente da alcuni laboratori anche in Italia.

Al fine di verificare l'affidabilità del test rapido utilizzato nel nostro laboratorio (SNAP Combo Plus, IDEXX) abbiamo eseguito, sui campioni sottoposti al test, la ricerca di anticorpi anti-FIV nel plasma o nel siero tramite Western Blotting e la ricerca di sequenze provirali nel DNA dei leucociti circolanti tramite PCR. Il test SNAP è stato modificato negli ultimi anni introducendo un secondo antigene (gp40) per la ricerca degli anticorpi anti-FIV e il lavoro più recente in cui esso è stato valutato è precedente a tale modifica¹².

Secondo obiettivo del lavoro è esplorare le correlazioni tra le tre metodiche utilizzate e identificarne il ruolo nel percorso diagnostico dell'infezione sostenuta da FIV.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati esaminati campioni di sangue periferico di 104 gatti. La maggior parte dei campioni proveniva da soggetti sottoposti a visita presso le strutture dell'Ospedale Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino; altri campioni sono stati inviati al nostro laboratorio da colleghi liberi professionisti. Non è stato applicato alcun criterio di inclusione o esclusione; nel campione sono perciò presenti soggetti di differente età, sesso e razza, soggetti clinicamente sani e soggetti con patologie manifeste.

Nell'analisi dei risultati non si è tenuto conto di tali elementi. Data la provenienza dei campioni, nella maggioranza dei casi si trattava comunque di gatti non sani. In molti casi non erano disponibili informazioni riguardanti l'eventuale esecuzione di terapie; in conseguenza dell'incompletezza dei dati e non rientrando tale valutazione nelle finalità del lavoro, i risultati ottenuti non sono stati correlati ai diversi regimi terapeutici (in particolare somministrazione di farmaci antiretrovirali specifici e terapie immunomodulanti).

In tutti i casi il sangue è stato raccolto in provette con EDTA; i campioni sono stati processati entro le 24 ore successive all'esecuzione del prelievo.

Il sangue in EDTA è stato utilizzato per la separazione del plasma e per l'estrazione del DNA. Una aliquota di plasma o siero è stata congelata in attesa dell'esecuzione del WB.

Ogni caso è stato contrassegnato da un numero progressivo. PCR e WB sono stati eseguiti in laboratori diversi e da operatori diversi, che hanno fornito i risultati delle analisi senza essere a conoscenza dell'esito degli altri test.

Test rapido

Il plasma o il siero di ciascun soggetto è stato sottoposto al test SNAP Combo Plus (IDEXX), secondo le indicazioni del produttore.

Il test SNAP consente la diagnosi contemporanea per FeLV e per FIV, rilevando, attraverso una metodica ELISA, rispettivamente antigeni (p27) e anticorpi (anti-p24 e anti-gp40) specifici (Fig. 1).



FIGURA 1 - Test SNAP Combo Plus (IDEXX). Risultato positivo per FIV: presenza di anticorpi anti-p24 e/o anti-gp40.

Western Blotting

Il siero o plasma di tutti i soggetti è stato sottoposto a WB. Il WB utilizzato impiega antigeni derivanti da colture virali (virus intero); il virus impiegato in coltura è il Petalum (clade A). Alla luce del fatto che i virus presenti sul territorio italiano appartengono al ceppo B^{13,14}, il laboratorio considera routinariamente come risultato positivo la presenza contemporanea delle bande corrispondenti alle proteine più interne e maggiormente conservate (p15 e p24). Un test è cioè considerato positivo quando sono rilevati anticorpi diretti contro entrambi gli antigeni. Il rilievo dei soli anticorpi anti-p24 è invece interpretato, in relazione alla situazione clinica dell'animale, come test dubbio o sospetto positivo, e viene consigliata la ripetizione dell'esame a distanza di almeno 4-8 settimane. Nel presente lavoro però, volendo eseguire una valutazione dei test indipendente da fattori terzi e non avendo quindi tenuto conto delle informazioni cliniche relative ai gatti esaminati, i test p24-positivi/p15-negativi sono sempre stati interpretati come negativi (Fig. 2).

Estrazione del DNA e PCR

In 78 dei 104 casi è stato estratto il DNA da sangue intero avvalendosi del "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN), secondo le istruzioni del produttore. I campioni di DNA sono stati sottoposti alla ricerca di sequenze provirali tramite una nested-PCR non quantitativa; il frammento target identificato è una sequenza di 562bp altamente conservata all'interno del gene gag (Fig. 3).

La sensibilità della metodica è risultata essere molto elevata: il numero minimo di copie provirali identificate è pari a 1. Essa è stata valutata sottoponendo ad amplificazione diluizioni seriali del prodotto del primo step

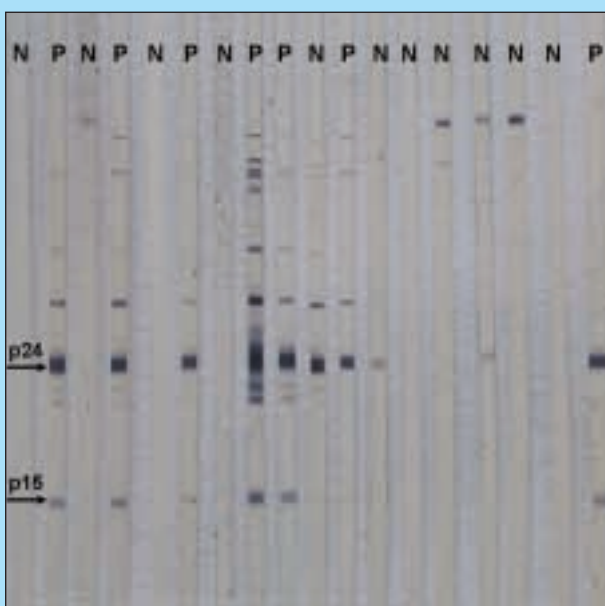


FIGURA 2 - WB. Sono indicate le bande in corrispondenza dei due antigeni virali p15 e p24. P = risultato positivo (presenza di anticorpi anti p-15 e anti-p24); N = risultato negativo (assenza di anticorpi anti p-15 e anti-p24 o presenza di un solo tipo anticorpale). Si evidenzia come in 4 casi siano presenti anticorpi anti-p24 in assenza di anticorpi anti-p15.

(674pb), precedentemente clonato e sequenziato (100% di identità con l'originale). Le amplificazioni sono state eseguite su un background di DNA genomico felino ottenuto da un soggetto sano e precedentemente risultato negativo alla PCR.

Analisi dei dati

Si sono valutati sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo del test rapido.

La sensibilità è la "positività in malattia": indica la percentuale di risultati veri positivi tra i soggetti infetti. È infatti calcolata dividendo il numero di veri positivi per il totale degli infetti.

La specificità è la "negatività in salute": indica la percentuale di risultati veri negativi nei soggetti non infetti. È calcolata come rapporto tra veri negativi e totale dei non infetti.

Il valore predittivo positivo (VPP) esprime la probabilità che un soggetto con test positivo sia effettivamente infetto. Deriva, infatti, dal rapporto tra il numero di veri positivi e il totale dei risultati positivi.

Il valore predittivo negativo (VPN) esprime la probabilità che un soggetto con test negativo sia effettivamente non infetto. Il VPN è infatti calcolato come numero di veri negativi diviso il totale dei risultati negativi.

I concetti statistici sopra esposti sono riassunti ed esemplificati nella Tabella 1.

Si è in prima analisi impiegato come riferimento il gold standard usuale, cioè il WB; in seconda analisi si sono integrati i risultati di WB e PCR.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il test SNAP ha fornito risultato positivo in 36 casi e risultato negativo in 68 casi. Il WB ha segnalato 32 campioni positivi (28 dei quali SNAP-positivi) e 72 negativi (64 dei quali SNAP-negativi).

Considerando come vera la condizione segnalata dal WB, i dati sopra citati si tradurrebbero in una sensibilità dell'88% e in una specificità dell'89%. Sulla base di tali va-



FIGURA 3 - Nested PCR. Gel di agarosio 2%; colorazione con bromuro di etidio. P = campioni positivi; N = campione negativo; M = marker; + = controllo positivo; - = controllo negativo. Sono identificabili due bande, corrispondenti alle sequenze amplificate nel primo (674pb) e nel secondo step (562pb); come riferimento sono inoltre indicate tre bande del marker.

Tabella 1

Definizione di risultato vero-positivo, vero-negativo, falso-positivo e falso-negativo e loro impiego nella valutazione di sensibilità, specificità e valore predittivo di un test

	n. soggetti con test positivo	n. soggetti con test negativo	Totale
n. soggetti infetti	VP	FN	VP+FN
n. soggetti non infetti	FP	VN	FP+VN
totale	VP+FP	FN+VN	VP+FP+FN+VN

$$\text{SENSIBILITÀ} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad \text{VPP} = \frac{VP}{VP+FP} \times 100$$

$$\text{SPECIFICITÀ} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100 \quad \text{VPN} = \frac{VN}{VN+FN} \times 100$$

VP = veri positivi (n° soggetti infetti identificati correttamente dal test); FP = falsi positivi (n° soggetti non infetti erroneamente classificati dal test); VN = veri negativi (n° soggetti non infetti identificati correttamente dal test); FN = falsi negativi (n° soggetti infetti erroneamente classificati dal test).

(Tratto da Speicher C.E. "Test di laboratorio e prove di efficacia". Seconda edizione, 1999; Il Pensiero Scientifico editore.)

lutazioni le prestazioni del test risulterebbero poco soddisfacenti e inferiori a quanto riportato in lavori precedenti¹².

Gli esiti della PCR suggeriscono però che i risultati dello SNAP smentiti dal WB non sono in realtà errati. Utilizzando il WB come riferimento, lo SNAP avrebbe fornito 8 risultati falsi positivi e 4 risultati falsi negativi. In tutti questi casi era disponibile il DNA estratto dai leucociti circolanti: la PCR è risultata positiva in 7 degli 8 casi SNAP+WB- e negativa in tutti i 4 casi SNAP-WB+, confermando quindi il test SNAP.

Un risultato positivo della PCR, una volta esclusa la possibilità di contaminazione, indica con sicurezza la presenza del virus nelle cellule e quindi l'avvenuta infezione; un risultato negativo invece, anche dopo aver escluso i principali motivi "tecnici" di falso negativo (inibitori della polimerasi, non ottimale estrazione del DNA, etc.), non esclude completamente l'eventualità di una avvenuta infezione: ad esempio in presenza di cariche provirali molto basse o di divergenze nella sequenza target. Tale eventualità è comunque poco probabile, essendo stati utilizzati primers disegnati su una regione altamente conservata del genoma virale e che rilevano i sottotipi FIV-B e FIV-A (i ceppi presenti in Italia appartengono al sottotipo B) ed avendo la PCR impiegata una sensibilità molto elevata. Considerando comunque validi solo i risultati positivi della PCR, sulla base dei dati riportati in Tabella 2, il test SNAP risulta possedere le seguenti caratteristiche: SENSIBILITÀ = 90%; SPECIFICITÀ = 98%; VPP = 97%; VPN = 94%.

Tali valori risultano soddisfacenti e confermano la validità del test, precedentemente evidenziata da Hartmann e coll. su un campione di 800 gatti¹². In questo lavoro, però, lo SNAP valutato impiegava ancora un solo antigene virale

Tabella 2

Valutazione di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) del test SNAP in relazione ai risultati di WB/PCR. Campione di 104 gatti; prevalenza dell'infezione nel campione: 37,5%

	n. soggetti con SNAP positivo	n. soggetti con SNAP negativo	Totale
n. soggetti infetti	35	4	39
n. soggetti non infetti	1	64	65
totale	36	68	104

SENSIBILITÀ = 89,7%

SPECIFICITÀ = 98,5%

VPP = 97,2%

VPN = 94,1%

(p24), inoltre sono stati sottoposti a conferma con WB solo i campioni risultati positivi e non si è fatto ricorso alla PCR.

È importante ricordare che il VPN e soprattutto il VPP sono strettamente correlati alla prevalenza dell'infezione nella popolazione analizzata. Nel caso dei 104 gatti qui presi in esame la prevalenza è del 37,5%. In una popolazione con minore incidenza di infezione, a parità di specificità del test, il VPP diminuisce: con una prevalenza del 10%, ad esempio, nel nostro caso il VPP sarebbe compreso tra 80% e 84%; con una prevalenza del 5% sarebbe 65-72%¹⁵. Si sottolinea quindi come sia sempre fondamentale valutare il risultato positivo di un qualunque test alla luce delle condizioni di rischio in cui vive il soggetto sottoposto al test stesso. L'Italia, in particolare, è uno dei paesi con la più alta prevalenza dell'infezione: essa è stata riportata essere tra il 2% e il 10% nei soggetti clinicamente sani e tra 11% e 24% nei gatti con sintomi di malattia, con una incidenza complessiva dell'11%¹⁶⁻²¹. Il nostro campione presenta una incidenza elevata in quanto è costituito da una popolazione in qualche modo selezionata: la maggioranza dei campioni di sangue proveniva da gatti condotti nelle strutture ambulatoriali per essere sottoposti a visita medica; si trattava quindi, nella maggior parte dei casi, di soggetti malati.

Il confronto con la PCR evidenzia come il WB abbia fornito alcuni risultati falsi-negativi e alcuni falsi-positivi.

È fondamentale puntualizzare che i termini "falso positivo" e "falso negativo" in questo contesto non si intendono come indicazioni errate del test, ma sono riferiti alla capacità del test di rivelare l'infezione, di fornire una diagnosi veritiera di avvenuta o non avvenuta infezione. Ad esempio, con WB falso negativo non si intende che il test non abbia rilevato anticorpi in realtà presenti, ma che l'assenza degli anticorpi ricercati dal test condurrebbe nel caso specifico ad una diagnosi errata di non-infezione. È un chiaro esempio il fatto che 6 degli 8 WB negativi in corrispondenza di SNAP positivi abbiano rilevato la presenza di anticorpi anti-p24 (rilevati anche dal test SNAP). Ricordiamo come in condizioni "normali", in associazione con rilievi clinici, questi WB sarebbero stati eventualmente interpretati come dubbi o sospetti positivi.

Per quanto riguarda la PCR va sottolineato che il risultato positivo o negativo indica rispettivamente la presenza o l'assenza della specifica sequenza provirale ricercata. Il risultato della PCR non può essere inteso quindi come conferma del risultato dei test che ricercano gli anticorpi, e viceversa. In alcune fasi dell'infezione, anzi, la carica provirale aumenta quando il titolo anticorpale diminuisce. Un risultato positivo però può essere inteso come conferma di avvenuta infezione, in quanto rileva direttamente la presenza del provirus nelle cellule.

Sono inoltre possibili risultati negativi della PCR in presenza di anticorpi, nelle seguenti situazioni: 1- in caso di soggetto realmente infetto, per cariche provirali molto basse o per infezioni sostenute da virus che presentano divergenze nella sequenza target (per mutazioni o delezioni; sottotipi virali non riconosciuti); 2- in caso di soggetto non infetto, per anticorpi che cross-reagiscono e, nei gatti fino a 6 mesi di età, per anticorpi materni. Nel caso 1 si tratta perciò di un risultato della PCR falsamente negativo, nel caso 2 di un risultato vero negativo.

Risultati contrastanti di test anticorpale e PCR (positivo vs negativo e viceversa) sono quindi possibili, pur fornendo entrambi gli esami una informazione corretta.

CONCLUSIONI

Utilizzando come riferimento il WB impiegato nel presente lavoro, il test SNAP risulterebbe deficitario, soprattutto per quanto riguarda specificità e valore predittivo positivo. Integrando però i dati del WB con quelli della PCR abbiamo rilevato come in alcuni casi il primo non confermi erroneamente il risultato dello SNAP. Alla luce dei risultati della PCR, il test SNAP risulta invece molto valido e vengono confermate le caratteristiche di sensibilità e specificità evidenziate prima delle modifiche apportate negli ultimi anni¹². Un numero maggiore di casi, eventualmente associato ad un campionamento territorialmente più esteso, sarebbe utile per una conferma definitiva di questi risultati.

I presenti risultati, dato il numero limitato di casi esaminati, sono infatti da intendersi come preliminari (una casistica decisamente più ampia potrebbe ridurre la percentuale di casi WB/SNAP discordanti). Essi pongono, tuttavia, la questione se sia corretto continuare a considerare il WB (o per lo meno qualunque WB) un adeguato test di conferma per un risultato positivo ottenuto con i test rapidi. Il WB da noi utilizzato, che impiega antigeni da virus intero purificato e che assume come risultato positivo la presenza delle due bande a livello degli antigeni del core (p15 e p24), risulta possedere una sensibilità insufficiente. Un WB diverso potrebbe risultare sufficientemente specifico e sensibile. In letteratura sono descritti differenti Western Blotting per FIV e differenti quadri interpretativi, alcuni più "restrittivi" di altri^{12,22-25}. Alcuni campioni considerati positivi in un lavoro di Peri et al.¹⁶, ad esempio, nel nostro caso sarebbero stati considerati negativi, in conseguenza dell'assenza di anticorpi anti-p15. Come precedentemente esposto, l'interpretazione "sul campo" dei WB positivi solo per gli anticorpi anti-p24 sarebbe potuta essere diversa. Ritenendo però indispensabile una interpretazione il più possibile affidabile,

indipendentemente da altre informazioni sul soggetto, abbiamo in corso un riesame del WB da noi utilizzato per verificare l'utilità delle altre bande nella definizione di risultato positivo o negativo. L'antigene p15 infatti non sembrerebbe risultare ideale ai fini diagnostici, mentre la sola p24 risulterebbe fuorviante, in quanto anticorpi anti-p24 risultano presenti anche in soggetti non infetti. L'impiego di proteine ricombinanti o di antigeni selezionati mediante anticorpi monoclonali al posto del virus intero, inoltre, potrebbe essere di beneficio, così come riportato per la metodica ELISA^{26,27}. Da non trascurare, infine, le possibili differenze antigeniche di FIV di ceppi diversi. Si vuole qui sottolineare, perciò, l'esigenza di una nuova e più approfondita valutazione del Western Blotting nella diagnosi di infezione da FIV, per verificare se possa effettivamente continuare a ricoprire il ruolo di analisi di riferimento, ritenendo opportuno, in tal caso, la definizione di una metodica standardizzata.

Attualmente la PCR appare comunque il miglior candidato a ricoprire tale ruolo, a patto che si utilizzino metodi che siano in grado di individuare il più ampio spettro possibile di ceppi virali.

In appendice, alla luce di quanto si sta verificando negli USA, si ricorda come la PCR potrebbe ricoprire un ruolo di fondamentale importanza nel discriminare soggetti infetti da soggetti vaccinati: in entrambi i casi i test anticorpali (test rapidi, WB) risultano infatti positivi.

Parole chiave

Gatto, FIV, diagnosi, test rapido, SNAP Combo Plus, western blotting, PCR.

Key words

Cat, FIV, diagnosis, rapid diagnostic test kit, SNAP Combo Plus, western blotting, PCR.

Bibliografia

1. Hopper CD, Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, et al: Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Rec* 125: 341-346, 1989.
2. Dandekar S, Beebe AM, Barlough J, et al: Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *J Virol* 66: 4040-4049, 1992.
3. Matteucci D, Baldinotti F, Mazzetti P, et al: Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31: 494-501, 1993.
4. Poli A, Abramo F, Baldinotti F et al. Malignant lymphoma associated with experimentally induced feline immunodeficiency virus infections. *J Comp Pathol* 110: 319-328, 1994.
5. Inoshima Y, Tomonaga K, Ikeda Y, et al: Quantification of FIV proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of cats infected with Japanese strains of FIV. *J Gen Virol* 76: 2193-2204, 1995.
6. Ellis JA, Jackson ML, Bartsch RC: Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J Am Vet Med Assoc* 209: 767-771, 1996.
7. Ohkura T, Shin Y, Wakamiya N, et al: Detection of FIV proviruses and viral RNA in the early stages of FIV infection in cats: a possible model of the early stages of HIV infection. *Exp Anim* 46: 31-39, 1997.
8. Goto Y, Nishimura Y, Mizuno T, et al: Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 61: 1609-1613, 2000.

9. Kidney BA, Ellis JA, Haines DM, Jackson ML: Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *Am J Vet Res* 61: 1037-1041, 2000.
10. Gabor LJ, Jackson ML, Trask B, et al: Feline leukaemia virus status of australian cats with lymphosarcoma. *Aust Vet J* 79: 476-481, 2001.
11. Wang J, Kyaw-Tanner M, Lee C, Robinson WF: Characterisation of lymphosarcomas in australian cats using polymerase chain reaction and immunohistochemical examination. *Aust Vet J* 79: 41-46, 2001.
12. Hartmann K, Werner RM, Egberink H, Jarrett O: Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of FIV and FeLV infections. *Vet Rec* 149: 317-320, 2001.
13. Bachmann MH, Sodora DL, Matthiason-Dubard M, et al.: Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequences clades. *J Virol* 71:4241-4253, 1997.
14. Pistello M, Cammarota G, Nicoletti E, et al: Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. *J Gen Virol* 78:2247-2257, 1997.
15. Jacobson RH: How well do serodiagnostic tests predict the infection or disease status of cats? *J Am Vet Med Assoc* 199: 1343-1347, 1991.
16. Peri EV, Ponti W, Dall'Ara P, et al: Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern Italy. *Vet Immunol Immunopathol* 40: 285-297, 1993.
17. Faravelli G, Maffioletti M, Avezza F: Infezione da virus dell'immunodeficienza felina. Aspetti clinici ed epidemiologici. *Summa* 19: 19-23, 1994.
18. Pennisi MG, Bo S: Indagine epidemiologica nazionale FeLV/FIV. *Veterinaria* 8: 37-44, 1994.
19. Pennisi MG: Le infezioni da retrovirus del gatto. *Obbiettivi e Documenti Veterinari* 9: 5-16, 1997.
20. Sellon RK: Feline immunodeficiency virus infection. In: Green C.E., Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, WB Saunders Co, 2nd edition, 1998.
21. Ostanello F, Dallona B, Di Francesco A: Indagine caso-controllo sulla diffusione dell'infezione da FIV nella provincia di Venezia. *Veterinaria* 3: 73-77, 2001.
22. Hosie MJ, Jarrett O: Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. *AIDS* 4: 215-220, 1990.
23. Barr MC, Pough MB, Jacobson RH, Scott FW: Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 199: 1377-1381, 1991.
24. Egberink HF, Lutz H, Horzinek MC: Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J Am Vet Med Assoc* 199: 1339-1342, 1991.
25. Reid RW, Barr MC, Scott FW: Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. *Cornell Vet* 82: 359-369, 1992.
26. Jarrett O, Pacitti AM, Hosie MJ, Reid G: Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 199: 1362-64, 1991.
27. Lombardi S, Poli A, Massi C: Detection of feline immunodeficiency virus p24 antigen and p24-specific antibodies by monoclonal antibody-based assay. *J Virol Methods* 46: 287-301, 1994.

LIBRETTI DI VACCINAZIONE DEL CANE E DEL GATTO

I libretti di **vaccinazione del cane e del gatto**, realizzati dalla SCIVAC, secondo le indicazioni della FSA e della FECAVA, sono nuovamente disponibili. Nella loro versione originale, senza inserzioni pubblicitarie, i libretti possono essere richiesti alla tipografia **Press Point srl**, al puro costo di stampa e con contributo di spese di spedizione.



500 COPIE = Euro 87,80

Richiedere a:



Via Cagnola 35

20081 Abbiategrasso

Tel. 02/9462323 - 02/94965467

Fax 02/94969304

Email: fulvio@presspoint2000.it