



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

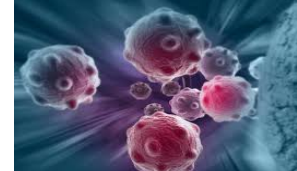
Sviluppo e applicazioni di protocolli molecolari per la diagnosi di *Papillomavirus* spp.

Evento formativo: Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi:
nuovi approcci diagnostici.

Roma, 29 novembre 2019

Antonella Cersini
UOC Virologia





-La famiglia *Papillomaviridae* comprende gli agenti dei Papillomi dell'uomo e degli animali.

-Sono virus caratterizzati da un tropismo cellulare molto ristretto: infettano solo le cellule epiteliali in differenziamento della cute e delle mucose e riescono a completare il ciclo replicativo esclusivamente nelle cellule cheratinizzate

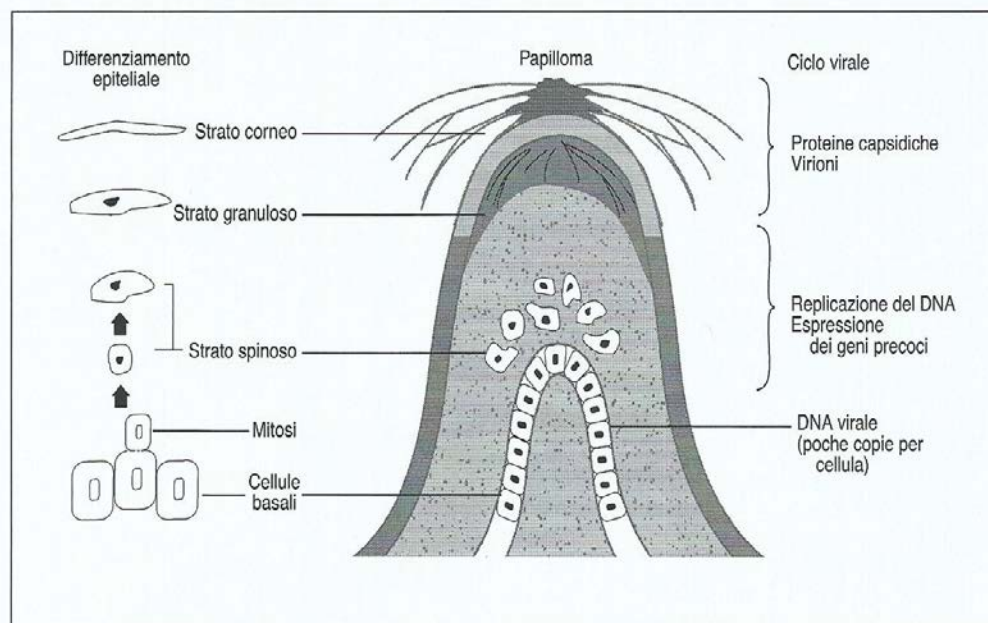


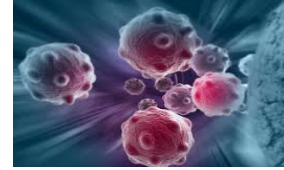
Figura 22.3 Rappresentazione schematica di una verruca cutanea (papilloma). Il ciclo virale è legato al differenziamento epiteliale. A **sinistra** sono riportate le fasi terminali del differenziamento epiteliale delle cellule epidermiche, a **destra** le fasi del ciclo virale. Le fasi virali tardive (sintesi delle proteine del capside e morfogenesi del virione) si possono verificare solo nelle cellule nelle fasi terminali del differenziamento. (Da Baron S. [ed.], *Medical microbiology*, 4^a ed., UTMB, Galveston, 1996.)

(Immagine tratta dal Manuale di Virologia Medica; Cap. 22)



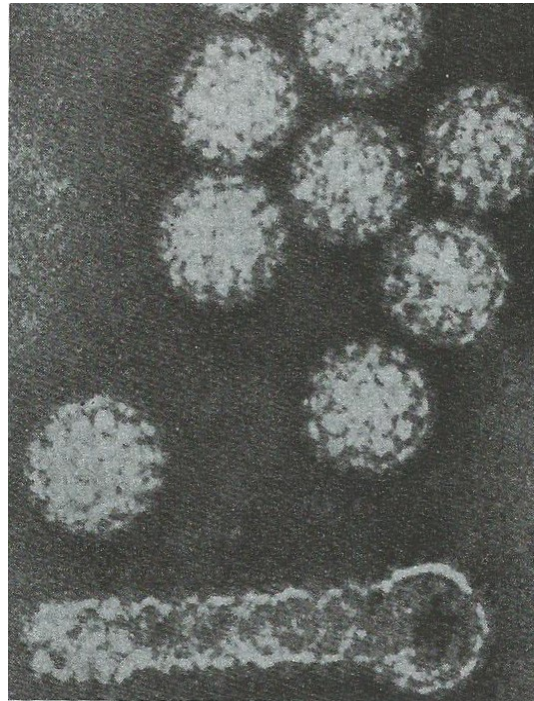
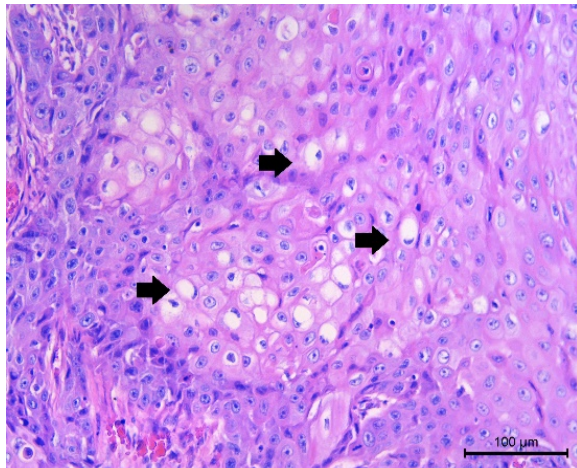


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

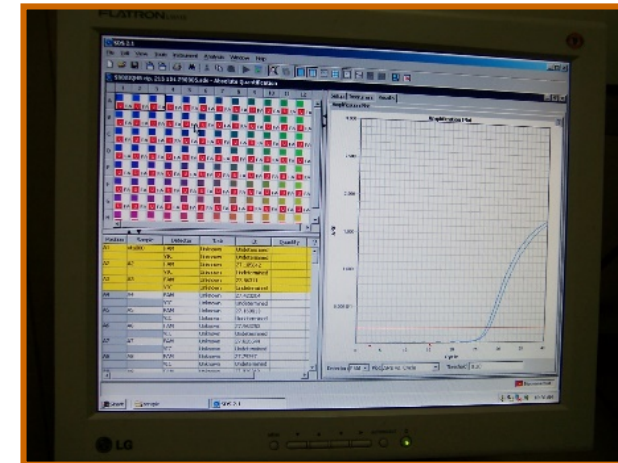


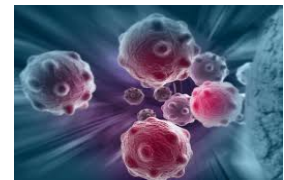
Tecniche diagnostiche per i Papillomavirus

- Per questo motivo, la diagnosi dei Papillomavirus può essere effettuata mediante:
 - a) esame istologico;
 - b) microscopia elettronica;
 - c) metodiche molecolari



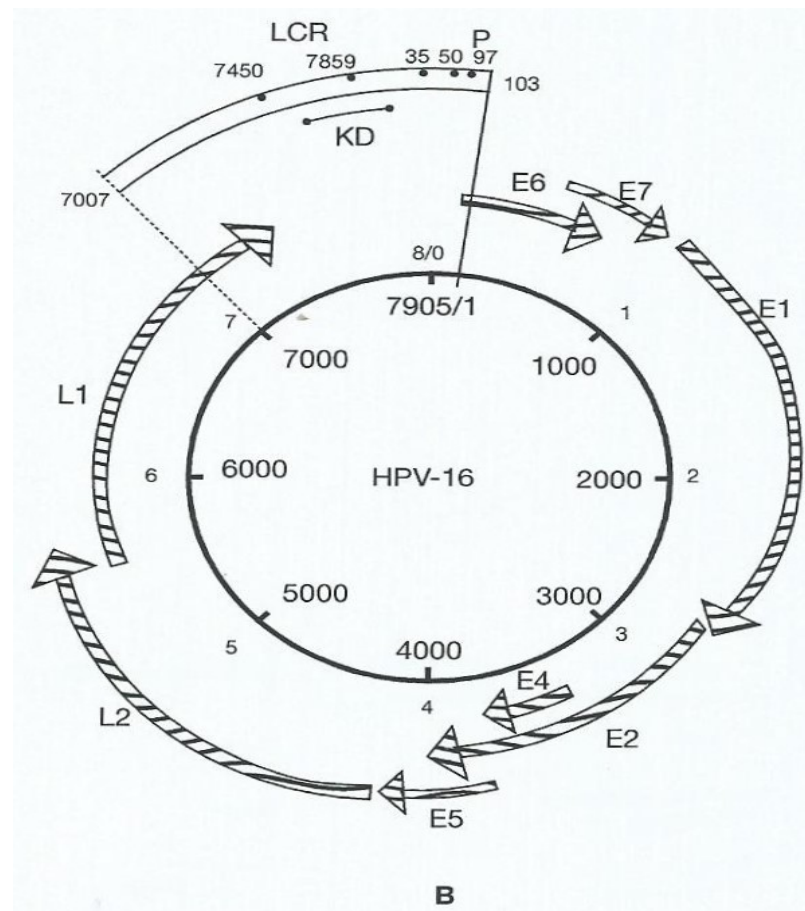
Immagini tratte da: Microbiologia e immunologia veterinaria; Cap. 21. G. Poli et al.





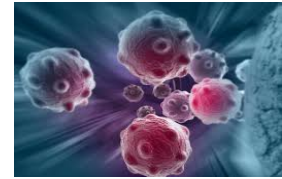
Metodiche molecolari (1) - Organizzazione genomica dei Papillomavirus

- Genoma circolare, costituito da dsDNA di cui una sola elica è codificante e viene trascritta in mRNA
- Dimensioni di circa 8.400 Kbp (compresi i Papillomavirus felini)
- *Long Control Region* (LCR) contiene il promotore, diversi siti di legame per la proteina E2 e diversi siti di regolazione della trascrizione con specificità di tessuto e di tipo cellulare
- *Regioni Precoci* (E) che vengono, generalmente, espresse prima della replicazione del DNA
- *Regioni tardive* (L) che vengono espresse dopo la replicazione del DNA





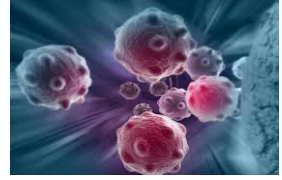
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Metodiche molecolari (2) – La replicazione dei Papillomavirus

- La replicazione del dsDNA virale comprende due fasi: a) **la replicazione plasmidica** e b) **la replicazione vegetativa**
- **La replicazione plasmidica avviene nelle cellule basali dell'epitelio**; in questa fase vengono attivati i geni precoci E1, E2, E5, E6 ed E7 tutti dotati di funzione regolatoria ed implicati, a seconda degli stimoli cellulari, nella trasformazione neoplastica delle cellule
- **Quando la replicazione plasmidica termina, il dsDNA è amplificato fino a 50-400 copie per genoma diploide**

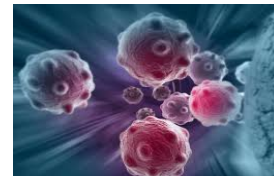




Metodiche molecolari (3) – La replicazione dei Papillomavirus

- La **replicazione vegetativa avviene nelle cellule che hanno raggiunto le fasi terminali del differenziamento epiteliale (strato granuloso e strato corneo)**; in questa fase vengono attivati i geni tardivi L1 ed L2 ed il gene precoce E4
- I geni L1 ed L2 codificano per le proteine strutturali del capside virale
- **Quando la replicazione vegetativa termina, il dsDNA virale è amplificato fino ad avere migliaia di copie per cellula**
- Si ha l'assemblamento delle particelle virali ed il loro rilascio nell'ambiente grazie alla desquamazione degli strati superficiali dell'epitelio

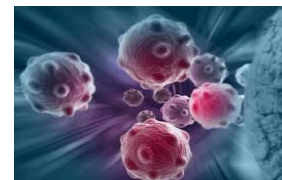




Protocolli di PCR sviluppati

- A. Rolling-Circle-Amplification-PCR (RCA)
- B. 2 Pan-Papillomavirus-Codehop PCR (PAP e FAP)
- C. 2 PCR specifiche per FcaPV-2 (JMP e E2)





Protocollo molecolare (A): Rolling – Circle-Amplification (RCA)

Questo protocollo molecolare, RCA, serve per amplificare i genomi circolari a dsDNA virali sfruttando il principio della amplificazione isoterma operata dalla DNA polimerasi del batteriofago Φ 29

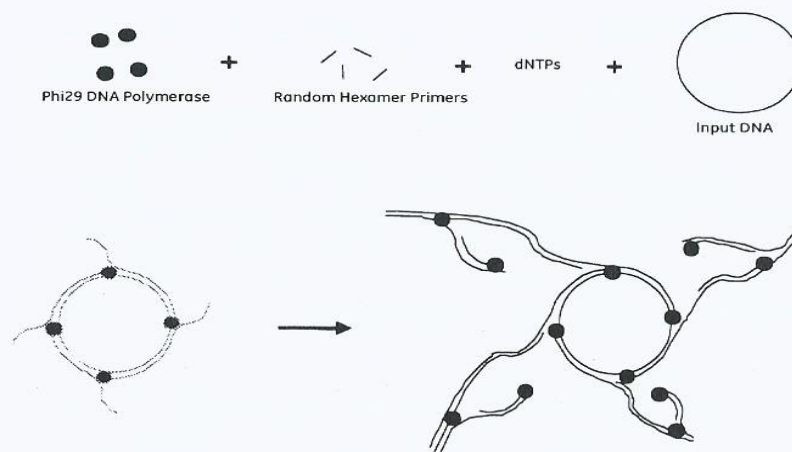
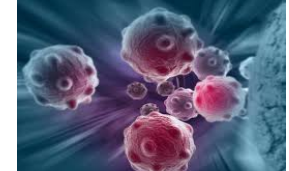


Fig 1. Schematic of the TempliPhi process. Random hexamer primers anneal to the circular template DNA at multiple sites. Φ 29 DNA polymerase extends each of these primers. When the DNA polymerase reaches a downstream extended primer, strand displacement synthesis occurs. The displaced strand is rendered single-stranded and available to be primed by more hexamer primer. The process continues, resulting in exponential, isothermal amplification





Come funziona la RCA-PCR (1)

Amplificazione isotermica operata da illustra™ TempliPhi 100 Amplification kit (GE Health Care)

VOL. 78, 2004

DETECTION OF PAPILLOMAVIRUS BY USING MULTIPLY PRIMED RCA 4995

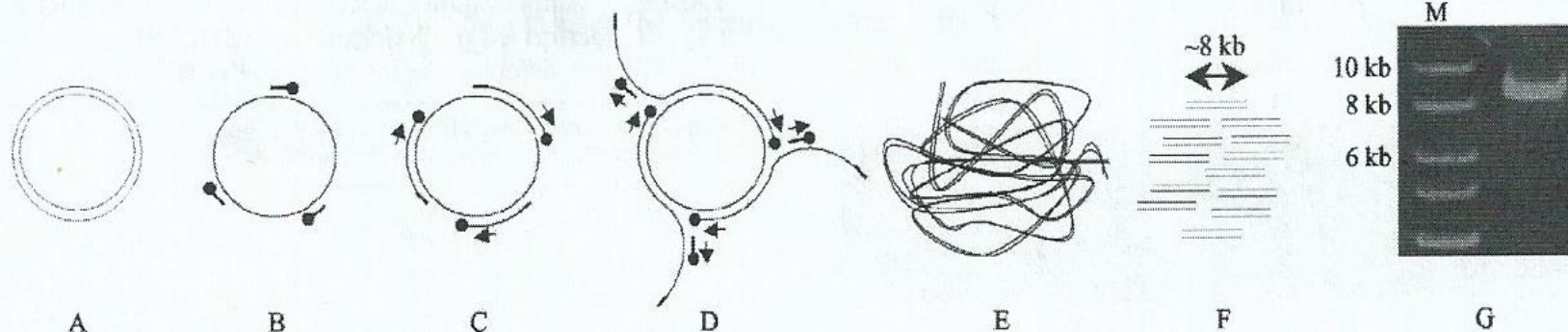
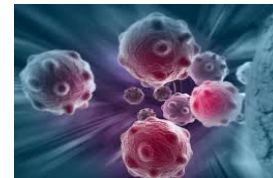


FIG. 1. Schematic representation of the multiply primed RCA method for amplification of the complete circular double-stranded DNA

Rector et al. Journal of Virology (2004); Vol. 78; p. 4993-4998

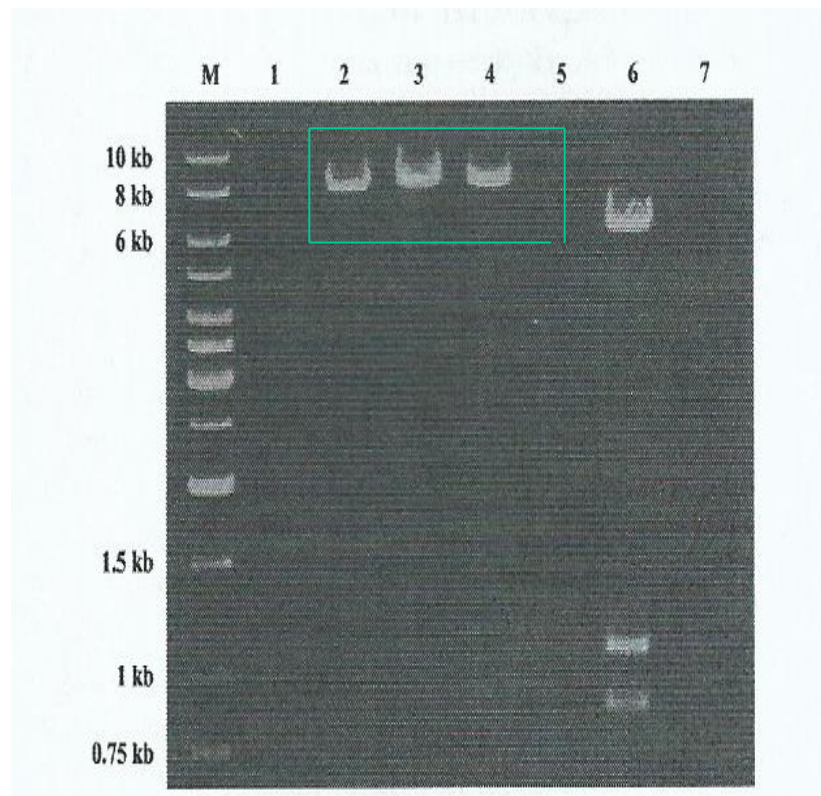


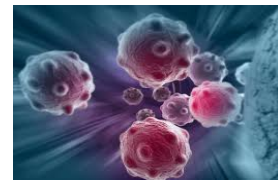


Come funziona la RCA-PCR (2)

- Per individuare la presenza dei Papillomavirus felini (FcaPV), con particolare riferimento al Papillomavirus felino di tipo 1 e di tipo 2 (FcaPV1 e FcaPV2), le copie genomiche di **dsDNA lineari** devono essere sottoposte a tre differenti digestioni enzimatiche utilizzando tre diversi enzimi di restizione: ***EcoRI*, *BamHI*, *HindIII***.

- Per i FcaPV, ciascuna delle tre reazioni di digestione enzimatica deve dare **una sola banda di circa 7,9 Kbp** visualizzata mediante elettroforesi in gel di agarosio

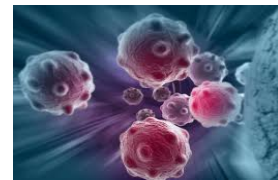




Risultati ottenuti con la RCA-PCR (1)

- Sono stati sottoposti alla RCA ed alle successive digestioni enzimatiche con gli enzimi di restrizione *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, **19 campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina di carcinoma squamoso** rilevato da diversi distretti corporei (cute, lingua, cavità orale, pinna auricolare, narice, linfonodo, mucosa del palato, polmone) in gatti di razza europeo e persiano
- Tutti i 19 campioni hanno mostrato la presenza delle bande di circa 7,9 Kbp, riconducibili al genoma dei PV, confermando la diagnosi di carcinoma squamoso (esame istologico) da FcaPV (esame molecolare)
- **La RCA è risultata una metodica robusta e sensibile** considerando che, per l'estrazione del DNA, occorre eliminare la formalina nei tessuti fissati e questo passaggio provoca la frammentazione del DNA e la formazione di complessi tra acidi nucleici e le proteine cellulari





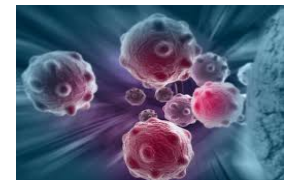
Risultati ottenuti con la RCA-PCR (2)

-Tutti questi campioni sono stati lavorati nell'ambito della RC IZSLT03/15 e, nello specifico, sono:

- a) 6 campioni inviati dal CEROVEC (n.3 cute; n.1 mucosa palato; n.1 tessuti molli parete addominale; n.1 pinna auricolare controlaterale);
- b) 13 campioni pervenuti all'IZSLT (n. 2 padiglioni auricolari; n. 2 mucosa gengivale; n. 1 guancia (mucosa); n.1 seni nasali; n. 1 dito anteriore; n. 2 gengiva mascellare (arcata zigomatica); n. 2 sopraorbitale; n. 1 lingua)

- Da un punto di vista molecolare, i campioni sono stati selezionati in quanto erano **risultati positivi o ad entrambi i protocolli di PCR specifici per il FcaPV-2 (PCR JMP e PCR E2), oppure, ad uno solo dei due protocolli di PCR**



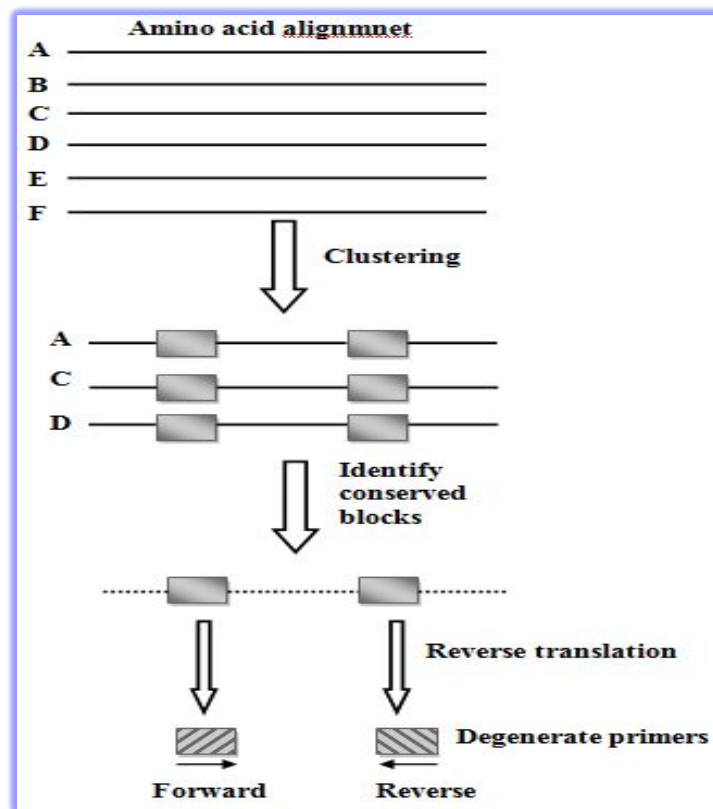


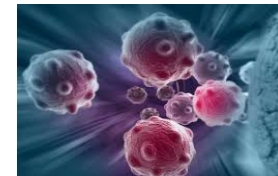
Protocollo molecolare (B) – Pan-papillomavirus CODHEOP PCR

-La pan-papillomavirus CODHEOP PCR utilizza **coppie di consensus primer degenerati** (ossia particolari sequenze nucleotidiche) **che permettono di riconoscere porzioni genomiche ben definite nell'ambito dell'intera famiglia Papillomaviridae**

-Tali porzioni genomiche corrispondono a **brevi sequenze aminoacidiche altamente conservate all'interno della famiglia Papillomaviridae e sono localizzate sulla proteina L1 e sulla proteina E1**

J. P. Stahel et al. Methods (2009); 49 (1); p. 32-41. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODHEOPs) for the detection of novel viruses in non-human primates

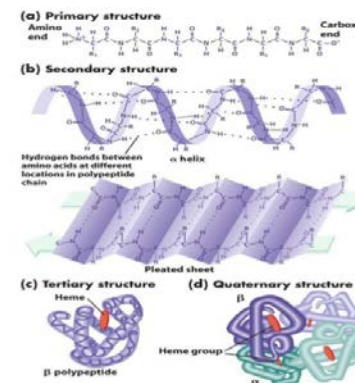




Pan-papillomavirus CODHEOP PCR

2 protocolli differenti

- 1) **pan-papillomavirus CODHEOP PCR FAP**
specifica per una regione altamente conservata di **478 bp** all'interno della proteina **L1** che utilizza la coppia di primers degenerati **FAP59/FAP64** (O. Forslund et al. Journal of General Virology (1999); Vol. 80; p. 2437-2443)
- 2) **pan-papillomavirus CODEHOP PCR PAP**
specifica per una regione altamente conservata di **341bp** all'interno della proteina **E1** che utilizza la coppia di primers degenerati **PapF/PapR** (G. Nespeca et al. A. J. VR (2006); Vol. 67, No 12; p. 2036-2041)

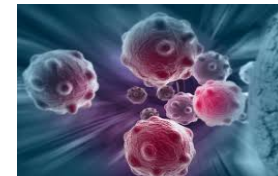


**Livelli di
struttura
delle
proteine**

L1 ed E1

Entrambe le pan-papillomavirus CODHEOP PCR sono state sviluppate per la ricerca dei **Papillomavirus in lesioni cutanee di una vasta gamma di mammiferi e, nel nostro lavoro, sono state testate anche su lesioni cutanee riscontrate nei rettili**





Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e PAP (1)

RISULTATI ottenuti su **tessuti freschi provenienti da diverse specie (mammiferi e rettili)**

Tabella n.1: confronto tra le 2 PCR FAP e PAP e la microscopia elettronica

N° soggetti-specie	PCR FAP e PAP	ME
4 bovini	POS	3 POS/ 1 NEG
3 cani	POS	2 POS/ 1 NEG
1 cavallo	POS	POS
1 rinoceronte	NEG	NEG
2 lucertole ocellate	NEG	DUBBIO
1 camaleonte	NEG	DUBBIO
1 lince	NEG	NEG
4 macachi	NEG	NE
1 giraffa	NEG	NE
18 camp/18 sogg	8 POS/10 NEG	6 POS/3 DUBBI/4 NEG
% Positivi	44,44% POS	33,3 % POS

- Cani: identità di sequenza del 99% e query-cover del 100% con la sequenza A.N. **KY825187.1,**

Lambdapapillomavirus 2 isolate Missouri

- Bovini: identità di sequenza del 99% e query-cover del 100% con la sequenza A.N. **MF384288.1,**
Deltapapillomavirus 4 isolate 40_bos_CH

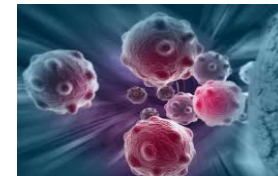
-18 campioni di tessuto, freschi costituiti da: n. 11 neoformazioni cutanee; n. 2 lingua; n. 1 lesione cutanea; n. 4 cute





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e PAP (2)



RISULTATI ottenuti su **tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina da specie GATTO**

Tabella n.2: confronto tra 2 PCR FAP e PAP, esami istologici e microscopia elettronica. **Tutti i campioni sono stati lavorati nell'ambito della RC IZSLT 03/15 e sono pervenuti presso l'IZSLT**

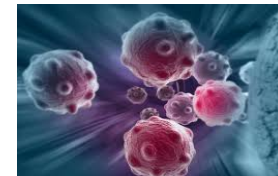
I prodotti delle PCR FAP e PAP sono stati sequenziati: presenza di FcaPV-2; 100% identità di sequenza e 99% query-cover con la sequenza A.N. EU796884.1, Feline Papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007

Confermati i 6 POS anche con le PCR JMP e E2 specifiche per FcaPV-2

Nessun POS al TEM da SCC (Squamous Cell Carcinoma)

Anno raccolta campioni-specie gatto	N° campioni	PCR FAP e PAP	ME	Esame istologico	Tipologia di organi fissati in formalina ed inclusi in paraffina
2013	5	NEG	NE	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, bocca, gengiva, naso
2014	11	NEG	NE	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, gengiva, mascella, lingua, esofago, mucosa nasale, dito
2015	9	1 POS	NE	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, gengiva, mandibola, occhio, naso, seni nasali
2016	11	NEG	1 POS	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, mandibola, labbro, sopraorbitale, naso, seni nasali, dito
2017	12	NEG	2 POS	Carcinoma squamoso, SCC orale, papillomi multipli lingua, cheratosi attinica	Padiglione auricolare, gengiva, lingua, polmone, naso, reg. inguinale, naso, dorso
2018	36	4 POS	1 POS	Carcinoma squamoso, SCC orale	Padiglione auricolare, condotto uditivo, gengiva, mandibola, lingua, occhio, reg. perioculare, reg. occipitale, palpebra, crosta naso, brush nasale, naso, tampone nasale, mucosa nasale, mento, dito, addome, coscia, mammella
2019	4	1 POS	NEG	Carcinoma squamoso, SCC orale, papilloma orale	Lingua, palato, gengiva, cavità orale/guancia
Totale campioni	88 campioni	6 POS /82 NEG (esaminati 88 camp. totali)	4 POS /19 NEG (esaminati 23 camp. totali)	Carcinoma squamoso, SCC orale, cheratosi attinica	
% Positivi		6,81% POS	17,39 % POS		





RISULTATI ottenuti su **tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina da specie GATTO - CEROVEC**

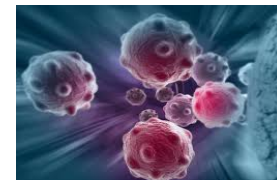
Tabella n.3: risultati ottenuti da campioni inviati dal CEROVEC e lavorati nell'ambito della RC IZSLT 03/15

N° soggetti	Organi interessati	Tipologia di organi	Diagnosi	PCR FAP e PAP
28	34	Pinna auricolare, pinna auricolare controlaterale, mucosa palato, cavità orale, lingua, gengiva, mascella, naso, narice, tessuti molli, polmone, cute, linfonodo	Carcinomi squamosi, carcinomi cutanei, cheratosi actinica, carcinomi mucosali di gatto	10 POS/ 24 NEG (esaminati 34 campioni)
	% Positività			29,41% POS

- 5 camp./10 POS in PCR FAP e PAP sono risultati POS anche con le PCR JMP e E2.

- Gli amplificati delle PCR JMP e E2 hanno mostrato: identità di sequenza del 99% e query-cover del 91% con la sequenza A.N. NC_038520.1, Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007

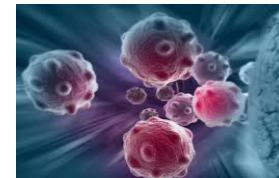




Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e PAP Considerazioni finali

- Analizzando i risultati ottenuti si osserva che **la maggiore % di positività è stata ottenuta per i tessuti freschi (44,4% campioni Positivi)** e non per i tessuti in formalina ed inclusi in paraffina (6,81 % campioni IZSLT Positivi e 29,41% campioni CEROVEC Positivi)
- Questi risultati sono dovuti:
- **frammentazione del DNA estratto.** Infatti, il protocollo di estrazione del DNA dai campioni in formalina ed inclusi in paraffina, ha richiesto un pre-trattamento con il β -mercaptoetanololo che può provocare la frammentazione degli acidi nucleici
- **minore sensibilità dei primer degenerati FAP59/FAP64 e PapF/PapR.** Però questa loro caratteristica è fondamentale per riconoscere la vasta gamma dei PV dei mammiferi e dei rettili
- **Importante:** la qualità del DNA estratto è stata sempre verificata amplificando una specifica regione di 159 bp del gene house-keeping GAPDH (la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi)





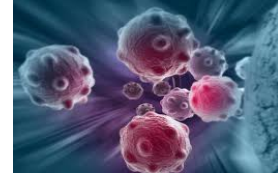
Protocollo molecolare (C) – 2 PCR (**PCR JMP** e **PCR E2**) specifiche per **FcaPV-2**

- Nello sviluppare questi due protocolli molecolari è stato tenuto
- in considerazione che il tipo di FcaPV maggiormente diffuso è il **FcaPV type 2**
- La caratteristica di questi 2 protocolli di PCR (**JMP** e **E2**) è quella di utilizzare primers che riconoscono sequenze altamente conservate nell'ambito del genoma di FcaPV-2.
- In dettaglio: 1) la **PCR JMP amplifica una regione di 177bp del gene L1**; 2) la **PCR E2 amplifica una regione di 126 bp del gene E2**
- **L1** (J. S. Munday et al., Journal compilation © 2008 ESVD and ACVD; Vol 19; pp: 259-263)
- **E2** (G. Altamura et al., Virology (2016); Vol. 496; pp : 1-8)



Fig. 10c
Carcinoma squamoso cutaneo del gatto -
Vetpedia.it





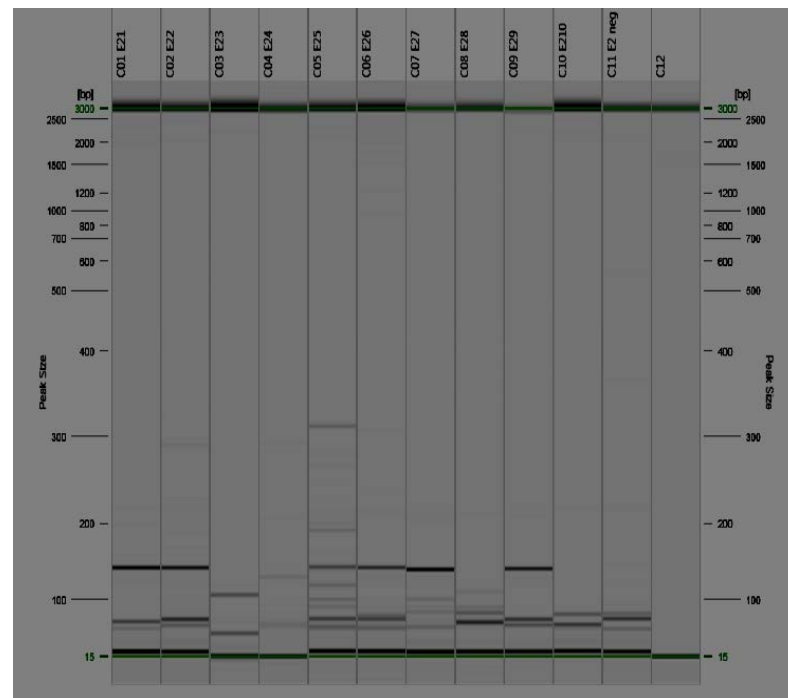
PCR JMP e PCR E2 adatte per le analisi filogenetiche

Protocollo utilizzato per le analisi filogenetiche

Gli amplificati prodotti dalle suddette PCR, sono stati purificati con il **QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)** e sequenziati utilizzando i rispettivi primers con il **BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, version 3.1 (PerkinElmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)** nel sequenziatore 3500 Genetic Analyzer (A. Biosystems, Foster City, CA, USA).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate mediante il **software Genetic Analyzer Sequencing v5.4 (A. Biosystems, Foster City, CA, USA)**.

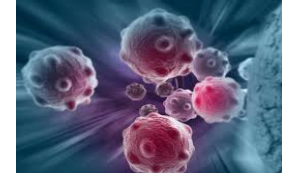
Invece, le omologie di sequenza sono state studiate e rilevate con il **programma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** mediante comparazione con le sequenze di riferimento dei vari type Papillomavirus felini a disposizione nella banca dati di sequenze NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

PCR JMP e PCR E2 (1)



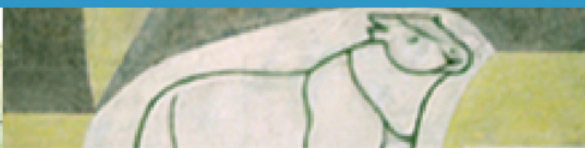
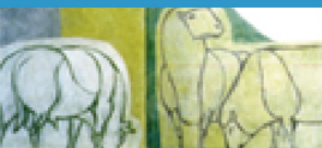
RISULTATI ottenuti su **tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina da specie GATTO**
Tabella n.4: confronto tra PCR JMP e PCR E2, esami istologici, e microscopia elettronica

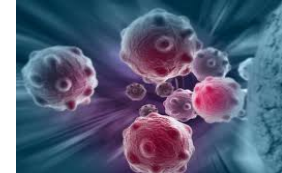
Tutti i campioni sono stati lavorati nell'ambito della RC IZSLT 03/15 e sono pervenuti presso l'IZSLT

Sono stati inviati all'università di Napoli i campioni risultati positivi alle PCR JMP ed E2 relativi ai SCC orali

26 ampl. JMP e E2 = identità di seq. del 98%-100% e query-cover del 98%-100% con la sequenza NC_038520.1; FcaPV-2 isolate Main Coon 2007

Anno raccolta campioni-specie gatto	N° campioni	PCR JMP	PCR E2	ME	Esame istologico	Tipologia di organi fissati in formalina ed inclusi in paraffina
2013	5	1POS	1 POS	NE	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, bocca, gengiva, naso
2014	11	0	0	NE	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, gengiva, mascella, lingua, esofago, mucosa nasale, dito
2015	9	3 POS	1 POS	NE	Carcinoma squamoso, SCC orale	Padiglione auricolare, gengiva, mandibola, occhio, naso, seni nasali
2016	11	7 POS	9 POS	1 POS	Carcinoma squamoso	Padiglione auricolare, mandibola, labbro, sopraorbitale, naso, seni nasali, dito
2017	12	1 POS	1 POS	2 POS	Carcinoma squamoso, SCC orale, papillomi multipli lingua, cheratosi attinica	Padiglione auricolare, gengiva, lingua, polmone, naso, reg. inguinale, naso, dorso
2018	36	12 POS	14 POS	1 POS	Carcinoma squamoso, SCC orale	Padiglione auricolare, condotto uditivo, gengiva, mandibola, lingua, occhio, reg. periorbitale, reg. occipitale, palpebra, crosta naso, brush nasale, naso, tampone nasale, mucosa nasale, mento, dito, addome, coscia, mammella
2019	4	3 POS	2 POS	NEG	Carcinoma squamoso, SCC orale, papilloma orale	Lingua, palato, gengiva, cavità orale/guancia
Totale campioni	88 campioni	27 POS/61 NEG (esaminati 88 camp. totali)	28 POS/60 NEG (esaminati 88 camp. totali)	4 POS/19 NEG (esaminati 23 camp. totali)	Carcinoma squamoso, SCC orale, papilloma orale, cheratosi attinica	
	% Positivi	30,68% POS	31,81% POS	17,39 % POS		





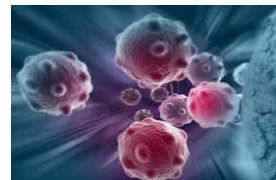
RISULTATI ottenuti su **tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina da specie GATTO - CEROVEC**

Tabella n.5: risultati ottenuti con le 2 PCR JMP e E2 sui campioni inviati dal CEROVEC e lavorati nell'ambito della RC IZSLT 03/15

N° soggetti	Organi interessati	Tipologia di organi	Diagnosi	PCR JMP	PCR E2
28	34	Pinna auricolare, pinna auricolare controlaterale, mucosa palato, cavità orale, lingua, gengiva, mascella, naso, narice, tessuti molli, polmone, cute, linfonodo	Carcinomi squamosi, carcinomi cutanei, cheratosi actinica, carcinomi mucosali di gatto	7 POS/27 NEG (esaminati 34 campioni)	12 POS/22 NEG (esaminati 34 campioni)
	% Positività			20,58%	35,29%

- Confermati 5 campioni POS sui 7 totali POSITIVI con le PCR FAP e PAP
- Gli amplificati delle PCR JMP e E2 di 2 campioni sono stati sequenziati ed hanno mostrato: identità di sequenza del 99% e query-cover del 100% con la sequenza A.N. NC_038520.1, Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007





PCR JMP e PCR E2

Considerazioni finali

- Le 2 PCR possono essere applicate sui campioni in formalina ed inclusi in paraffina in quanto **non risentono della frammentazione del DNA estratto** dato che **portano ad amplificati di piccole dimensioni (PCR JMP-177bp e PCR E2- 126 bp)**

Per la ricerca del FcaPV-2:

- **E' importante utilizzare contemporaneamente le 2 PCR** perché le **2 coppie di primers (JMP ed E2)** possono **lavorare in maniera diversa e contribuiscono ad aumentare l'attendibilità dei risultati**
- **L'alta % di concordanza tra la PCR JMP (30,68% campioni IZSLT Positivi e 20,58% campioni CEROVEC positivi) e la PCR E2 (31,81% campioni IZSLT Positivi e 35,29% campioni CEROVEC Positivi) valida ulteriormente i risultati ottenuti, ossia la presenza del FcaPV-2 nei campioni esaminati**



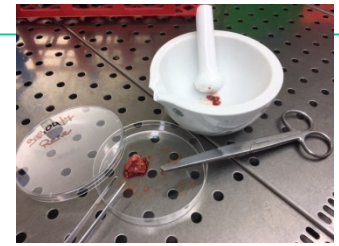
Tecniche di Microscopia Elettronica in colorazione negativa

Lesioni mucose e cutanee risultate positive in PCR

1) OMOGENIZZAZIONE del CAMPIONE*
(1:5 w/v in acqua grado reagente)

***Campioni fissati in formalina**

- over night a temperatura ambiente in acqua grado reagente
- sminuzzare finemente
- lasciare 5 min. in acqua
- due lavaggi in acqua grado reagente
- Fasi 1->5



2) CENTRIFUGAZIONI a BASSA VELOCITA' (3000 e 9000 g x 30 min.)

3) ULTRACENTRIFUGAZIONE con AIRFUGE BECKMAN (21 psi x 20 min)



4) COLORAZIONE NEGATIVA
2% NaPt, pH 6.8 x 2-3 min



5) OSSERVAZIONE al TEM



5)

Osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione

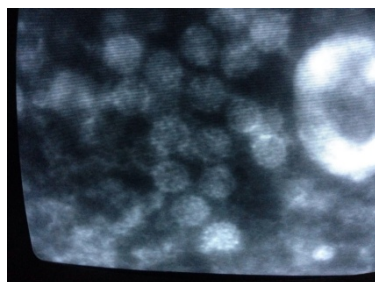


Philips EM 208

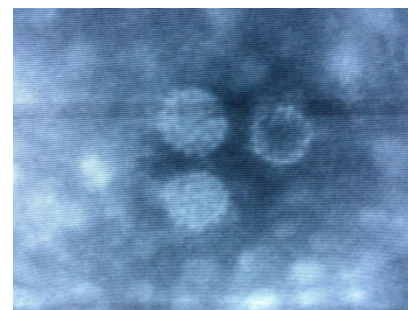
80 kV 28000-36000x

Particelle nude, a struttura icosaedrica
50-55 nm

ME		
Pos	Neg	Totali ME
NE	NE	0
NE	NE	0
NE	NE	0
1	3	4
2	0	2
1	13	14
0	3	3
4 (17,39%)	19 (82,61%)	23

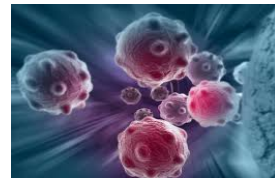


FcaPV2 Gatto, padiglione auricolare
© G. Cardeti (IZSLT, Roma)



FcaPV2 Gatto, mucosa linguale
© G. Cardeti (IZSLT, Roma)





Ringraziamenti

Ai miei colleghi: Valeria Antognetti per il grande aiuto nella messa a punto dei metodi molecolari e la lavorazione dei campioni e Raffaella Conti e Maurizio Zini per il grande aiuto nel sequenziamento dei campioni positivi e dubbi.

A tutte le Unità Operative:

- 1) **IZSLT, UOC Virologia (ex Lab. Ingegneria genetica e analisi biomolecolare, Biotecnologie)**
- 2) **IZSLT, Direzione operativa Diagnostica generale, Lab. Anatomo-istopatologia (ex Accettazione)**
- 3) **CEROVEC, Centro di Referenza di Oncologia Veterinaria e Comparata**
- 4) **IZSPLV, Lab. Diagnostica Oncologica.** Un particolare grazie alla Dott.ssa Paola Modesto che ci è venuta in aiuto per il servizio di sequenziamento ed analisi delle ultime sequenze
- 4) **Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Medicina veterinaria e Produzioni animali.** Un particolare ringraziamento al Prof Borzacchiello e ad Dott. Gennaro Altamura che mi hanno introdotto nel mondo molecolare dei Papillomavirus

