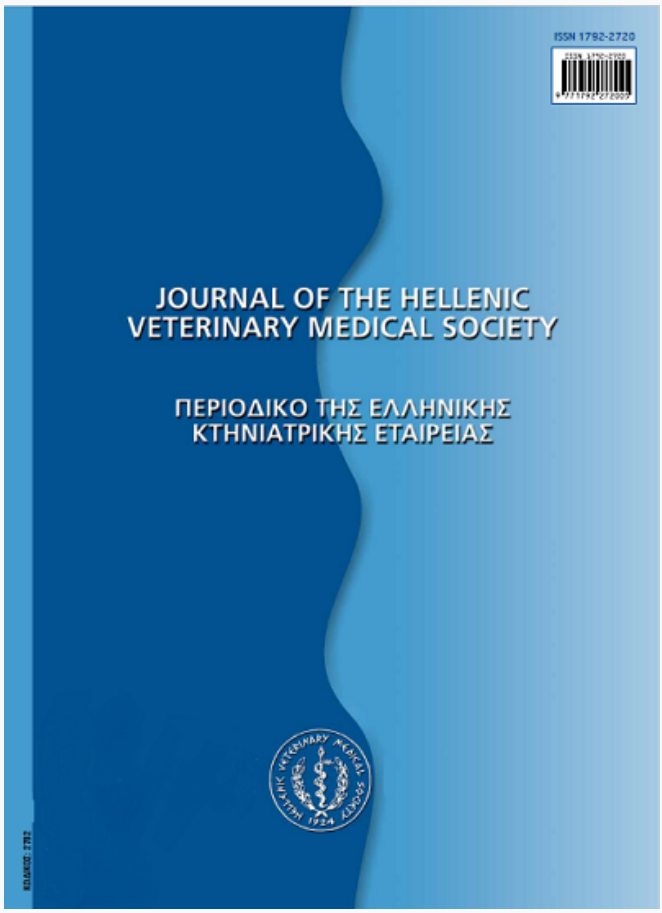
ePublishing

EKT ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 59, No 4 (2008)



Phylogenetic analysis of vaccinal and wild type European strains of Feline Calicivirus

R. RAUE, T. KANELLOS, M. KOLIGAS (M. ΚΟΛΥΓΑΣ), E. XYLOURI (E. ΞΥΛΟΥΡΗ)

doi: 10.12681/jhvms.14967

To cite this article:

RAUE, R., KANELLOS, T., KOLIGAS (M. ΚΟΛΥΓΑΣ) M., & XYLOURI (E. ΞΥΛΟΥΡΗ) E. (2017). Phylogenetic analysis of vaccinal and wild type European strains of Feline Calicivirus. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *59*(4), 332–340. https://doi.org/10.12681/jhvms.14967

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 27/01/2026 03:56:15

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2008, 59(4): 332-340
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2008, 59(4): 332-340

Original article
Ερευνητική εργασί

Phylogenetic analysis of vaccinal and wild type European strains of Feline Calicivirus

Raue R.[1] DVM, PhD, **Kanellos T.**[1] DVM, MSc., PhD, MRVCS,
Koligas M.[1] Technology in Animals Science, **Xylouri E.**[2] DVM, MSc., PhD

[1] *Pfizer Animal Health, Biologicals Development, United Kingdom*
[2] *Dep. Anatomy & Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science and Aquaculture, Agricultural University of Athens*

Φυλογενετική ανάλυση των εμβολιακών και των «άγριων» Ευρωπαϊκών στελεχών του καλυκοϊού της γάτας

Raue R.[1] DVM, PhD, **Kanellos T.**[1] DVM, MSc., PhD, MRVCS,
Μ. Κολυγάς[1] Technology in Animals Science,, **Ε. Ξυλούρη**[2] DVM, MSc., PhD, Αναπλ. Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

[1] *Pfizer Animal Health, Biologicals Development, United Kingdom*
[2] *Εργ. Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

ABSTRACT. Feline Calicivirus (FCV) infection is considered one of the most common upper respiratory tract infections in cats. In spite of widespread vaccination, FCV-related diseases still occur in the field and in some cases novel and more virulent FCV strains have been identified causing severe systemic diseases and death in cats. Besides persistently infected cats and the high resistance of FCV in the environment, genetic and antigenic variability of FCV is an important feature contributing to the widespread prevalence of these viruses. As in most of RNA viruses, mutations frequently occur during FCV replication, which may result in genetic changes that could allow escape from host immune responses. Therefore, this study was designed to get an insight into the diversity of recently isolated European FCV strains. In total, 83 FCV isolates were randomly selected from diagnostic samples from Austria, Germany, United Kingdom and Italy, from 2000 to 2005. The isolates were propagated in CRFK cells and tested for the presence of feline herpesvirus (FHV) by PCR. Forty-nine (49) out of the 83 tested FCV isolates were viable and free of FHV DNA. The hypervariable region of the FCV capsid gene was amplified by RT-PCR, sequenced and plotted in a phylogenetic tree together with published sequences. Based on the sequenced region showing ≥20% diversity on the nucleotide level, 21 (5 Austrian, 7 German, 6 British and 3 Italian isolates) different FCV strains were identified. As all Italian strains came from South Italy, it's not surprising that these strains were much closer related than the FCV strains from the other countries. Although most of the South Italian strains clustered together in the phylogenetic tree, a clustering of the FCV strains, based on the country they came from, was not observed. These results indicate that the evolution of the FCV strains is totally random and not influenced by regional differences.

Keywords: Feline Calicivirus, genetic diversity, phylogenetic analysis, wild, vaccinal viral strains

Correspondence: Kanellos T.
Pfizer Animal Health (IPC-057), Global Alliances, Ramsgate Road, Sandwich, CT13 9NJ, U.K.
Fax: +44 (0) 1304 656691, e-mail: Theo.Kanellos@pfizer.com

Αλληλογραφία: Kanellos T.
Pfizer Animal Health (IPC-057), Global Alliances, Ramsgate Road, Sandwich, CT13 9NJ, U.K.
Fax: +44 (0) 1304 656691, e-mail: Theo.Kanellos@pfizer.com

Submission date: 21.04.2008
Approval date: 12.12.2008

Ημερομηνία υποβολής: 21.04.2008
Ημερομηνία εγκρίσεως: 12.12.2008

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η λοίμωξη από τον καλυκοϊό της γάτας (Feline Calici Virus, FCV) θεωρείται ως μία από τις πιο συχνές λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού στις γάτες, παρά την ευρείας κλίμακας εφαρμογή εμβολιασμών. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν πταρμό, οφθαλμική και ρινική καταρροή, δύσπνοια, βήχα, στοματικές εξελκώσεις και προσωρινή χωλότητα. Τα πλήρως αναρρώσαντα ζώα μπορούν να ζουν ως ασυμπτωματικοί φορείς της νόσου για πολλά χρόνια. Εκτός από την "επίμονη" μόλυνση και την υψηλή ανθεκτικότητα του ιού στο περιβάλλον, ο καλυκοϊός εμφανίζει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα, γεγονός που αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του. Στον καλυκοϊό της γάτας, όπως και στους περισσότερους RNA ιούς, οι μεταλλάξεις είναι συχνές κατά την αντιτυπία τους, που ως επακόλουθο μπορεί να έχουν την αντιγονική ανεπάρκεια των εμβολίων. Ο εμβολιασμός είναι ο μοναδικός τρόπος ελέγχου της νόσου και ταυτόχρονα ο πιο αμφισβητούμενος για το κατά πόσο τα εμπορικά διαθέσιμα εμβολιακά σκευάσματα είναι αποτελεσματικά έναντι των στελεχών των καλυκοϊών που κυκλοφορούν στους πληθυσμούς των ζώων. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να συμβάλει στην εμβάθυνση της γνώσης στην ποικιλομορφία των ευρωπαϊκών στελεχών καλυκοϊού γάτας, που απομονώθηκαν σχετικά πρόσφατα. Συνολικά 83 απομονωθέντα στελέχη του καλυκοϊού επιλέχθηκαν τυχαία από διαγνωστικά δείγματα προερχόμενα από την Αυστρία, τη Γερμανία, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ιταλία κατά τη χρονική περίοδο 2000 – 2005. Τα στελέχη του ιού που απομονώθηκαν πολλαπλασιάστηκαν σε κύτταρα Crandall-Rees Feline Kidney (CRFK) και εξετάστηκαν για παρουσία ερπητοϊού γάτας (Feline herpesvirus, FHV) με PCR. Από τα 83 αρχικά δείγματα μόνο από τα 49 (ήταν απαλλαγμένα από ερπητοϊό) απομονώθηκαν αμιγή στελέχη καλυκοϊού. Το τμήμα του γονιδίου του καψιδίου του καλυκοϊού με μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα επεκτάθηκε με RT – PCR, αναλύθηκε η γονιδιακή αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του και απεικονίστηκε σε φυλογενετικό δέντρο μαζί με τις δημοσιευμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Με βάση το αναλυμένο τμήμα αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, που δείχνει ≥ 20% ποικιλομορφία σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, ταυτοποιήθηκαν 21 (7 απομονωθέντα στελέχη από τη Γερμανία, 6 από το Η. Βασίλειο, 5 από την Αυστρία και 3 από την Ιταλία) διαφορετικά στελέχη καλυκοϊού. Όλα τα Ιταλικά στελέχη προέρχονταν από τη Νότιο Ιταλία, επομένως ήταν πιο "συγγενή" μεταξύ τους σχετικά με εκείνα των άλλων κρατών. Αν και τα περισσότερα από τα στελέχη της Νοτίου Ιταλίας ομαδοποιήθηκαν στο φυλογενετικό δέντρο, δεν παρατηρήθηκε ομαδοποίηση τους με βάση την περιοχή από την οποία προήλθαν. Τα παρατιθέμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η γενετική εξέλιξη των στελεχών του καλυκοϊού της γάτας είναι απολύτως τυχαία και δεν επηρεάζεται από τη γεωγραφική περιοχή.

Λέξεις ευρετηρίασης: Καλυκοϊός γάτας, γενετική ποικιλομορφία, φυλογενετική ανάλυση, άγρια, εμβολιακά στελέχη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καλυκοϊοί (*Calici-virus*) είναι μικροί, χωρίς περίβλημα ιοί, μονής έλικας RNA, θετικής πολικότητας (Thiel and Köning, 1999). Το μέγεθος του βιρίου είναι διαμέτρου 27-40 nm και εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία. Η οικογένεια Caliciviridae διαιρείται σε τέσσερα γένη, τα εξής: *Norovirus, Sapovirus, Lagovirus* και *Visivirus*. Ο καλυκοϊός της γάτας ανήκει στο τελευταίο γένος, στο *Visivirus*.

Ο καλυκοϊός της γάτας (Feline Calici Virus, FCV) είναι υψηλής μεταδοτικότητας παθογόνο αίτιο, που προκαλεί συνήθως ήπιο, αυτο-περιοριζόμενο, οξύ νόσημα, που εντοπίζεται στη στοματική κοιλότητα, στην ανώτερη αναπνευστική οδό και εκδηλώνεται με στοματικές εξελκώσεις. Μερικές φορές σε μικρής ηλικίας γάτες προκαλεί ακόμη και θάνατο. Η μόλυνση με τον FCV προκαλείται δια της οφθαλμο- στοματο- ρινικής οδού.

Η είσοδος του ιού στα κύτταρα του οργανισμού γίνεται μέσω ενδοκυττάρωσης και ο ιός εντοπίζεται στα ενδοσώματα (Stuart and Brown, 2007). Ο ιός συνδέεται με τους υποδοχείς δια του μορίου α (JAM-A) (Makino et al. 2006) και του α-2,6 σιαλικού οξέος, όπως έχει αποδειχθεί από έρευνες (Stuart and Brown, 2007).

Ο FCV μπορεί να προκαλέσει "επίμονη" μόλυνση σε γάτες. Ζώα, φορείς του ιού, εκκρίνουν από λίγο έως πολύ συνεχώς τον ιό και σε μερικές περιπτώσεις ισόβια. Μια συνεχώς αυξανόμενη απειλή είναι η εμφάνιση νέων ιϊκών στελεχών υψηλής λοιμογόνου δύναμης, που προκαλούν πυρετό με αιμορραγική διάθεση και υψηλή θνησιμότητα. Η παθολογική αυτή κατάσταση χαρακτηρίζεται ως FCV - συνδεδεμένη λοιμώδης συστηματική νόσος (associated virulent systemic disease, associated VSD) (Pedersen et al. 2000). Η εν λόγω κλινική εικόνα αποδόθηκε σε μετάλλαξη του ιού σε πιθανόν στέλεχος που παρουσιάζει φαινότυπο υψηλής παθογόνου δράσης. Αλλά, μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί η διαφοροποίηση των στελεχών μεταξύ FCV και FCV - associated VSD (Pedersen et al. 2000).

Οι καλυκοϊοί της γάτας έχουν παγκόσμια εξάπλωση και ιδιαίτερα σε πληθυσμούς με αδέσποτες γάτες (Radford et al. 2007). Στελέχη του ιού προσβάλλουν, εκτός από τα αιλουροειδή, γένη της οικογένειας Mustelidae και ένα μεγάλο αριθμό θαλάσσιων θη-

λαστικών (Akers et al. 1974, Barlough, et al. 1986), κυρίως θαλάσσιων λεόντων, προκαλώντας ανάλογη παθολογία και κλινική εικόνα (Smith and Boyt, 1990). Από την πρώτη ανακάλυψη του ιού, πριν από 73 χρόνια (Clarke and Lambden, 1997), μέχρι σήμερα, ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για τους μηχανισμούς και την οικολογία του, ενώ νέα στελέχη του ιού αναδύονται και νέοι οργανισμοί προστίθενται στην ομάδα των ξενιστών του (Williams et al. 1994).

Υπάρχουν μεγάλες αντιγονικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των FCV στελεχών. Οι μολυσμένες γάτες με τα νεο-εξελιγμένα "άγρια" στελέχη, όπως τα στελέχη FCV - associated VSD, πιθανόν να μην προστατεύονται επαρκώς από τα κυκλοφορούντα διαθέσιμα εμβόλια.

Μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης, βασισμένες κυρίως στο γονίδιο της καψιδικής πρωτεΐνης του ιού από "άγρια" στελέχη, έχουν γίνει σε κάποιες χώρες, όπως στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία (Radford et al. 2007). Παρόλα αυτά απουσιάζουν λεπτομερείς πληροφορίες για την κατάσταση σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Μελέτες από το Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία έδειξαν ότι οι καλυκοϊοί της γάτας σχηματίζουν μια φυλογενετική ομάδα εμφανίζοντας γενετικές αποστάσεις ανάμεσα στα απομονωθέντα στελέχη του ιού από 1,9 έως 18,6%. Βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων, δεν παρατηρήθηκε χρονική ή γεωγραφική επίδραση στη γενετική συγγένεια ανάμεσα στους καλυκοϊούς της γάτας (Glenn et al. 1999). Δοκιμές οροεξουδετέρωσης με αντιορούς γάτας επιβεβαίωσαν τη γενετική ποικιλομορφία των απομονωθέντων στελεχών FCV (Lauritzen et al. 1997).

Σε απομονωθέντα "άγρια" και σε εμβολιακά στελέχη του καλυκοϊού παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις, σε ποσοστό από 0 έως 38% στο γονίδιο της καψιδικής πρωτεΐνης, γεγονός που αποδεικνύει την πιθανή έλλειψη αποτελεσματικότητας των εμβολιακών στελεχών να παρέχουν προστασία έναντι των FCV "άγριων" στελεχών. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι αδρανοποιημένοι ιοί μερικών εμβολιακών στελεχών μπορεί να υπεισέρχονται στην εκδήλωση νόσου (Radford et al. 2007). Τα τελευταία χρόνια είναι διάχυτη η αμφισβήτηση ότι τα διαθέσιμα εμβολιακά στελέχη μπορεί να μην είναι πλέον αντιγονικά δραστικά έναντι των καλυκοϊών, εξαιτίας του υψηλού βαθμού μετάλλαξης του ιού.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο καθορισμός του ποσοστού διαφοροποίησης και παραλλακτικότητας των FCV ιών, που είχαν απομονωθεί σε τέσσερις Ευρωπαϊκές χώρες κατά την πενταετία 2000-2005.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλογή και χαρακτηρισμός των διαφόρων στελεχών των προς μελέτη ιών

Η συλλογή των διαφόρων στελεχών των καλυκοϊών έγινε με τη συνεργασία τεσσάρων πανεπιστημιακών κτηνιατρικών κλινικών από την Αυστρία (Vienna), τη Γερμανία (Liepzig), το Ηνωμένο Βασίλειο (Bristol) και την Ιταλία (Bari). Συγκεντρώθηκαν συνολικά 83 στελέχη ιών από ισάριθμες γάτες, οι οποίες δεν παρουσίαζαν πάντα κλινικά συμπτώματα. Η κατανομή των δειγμάτων ανά χώρα ήταν: 25 από την Αυστρία (2002-2005), 20 από τη Γερμανία (2004), 20 από το Ηνωμένο Βασίλειο (2005) και 18 από την Ιταλία (2000).

Για την απλοποίηση του χειρισμού των δειγμάτων δόθηκε σε κάθε δείγμα ατομικός κωδικός αναγνώρισης, που αποτελείτο από τρία σκέλη: από ένα λατινικό γράμμα ανάλογα με τη χώρα προέλευσης [πχ. Αυστρία (A), Γερμανία (G), Ηνωμένο Βασίλειο (UK) και Ιταλία (I), αντίστοιχα], από έναν εσωτερικό αριθμό ή συνδυασμό λατινικών γραμμάτων και αριθμών μαζί και από ένα τρίτο σκέλος, που αντιστοιχούσε στο έτος απομόνωσης του ιϊκού στελέχους. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κωδικοί των 83 δειγμάτων. Όσοι κωδικοί είναι χρώματος γκρίζου, αποκλείστηκαν από τη μελέτη για τους λόγους που αναφέρονται παρακάτω.

Κριτήρια καταλληλότητας των δειγμάτων

Τα διάφορα στελέχη των καλυκοϊών που απομονώθηκαν έπρεπε να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια καταλληλότητας:

- να προέρχονται από Ευρωπαϊκή χώρα και να έχουν απομονωθεί εντός μίας πενταετίας, ήτοι κατά το χρονικό διάστημα από 2000- 2005.
- να είναι ζωντανά και ικανά να καλλιεργηθούν στην ευαίσθητη για τον ιό συνεχή κυτταρική σειρά Crandall-Rees Feline Kidney (CRFK).
- να μην προέρχονται από μικτή μόλυνση με άλλους ιούς και ειδικότερα με τον ερπητοϊό της γάτας (Feline herpesvirus, FHV).
- να αντιδρούν θετικά σε τουλάχιστον ένα από τα τέσσερα συνολικά πρωτόκολλα RT-PCR ανίχνευσης καλυκοϊών γάτας και

Πίνακας 1. Τα ιϊκά στελέχη κατανεμημένα ανά χώρα και κωδικό.
Table 1. Isolates of FCV strains according to the country of origin and code number

ΧΩΡΑ COUNTRY A. A/No	ΑΥΣΤΡΙΑ AUSTRIA	ΓΕΡΜΑΝΙΑ GERMANY	ΗΝ. ΒΑΣΙΛΕΙΟ UN. KINGDOM	ΙΤΑΛΙΑ ITALY
1	A-5497-02	G-KS8-04	UK-01-05	I-01-02
2	A-4729-03	G-KS40-04	UK-02-05	I-02-02
3	A-4484-03	G-KS94-04	UK-03-05	I-03-02
4	A-5273-03	G-KS105-04	UK-04-05	I-04-02
5	A-5550-03	G-KS109-04	UK-05-05	I-05-02
6	A-2055-04	G-L21-04	UK-06-05	I-06-02
7	A-2093-04	G-L27-04	UK-07-05	I-07-02
8	A-2421-04	G-L31-04	UK-08-05	I-08-02
9	A-2474-04	G-L38-04	UK-09-05	I-09-02
10	A-2425-04	G-L46-04	UK-10-05	I-10-02
11	A-2473-04	G-L52-04	UK-11-05	I-11-02
12	A-2429-04	G-L63-04	UK-12-05	I-12-02
13	A-2472-04	G-L88-04	UK-13-05	I-13-02
14	A-2456-04	G-L90-04	UK-14-05	I-14-02
15	A-2507-04	G-L112-04	UK-15-05	I-15-02
16	A-2529-04	G-L203-04	UK-16-05	I-16-02
17	A-3401-04	G-L278-04	UK-17-05	I-17-02
18	A-3539-04	G-L279-04	UK-18-05	I-18-02
19	A-3647-04	G-L280-04	UK-19-05	-
20	A-3703-04	G-L281-04	UK-20-05	
21	A-2011-05	-	-	
22	A-2102-05	-	-	-
23	A-2323-05	-	-	-
24	A-2424-05	-	-	-
25	A-2918-05	-	-	-

• σε κάθε ιϊκό στέλεχος, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της περιοχής-στόχου που μελετάται θα έπρεπε να έχει ποσοστό διαφοροποίησης πάνω από 20% ή διαφορετική χώρα προέλευσης. Ποσοστό διαφοροποίησης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του FCV κατά 20% μπορεί να προκαλέσει μεταβολή της παθογόνου δράσης του ιού, αναφέρουν ερευνητές (προσωπική επικοινωνία A. Radford, Πανεπιστήμιο Liverpool, UK).

Απομόνωση - Καλλιέργεια των άγριων στελεχών του ιού

Για την καλλιέργεια των διαφόρων στελεχών του ιού χρησιμοποιήθηκε η ειδική και ευαίσθητη κυτταρική σειρά CRFK με θρεπτικό υλικό DMEM, με προσθήκη 2% ορού εμβρύου μόσχου και αντιβιοτικών. Ακολούθησε επώαση σε κλίβανο στους 37AC για τέσσερις ημέρες. Τα παθογόνα στελέχη καλυκοϊών γάτας αναπτύσσονται ταχέως και προκαλούν κυτταροπαθογόνο δράση εντός το πολύ τεσσάρων 24ώρων, απ' ότι είναι γνωστό στη βιβλιογραφία. Όσοι ιοί δεν προκαλούσαν κυτταροπαθογόνο δράση, αυτόματα εξαιρούνταν από τη μελέτη. Έτσι, οι ιοί που είχαν απομονωθεί στην κυτταρική σειρά CRFK, καλλιεργήθηκαν περαιτέρω και διατηρήθηκαν ως "αποθεματικός ιός" για μελλοντική έρευνα. Συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε η διαδικασία ψύξης - απόψυξης της φιάλης καλλιέργειας, της φυγοκέντρησης του υλικού για πέντε λεπτά στις 10.000 rpm και ποσότητα 3ml του υ-

περκείμενου υλικού (που περιείχε τον ιό) τοποθετήθηκε σε ειδικά φιαλίδια και διατηρήθηκε στους -80˚C, μέχρι τη χρήση του για RT-PCR.

Μελέτη γονιδιώματος του ιού

Στην παρούσα μελέτη καθορίζεται το ποσοστό διαφοροποίησης του γενετικού υλικού των στελεχών FCV σε επίπεδο νουκλεοτιδίων (DNA). Τα ιϊκά στελέχη αρχικά συγκεντρώθηκαν και στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη μέθοδο RT-PCR. Αφού προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία μέρους του γονιδιώματός τους (γονίδιο καψιδικής πρωτεΐνης) και εφόσον τα ιϊκά στελέχη πληρούσαν σαφώς τα προκαθορισμένα κριτήρια καταλληλότητας, επιλέχθηκαν ως τα στελέχη για την περαιτέρω διερεύνηση.

Διαφορική διάγνωση του καλυκοϊού από τον έρπητα ιό της γάτας

Ο Feline Herpesvirus (FHV) της οικογένειας *Herpesviridae* είναι DNA ιός, που προκαλεί στις γάτες παρόμοια συμπτώματα με τον ιό της FCV και επιπλέον αναπτύσσεται στην κυτταρική σειρά CRFK, επιπλέκοντας, εκτός από κλινικά, και εργαστηριακά τη διάγνωση του καλυκοϊού. Για τον παραπάνω λόγο και προκειμένου να εξαλειφθούν τα τυχόν ψευδώς θετικά δείγματα από τη μελέτη, συμπεριλήφθηκαν και αναλύσεις για τον FHV.

Έτσι, έγινε απομόνωση DNA σε όλα τα δείγματα για να αποκλειστούν όσα ήταν FHV θετικά. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό DNeasy Tisssue Kit της Qiagen, όπου σύμφωνα με το πρωτόκολλο απαιτούνται 100μl υλικού από την κυτταροκαλλιέργεια των ιών σε CRFK. Το απομονωμένο DNA του κάθε στελέχους - καλλιέργειας ιού αραιώθηκε σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 100μl, μέσα σε κρυοφιαλίδιο, το οποίο και διατηρήθηκε στους -20˚C.

PCR για την ανίχνευση του ιού έρπητα της γάτας

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε η ποσοτική ενίσχυση αυτού, μέσα από την τεχνική της PCR. Στην περίπτωση του FHV για την PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο (Sykes and Browning, 1997), που περιλαμβάνει: αποδιάταξη του DNA στους 95˚C για 5 min και στη συνέχεια 40 κύκλους στους 95˚C για 30 sec, στους 56˚C για 30 sec και στους 72˚C για 30 sec, καθώς και ένα τελικό στάδιο επέκτασης στους 72˚C για 5 min. Χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής PTC-200 της J-Research και το εμπορικό PCR SuperMix Kit της Invitrogen, με προσθήκη 100pmol από κάθε εκκινητή και 10μl από το απομονωμένο DNA (όγκος PCR αντιδράσεων 100 μl).

Η επιλογή των εκκινητών έγινε με βάση το δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Sykes and Browning 1997), το οποίο προέβλεπε χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων Herp-f (5'GAC GTG GTG AAT TAT CAG C 3') και Herp-r (5'-CAA CTA GAT TTC CAC CAG GA-3'), με μοριακά βάρη 5068.8 και 6070.1, αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα DNA 287 ζευγών βάσεων μεταξύ των θέσεων 510 και 797 του FHV γονιδιώματος.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου έγιναν ορατά κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Όσα δείγματα ήταν θετικά σε FHV, αυτόματα αποκλείστηκαν από τη μελέτη και αυτή συνεχίστηκε μόνο με τα αρνητικά FHV δείγματα.

Απομόνωση ιϊκού RNA και αντίστροφη μεταγραφή PCR (RT–PCR) για την ανίχνευση του FCV

Στα δείγματα, που ήταν αρνητικά σε FHV, έγινε απομόνωση RNA από 100μl υλικού της κυτταροκαλλιέργειας των στελεχών των ιών σε CRFK, με χρήση του εμπορικού RNeasy Mini kit της Qiagen και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το απομονωμένο RNA κάθε ιϊκού στελέχους αραιώθηκε σε 60μl αποστειρωμένου νερού (απαλλαγμένου RNAάσων) μέσα σε κρυοφιαλίδιο και διατηρήθηκε στους -80˚C.

Στη συνέχεια έγινε ποσοτική ενίσχυση των απομονωμένων RNA με τη μέθοδο RT-PCR. Για την ενίσχυση κάθε ιϊκού RNA χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι εκκινητές (N1,N2,C1,C2,Del 221,Del 222) στους παρακάτω τέσσερις συνδυασμούς:

N1-C1

N1-C2

N2-C2

Del 221-Del 222

Κάθε φορά που ένα δείγμα ήταν αρνητικό στην RT-PCR με τη χρήση του πρώτου ζεύγους εκκινητών, επαναλαμβανόταν η RT-PCR με τον επόμενο συνδυασμό εκκινητών και εάν πάλι έδινε αρνητικά αποτελέσματα με τον τρίτο συνδυασμό και ούτω καθ' εξής. Όσα δείγματα δεν έδωσαν θετικό αποτελέσματα σε έναν τουλάχιστον συνδυασμό εκκινητών, αυτόματα εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων του κάθε εκκινητή ξεχωριστά παρατίθεται παρακάτω:

Πίνακας 2. Πίνακας στελεχών που επιλέχθηκαν για τις τελικές αναλύσεις.
Table 2. Strains selected for final study

ΧΩΡΑ COUNTRY A. A	ΑΥΣΤΡΙΑ AUSTRIA	ΓΕΡΜΑΝΙΑ GERMANY	ΗΝ. ΒΑΣΙΛΕΙΟ UN. KINGDOM	ΙΤΑΛΙΑ ITALY
1	A-3539-04	G-L21-04	UK-15-05	I-05-02
2	A-4484-03	G-L88-04	UK-10-05	I-12-02
3	A-3401-04	G-L31-04	UK-05-05	I-17-02
4	A-3647-04	G-L46-04	UK-03-05	-
5	A-2421-04	G-L52-04	UK-02-05	-
6	-	G-L63-04	UK-18-05	-
7	-	G-L203-04	-	-

Πίνακας 3. Πρωτόκολλο RT-PCR για FCV στελέχη
Table 3. RT-PCR protocol for FCV strains

Ζεύγη Εκκινητών Primers	Αποδιάταξη Denaturation 30 Sec/ 94˚C	Υβριδοποίηση Hybridisation	Επέκταση Amplification	Θερμικοί κύκλοι Thermal cycles	Μέγεθος προϊόντος Product size
N1-C1	30 Sec/ 94˚C	30 sec / 55˚	1 min / 72˚C	40	670bp
N1-C2	30 Sec/ 94˚C	30 sec / 55˚C	1 min / 72˚C	40	580bp
N2-C2	30 Sec/ 94˚C	30 sec / 55˚C	1 min / 72˚C	40	478bp
Del221-Del222	30 Sec/ 94˚C	30 sec / 5˚C	1 min / 72˚C	40	475bp

C1: 5'-TTGAGAATTGAACACATC-3'

C2: 5'-TCCTCGCCAATCCCAGTGTA-3'

N1: 5'-TTCGGCCTTTTGTGTTCC-3'

N2: 5'-CATTTCGACTTTAACCAAGA-3'

Del-221: 5'-TGGAGCACACCAAGATTTCGGCC-3'

Del-222: 5'-TGCTCACCAATGCCAGTGTAACC-3'

Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών και τα αντίστοιχα μεγέθη των RT-PCR προϊόντων αναγράφονται στον Πίνακα 3. Τα προϊόντα της RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου έγιναν ορατά κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Για το διαχωρισμό και την τελική εκχύλιση των ειδικών προϊόντων της RT-PCR από το πήκτωμα της αγαρόζης, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό QIAquick Gel extraction kit της Qiagen. Τα τελικά κλάσματα δόθηκαν για ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας στα εργαστήρια Lark Technologies. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με τα λογισμικά προγράμματα EditSeq και MegAliqne του λογισμικού πακέτου Lasergene DNAstar, version 5.01.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι φυλογενετικές αναλύσεις αφορούσαν συνολικά σε 83 δείγματα προερχόμενα από τέσσερις χώρες: την Αυστρία, τη Γερμανία, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ιταλία. Από τα 83 δείγματα που συλλέχθηκαν, μόλις τα 21 (Πίνακας 2) πληρούσαν όλα τα κριτήρια καταλληλότητας, καθώς κάποια από τα ιϊκά στελέχη δεν παρουσίασαν κυτταροπαθογόνο δράση στις κυτταροκαλλιέργειες CRFK, ενώ άλλα ήταν θετικά σε FHV και απορρίφθηκαν. Τέλος, κάποια από τα ιϊκά στελέχη που αναλύθηκε η αλληλουχία τους, δεν έδωσαν ειδική ενίσχυση και εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αλληλουχίας (DNA sequencing) παρουσιάζονται στο φυλογενετικό δέντρο (Διάγραμμα 1). Τα 49 κλάσματα συνεπεξεργάστηκαν με 36 κλάσματα (αλληλουχίες) του καλυκοϊού παλαιότερων καταχωρήσεων της ηλεκτρονι-

κής γενετικής τράπεζας GenBank. Κάθε κλάσμα από τα επιπρόσθετα 36 που βρίσκονται στο Διάγραμμα 1 φέρουν τον κωδικό καταχώρησης της GenBank σε παρένθεση. Με την εισαγωγή των παλαιότερων παραπομπών επιτυγχάνεται καλύτερη παρουσίαση της εξέλιξης και της γενετικής διαφοροποίησης των νέων κλασμάτων, σε σύγκριση με τα παλαιότερα, του ίδιου γονιδίου.

Το φυλογενετικό δέντρο, που προέκυψε από την ανάλυση MEGALIGN με τη μέθοδο clustal W (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), συναρτήσει των τεσσάρων διαγραμμάτων διμερών συσχετισμών, έδειξε ότι τα άγρια στελέχη του καλυκοϊού της γάτας που παρουσίασαν ποσοστό νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης μεγαλύτερο ή ίσο του 20% ήταν συνολικά 21 σε αριθμό, σύμφωνα με τον Πίνακα 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση των απομονώσεων "άγριου" τύπου καλυκοϊών για να διαπιστωθεί εάν η γεωγραφική κατανομή επηρεάζει το φυλογενετικό δέντρο. Έτσι, η ανάλυση των απομονώσεων μιας πενταετίας αποκλείει την επίδραση του χρόνου στην εξέλιξη των στελεχών.

Ξεκινώντας από το φυλογενετικό δέντρο παρατηρούνται κάποια σημαντικά στοιχεία για τα στελέχη του ιού στο σύνολό τους. Σε ότι αφορά τα ιταλικά στελέχη παρατηρείται μειωμένη γενετική παραλλακτικότητα. Έντεκα (11) από τα 14 στελέχη που συγκεντρώθηκαν φαίνονται να εξελίσσονται βραδέως, παρουσιάζοντας μικρές ποσοστιαίες γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη από την Ιταλία (στελέχη I-17-02, I-18-02 και I-06-02) φαίνεται πως παρουσιάζουν γενετική απόκλιση, χωρίς όμως να είναι ιδιαίτερα σημαντική (Holland et al. 1991, Holland, 1993). Αυτό πιθανώς να εξηγείται από το γεγονός ότι οι περισσότερες γάτες που εξετάστηκαν προέρχονταν από περιορισμένο αριθμό ιδιοκτητών.

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται μεταξύ των στελεχών των χωρών της Αυστρίας και του Ηνωμένου Βασιλείου, που σχετίζονται μεταξύ τους εξελικτικά και φαίνεται ότι τα στελέχη από την Αυστρία αποτελούν πρόγονους εκείνων του Ηνωμένου Βασιλείου και το αντίστροφο. Το παράδοξο εδώ είναι, ότι ενώ το Ηνωμένο Βασίλειο απέχει σημαντικά από την Αυστρία, τα στελέχη των δύο χωρών συμπλέκονται επανειλημμένα, σε αντίθεση με εκείνα της Γερμανίας, που παρόλη τη γενετική ανομοιογένειά

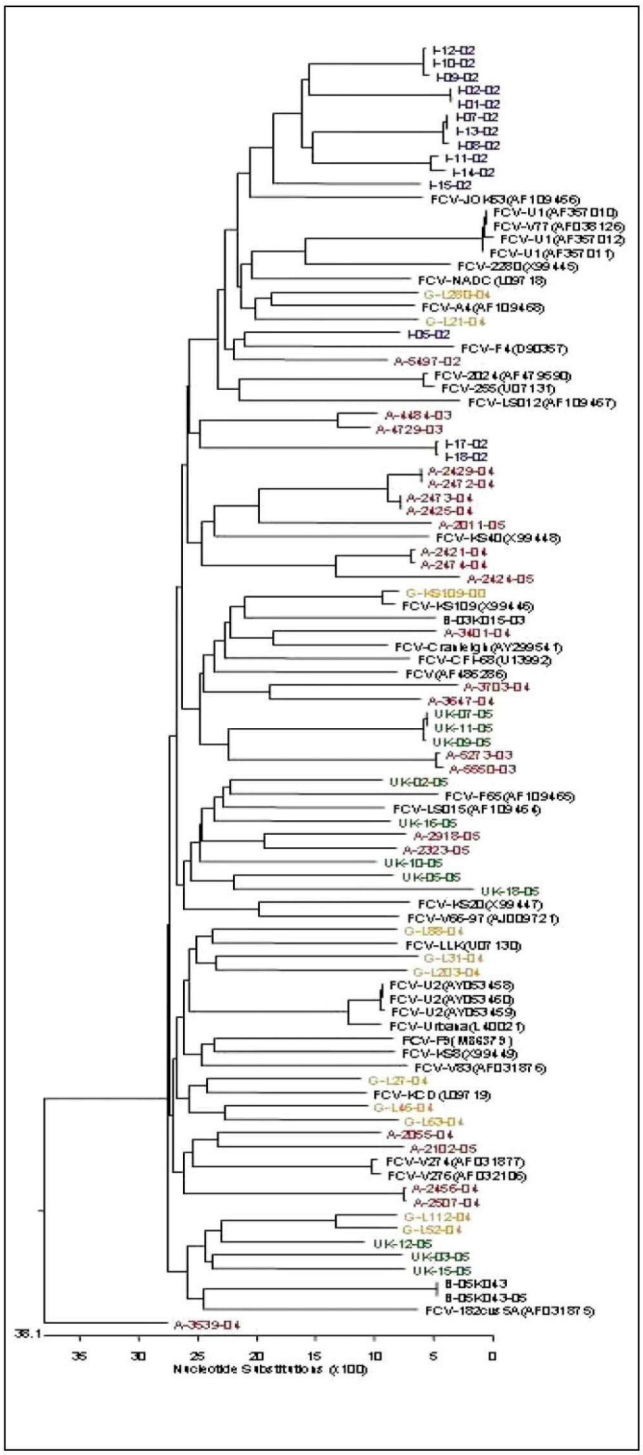


Diagram 1. Phylogenetic tree based on the 400bp segment of the FCV capsid gene of the isolated viral strains. Samples from Austria (A), Germany (G), United Kingdom (UK) and Italy (I) are in red, orange, green and blue colour, respectively.

Διάγραμμα 1. Φυλογενετική ανάλυση. Η φυλογενετική ανάλυση προέκυψε από τμήμα (~400bp) του γονιδίου της καψιδικής πρωτεΐνης διαφόρων στελεχών καλυκοϊών (FCV). Δείγματα από την Αυστρία (A), τη Γερμανία (G), το Ηνωμένο Βασίλειο (UK) και την Ιταλία (I) επισημαίνονται με κόκκινο, πορτοκαλί, πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα.

τους, δεν φαίνεται να έχουν γενετική συγγένεια, όχι τουλάχιστον άμεσα με τα προερχόμενα από την Αυστρία ή του Ηνωμένου Βασιλείου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένα στελέχη παλαιότερων παραπομπών (για πληρέστερη συγκριτική ανάλυση) που είχαν εμβόλιμα επεξεργαστεί και παρουσιάζονται στο φυλογενετικό δέντρο. Μεταξύ άλλων το στέλεχος FCV-F9, που αποτελεί και τη βάση του εμβολίου Fellocell CVR, φαίνεται να απομονώνεται γενετικά, τουλάχιστον για τα στελέχη της Αγγλίας και της Ιταλίας, όπως ακριβώς συμβαίνει και με το στέλεχος FCV-255, που είναι η βάση του εμβολίου Fel-o-Vax.

Όσον αφορά στη δραστικότητα των εμβολίων έναντι των 21 στελεχών του καλυκοϊού που μελετήθηκαν, πιστεύεται ότι αντιγονικά πρέπει να θεωρηθούν συγκρίσιμα βασιζόμενοι σε αποτελέσματα οροεξουδετέρωσης, της οποίας τα αποτελέσματα δεν δημοσιεύονται στην παρούσα εργασία. Αυτό ήταν αναμενόμενο βασιζόμενοι και στα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να μελετηθεί και ενδεχομένως να επιβεβαιωθεί με οροεξουδετέρωση η ικανότητα των εμβολιακών στελεχών να εξουδετερώνουν τα κυκλοφορούντα στελέχη του ιού.

Πρέπει να αναλυθεί το γεγονός ότι τελικά τα κυκλοφορούντα εμβόλια με FCV-F9 φαίνεται να παρέχουν ικανοποιητική προστασία. Απαιτείται δε περαιτέρω συστηματική έρευνα για να 1) επιβεβαιωθούν ή όχι τα ανωτέρω αποτελέσματα και με κλινικές μελέτες και 2) να διερευνηθούν τα "άγρια" στελέχη του FCV στην Ελλάδα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Από τη διενεργηθείσα έρευνα προέκυψαν ότι υπάρχει μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των κυκλοφορούντων "άγριων" στελεχών του καλυκοϊού της γάτας, τα τελευταία χρόνια, σε τέσσερις Ευρωπαϊκές χώρες.
- Οι μεταλλάξεις του ιού είναι γεγονός και είναι ανεξάρτητες από τη γεωγραφική περιοχή. Τα κυκλοφορούντα "άγρια" στελέχη διαφοροποιούνται γενετικά τουλάχιστον 20% από τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Το ποσοστό % διαφοροποίησης είναι πολύ πιθανόν να επηρεάζει τη φυσιολογική συμπεριφορά του στελέχους του ιού. Παρόλο που δεν μελετήσαμε την αντιγονική σημασία αυτών των μεταλλάξεων, θα πρέπει το γεγονός να προκαλέσει την εγρήγορση των κλινικών κτηνιάτρων για τη διερεύνηση των περιπτώσεων νόσου με αιμορραγική διάθεση και υψηλή θνησιμότητα στις γάτες (FCV – FCV associated VSD).
- Επειδή το ποσοστό των μικτών μολύνσεων καλυκοϊού με ερπητοϊό της γάτας ήταν πολύ υψηλό (πρόκληση ανοσοκαταστολής), κάτι που βρέθηκε από την έρευνά μας, θεωρούμε ότι οι μικτές μολύνσεις πρέπει να εκλαμβάνονται ως πολύ σύνηθες γεγονός και να αντιμετωπίζονται με περισσότερη προσοχή.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our thanks to: U. Truyen, Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany, C. Buonavoglia, V. Benetka and K. Möstl, Clinical Virology, Department of Diagnostic Imaging, Infectious Diseases and Clinical Pathology, Bari, Italy, as well as K. Zetner, Clinic of Surgery and Ophthalmology, Department for Small Animals and Horses, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria και C.R. Helps, University of Bristol, School of Clinical Veterinary Science, Division of Veterinary Pathology Infection και Immunity, Bristol, United Kingdom, who provided us the viral strains for the present research.

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akers TG, Smith AW, Latham AB, Watkins HM (1974) Calicivirus antibodies in California gray whales (Eschrichtius robustus) and Steller sea lions (Eumetopias jupatus). Arch Gesamte Virusforsch; 46(1-2):175-7.

Barlough JE, Berry ES, Skilling DE, Smith AW, Fay FH (1986) Antibodies to marine caliciviruses in the pacific walrus (Odobenus Rosmarus divergens Illiger). J Wildl Dis. Apr; 22 (2):165-168.

Clarke IN and Lambden PR (1997) Viral zoonoses and food of animal origin: caliciviruses and human disease. Arch Virol Suppl.; 13:141-52.

Glenn M, Radford AD, Turner PC, Carter M, Lowery D, DeSilver DA, Meanger J, Baulch-Brown C, Bennett M, Gaskell RM (1999) Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCVs. Vet Microbiol.; 67(3):175-93.

Holland JJ, Juan Carlos De La Torre, Clarke DK, Duarte E (1991) Quantitation of Relative Fitness and Great Adaptability of Clonal Populations of RNA Viruses. Journal of Virology, June; 2960-2967.

Holland JJ (1993) Replication error, quasispacies populations and extreme evolution rates of RNA viruses. J Vet Med Sci. 203-217. In: Emerging Viruses. Morse SS, Editor. Oxford: Oxford University Press; 1999; 61(3):299-301.

Lauritzen A, Jarrett O, Sabara M (1997) Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom. Vet Microbiol.; 56(1-2):55-63.

Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H (2006) Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. J Virol.; 80(9): 4482-90.

Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, Keel K (2000) An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. Vet Microbiol.; 73(4):281-300.

Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM (2007) Feline calicivirus. Vet Res. Mar - Apr; 38 (2):319-35.

Smith AW and Boyt PM (1990) Caliciviruses of ocean origin: a review. The journal of zoo Wildlife Medicine; 21:3-23.

Stuart AD and Brown TD (2007) Alpha2, 6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. J Gen Virol.; 88(Pt 1):177-86.

Sykes JE and Browning GF (1997) Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. Arch Virol; 142:65-78.

Thiel HJ and König M (1999) Caliciviruses: an overview. Vet Microbiol.; 69 (1-2): 55-6

Williams ES, Mills K, Kwiatkowski DR, Thorne ET (1994) Plague in a black-footed ferret (Mustela nigripes). J Wildl Dis 30:581-585