

# U.R.T.D. (Upper Respiratory Tract Disease)



- 1) FCV
- 2) FHV-1
- 3) *Chlamydophila felis*
- 4) *Bordetella bronchiseptica*
- 5) Reovirus, Mycoplasma

# CALICIVIROSI FELINA

Malattia a diffusione praticamente mondiale, caratterizzata da sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio e ulcerazioni orali

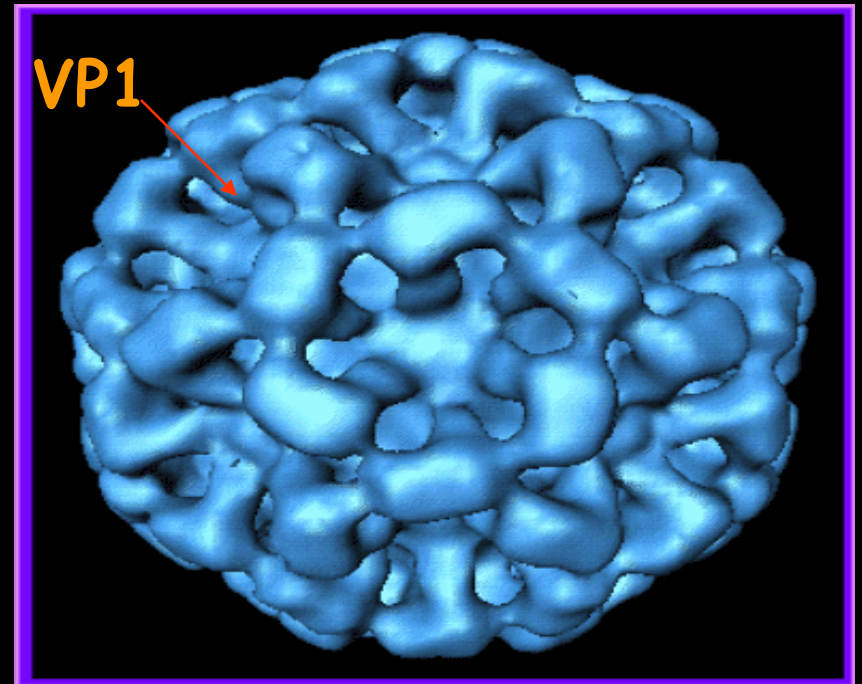
Sostenuta dal Calicivirus felino (FCV)



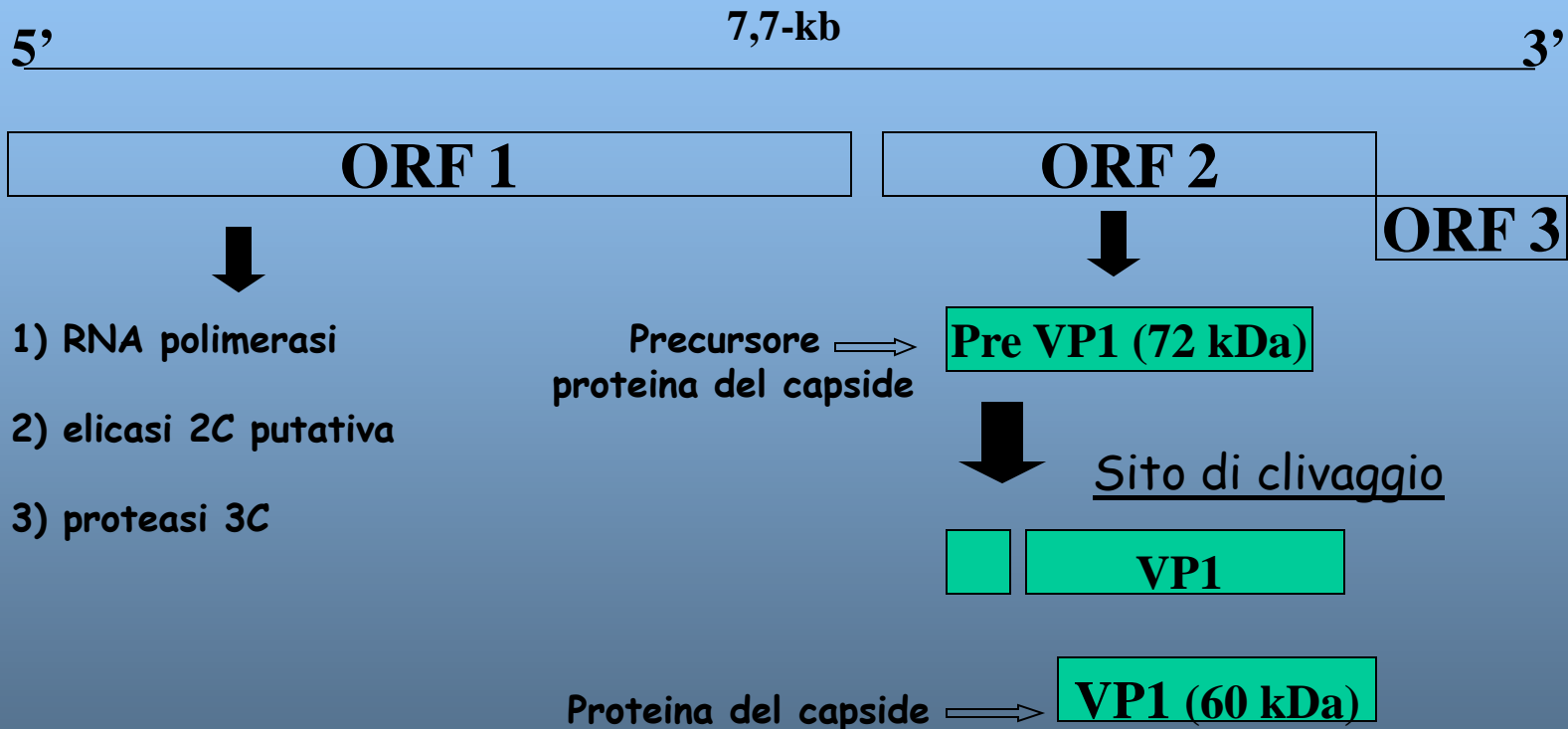
# EZIOLOGIA

- RNA monocatenario
- Sprovvisto di envelope
- $\varnothing$  35-40 nm
- Il capsid è costituito da 180 copie di di una singola proteina VP1
- Sierotipo unico
- Elevata variabilità genetica ed antigenica

FCV



# Caratteristiche genetiche e antigeniche



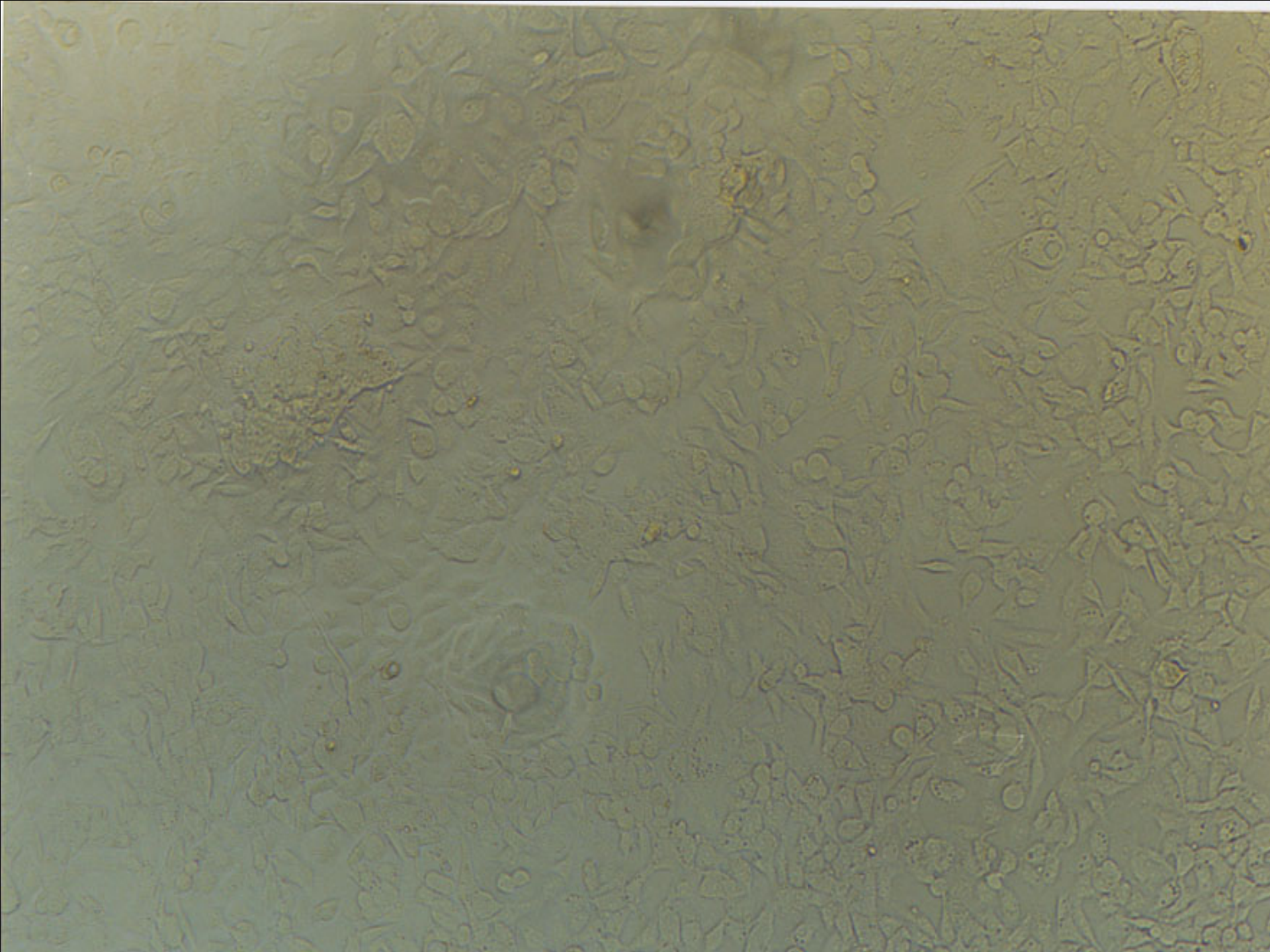
# COLTIVAZIONE

- Cellule renali di gatto
- Colture primarie di rene di delfino
- Linea cellulare VERO
- Cellule CrFK (Crandell Feline Kidney)

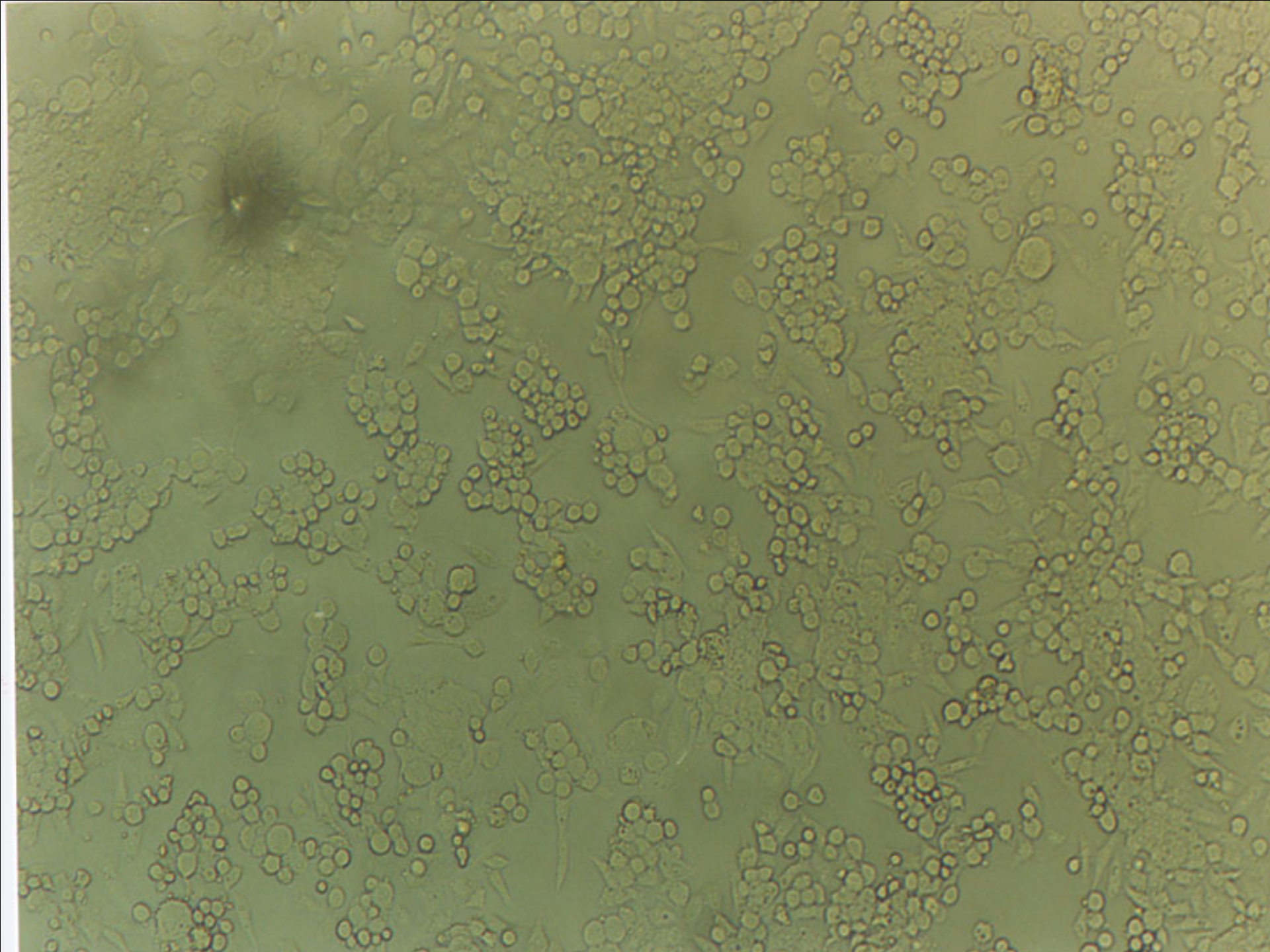


L'effetto citopatico si manifesta con arrotondamento cellulare, aumento della rifrangenza, distacco e lisi cellulare









# EPIDEMIOLOGIA

## PRINCIPALI FONTI DI DIFFUSIONE

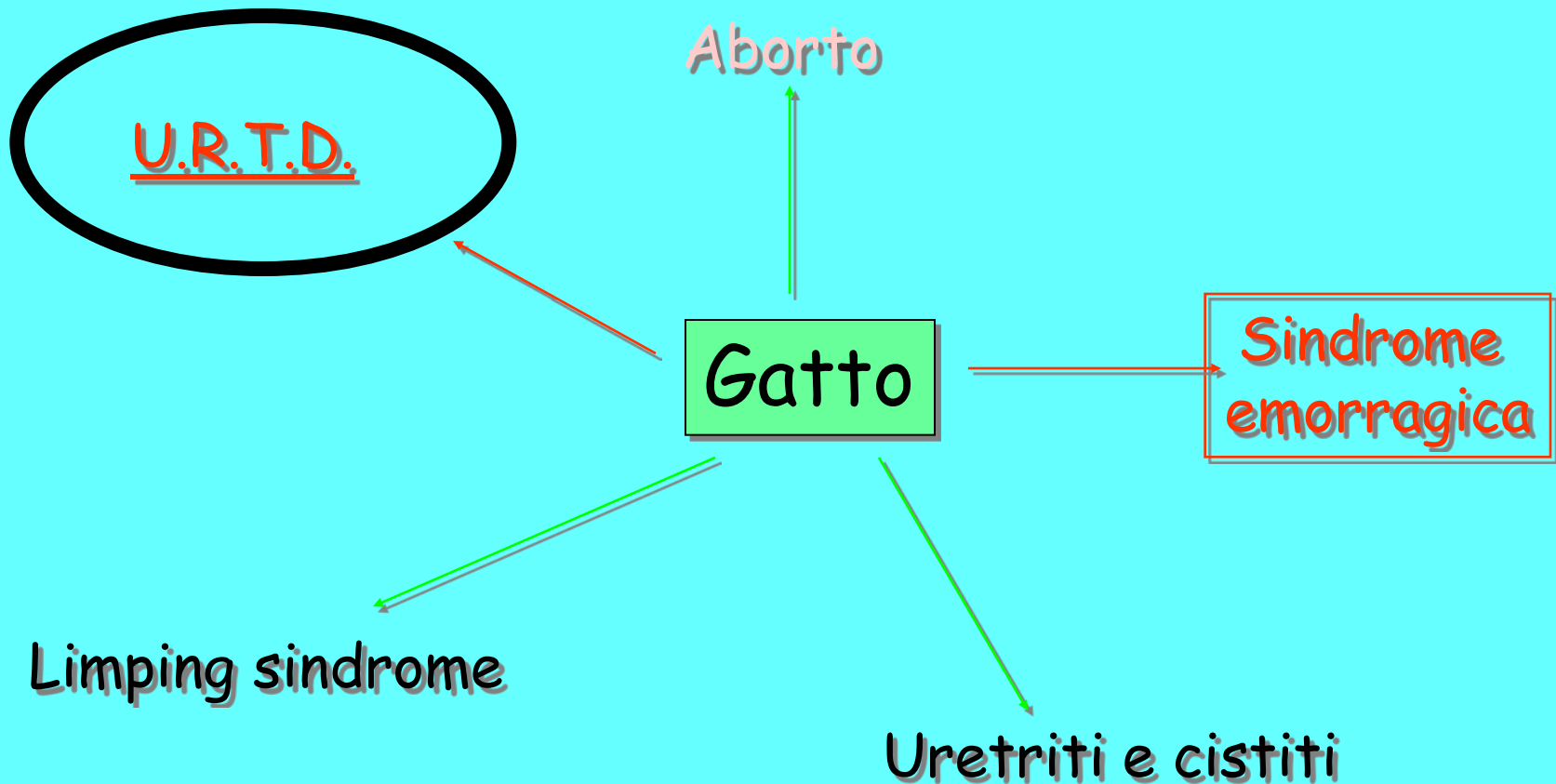
- Animali in fase acuta di malattia
- ANIMALI PERSISTENTEMENTE INFETTI

Il sito di persistenza è rappresentato dall'epitelio tonsillare.

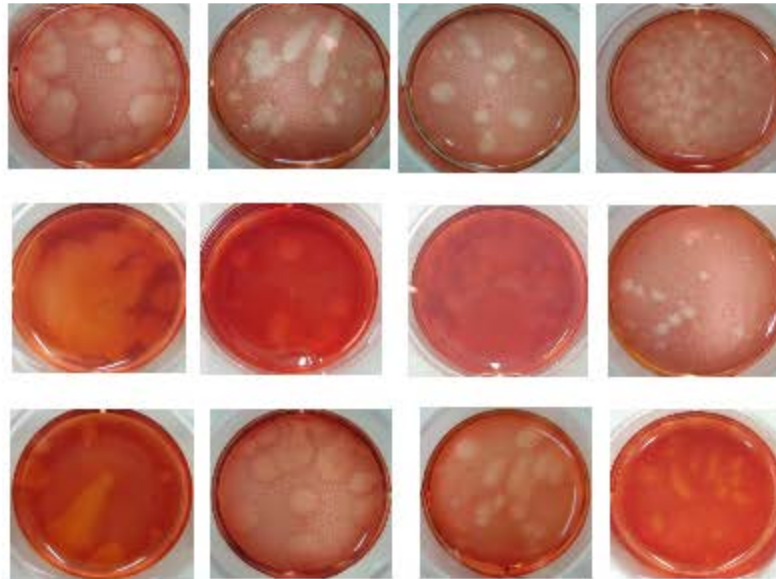
- L'eliminazione di FCV da parte di gatti persistentemente infetti è continua
- Il 50 % dei soggetti infetti è in grado di eliminare il virus per un tempo di circa 75 giorni
- Alcuni gatti possono rimanere portatori per tutta la vita in assenza di sintomatologia clinica.



# FCV nel gatto



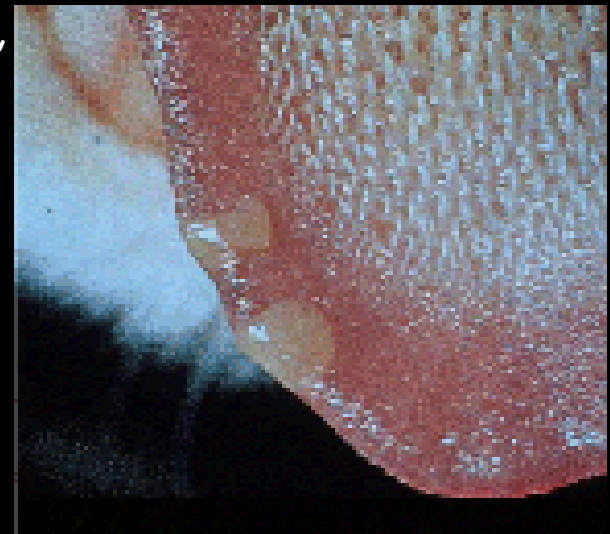
# FCV a diversa virulenza



Di Martino et al., 2008

# SINTOMATOLOGIA

- Scolo nasale inizialmente sieroso, starnuti, a volte tosse e dispnea.  
Congiuntivite, blefarospasmo e chemosi;  
spesso si osservano ulcerazioni del cavo orale e gengiviti croniche
- **Sindrome emorragica:** caratterizzata da elevata mortalità, conseguente ad un'insufficienza multiorganica
- *limping syndrome*: caratterizzata da andatura rigida, iperestesia e dolorabilità articolare, unitamente a febbre, ulcerazioni del cavo orale e lievi sintomi respiratori.
- FCV è stato isolato in feti abortiti
- L'infezione da FCV è stata anche associata a forme di enterite e gravi patologie delle basse vie urinarie del gatto.





# FCV nel cane

CaCV

(Shaffer et al., 1985;  
Mochizuki et al., 1993)



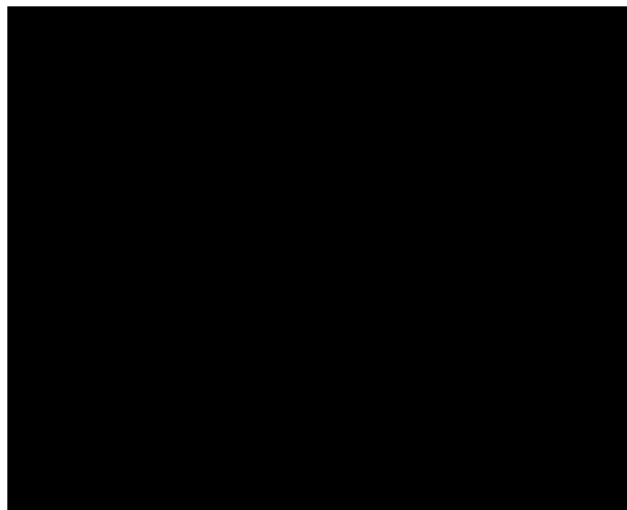
FCV-like

Evermann et al., 1981;  
San Gabriel et al., 1996;  
Martella et al., 2002;  
Di Martino et al., 2009)

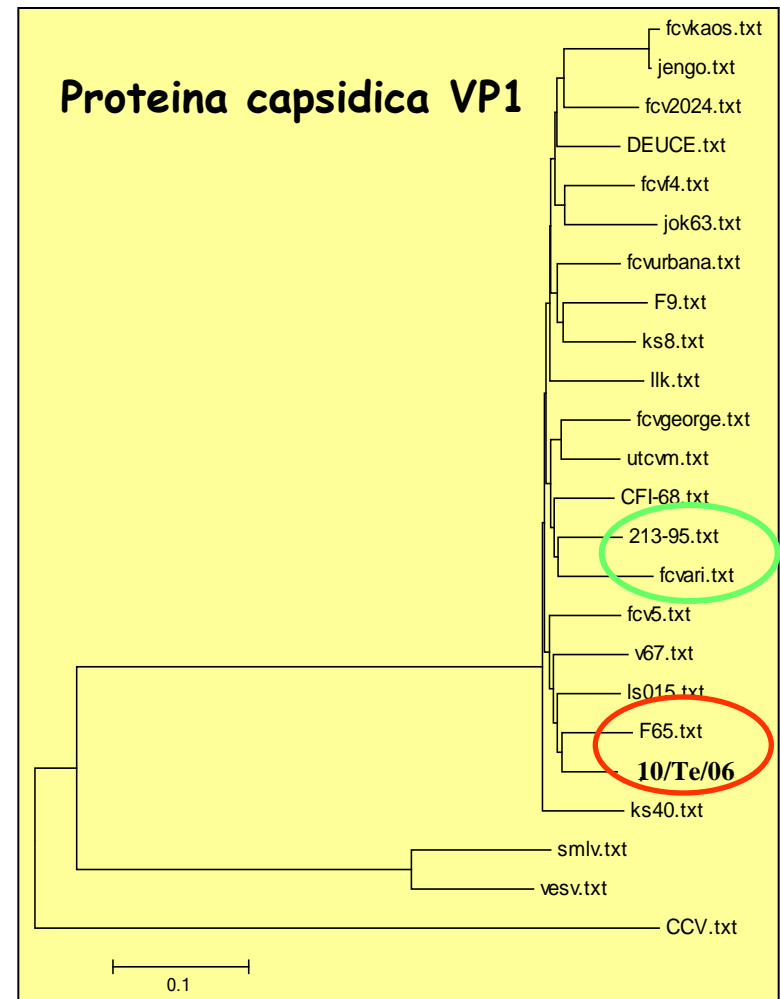
Calicivirus non  
correlati a FCV e CaCV

(Crandell, 1988)

# Albero filogenetico basato sulla sequenza aminoacidica della proteina capsidica VP1



— 50 nm



Di Martino et al., 2009

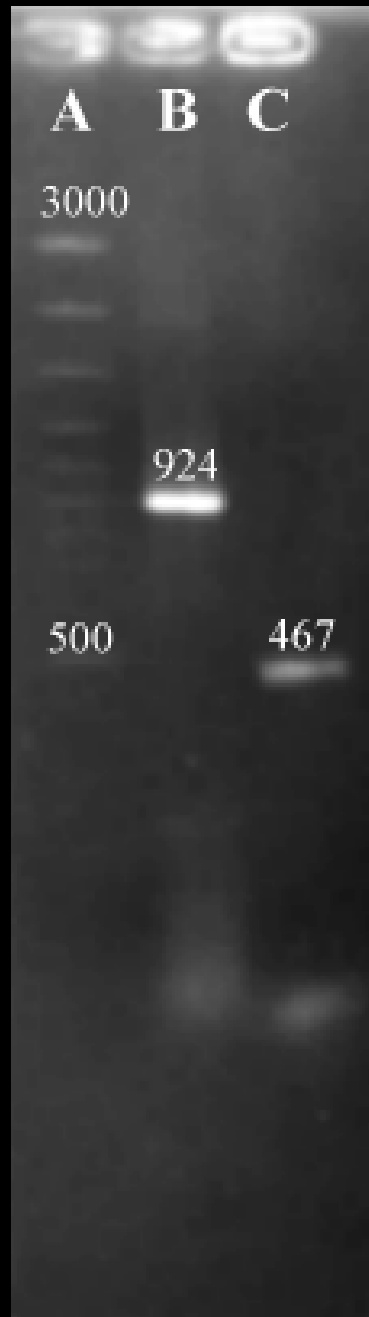
# DIAGNOSI

- La diagnosi clinica non permette altro che avanzare un sospetto sulla presenza della malattia
- Fondamentale è la diagnosi di laboratorio → diretta
- Numerosi test disponibili ma con diversa sensibilità

Campione di partenza: tampone congiuntivale e faringeo

- 1) Isolamento virale
- 2) Immunofluorescenza indiretta
- 3) ELISA
- 4) NESTED RT-PCR (Marsilio et al., 2005)





**FCV**

# PROFILASSI

- Profilassi igienico-sanitaria
- Profilassi immunizzante:
  - vaccini attenuati (FCV-F9)
  - vaccino inattivato bivalente (2005)
    - vaccini ricombinanti (in corso di studio)

# Rinotracheite virale del gatto

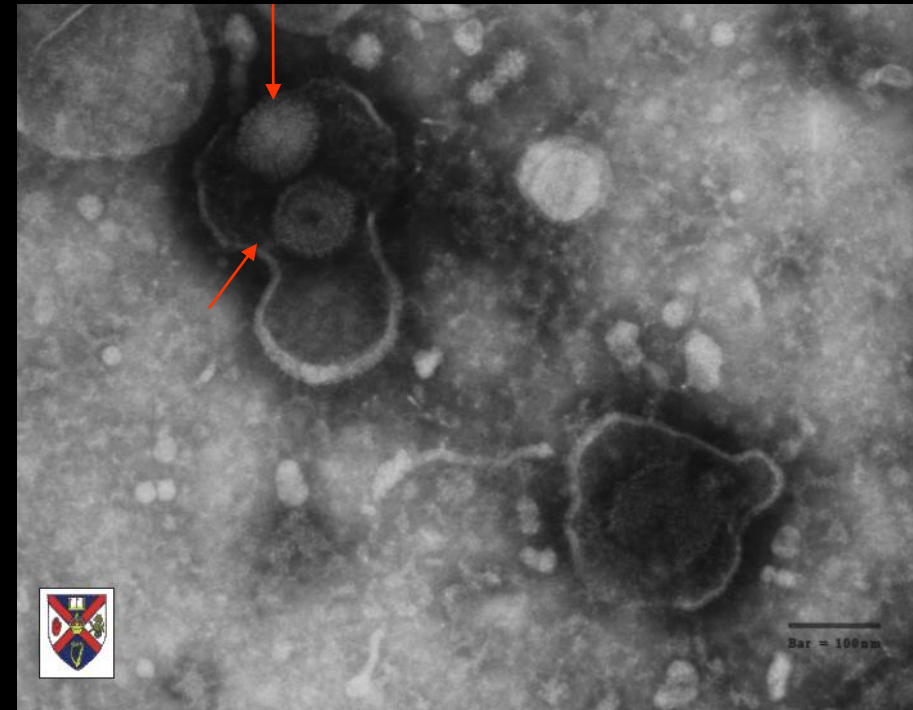
Malattia infettiva e contagiosa sostenuta dall'herpesvirus felino tipo 1 (FHV-1: Feline herpesvirus type 1), caratterizzata da sintomatologia respiratoria e gravi quadri di cheratocongiuntivite

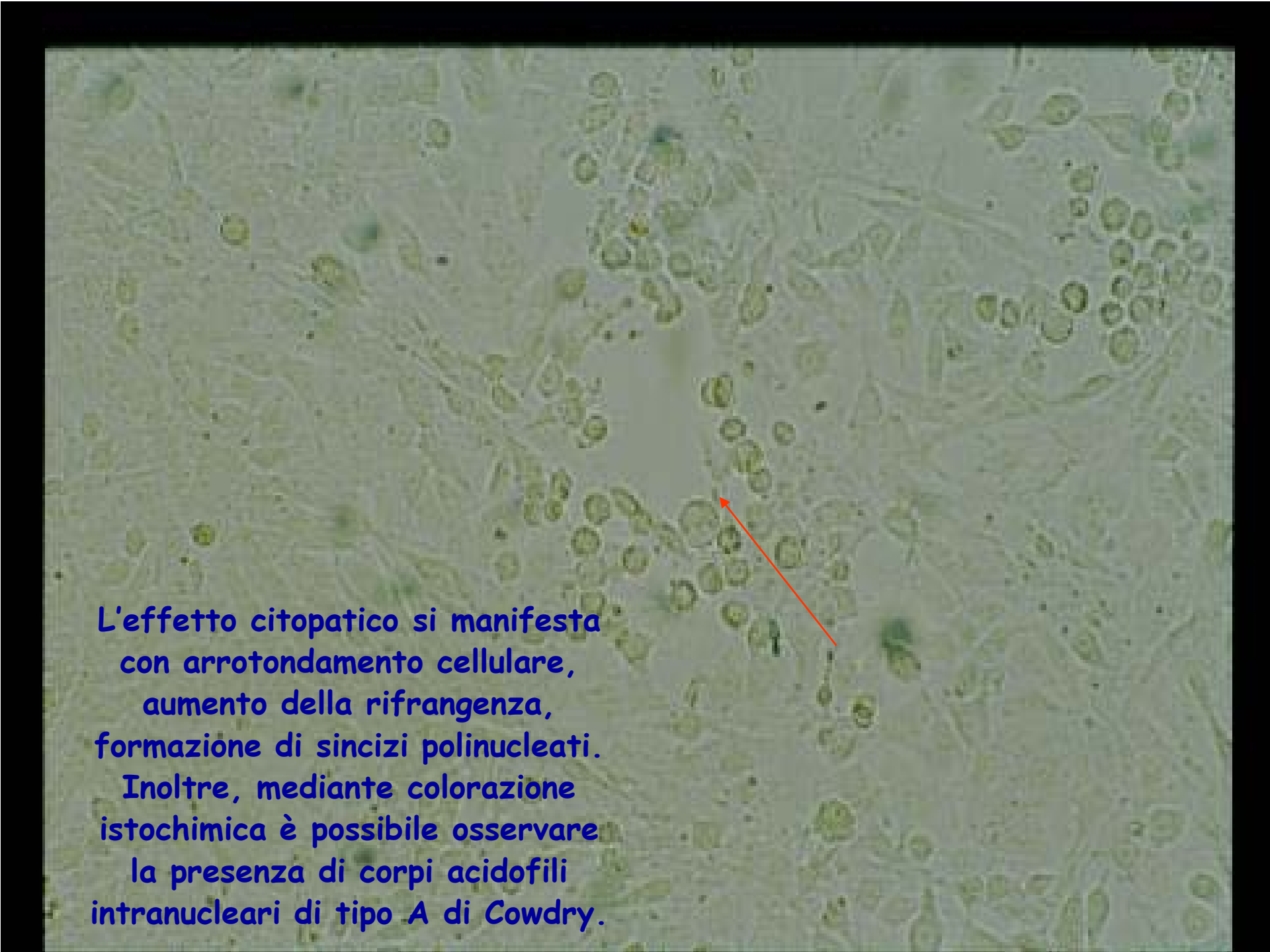


# EZIOLOGIA

## FHV-1

- DNA bicatenario 130Kb
- Provvisto di envelope di natura glicoproteica
- $\varnothing$  150-200 nm
- Sierotipo unico



A light micrograph showing a dense population of cells. Many cells exhibit cytopathic effects, including rounding up and increased refractility. A red arrow points to a specific cell in the lower-middle section of the image. The overall appearance is that of a cell culture with significant viral damage.

L'effetto citopatico si manifesta con arrotondamento cellulare, aumento della rifrangenza, formazione di sincizi polinucleati. Inoltre, mediante colorazione istochimica è possibile osservare la presenza di corpi acidofili intranucleari di tipo A di Cowdry.

# EPIDEMIOLOGIA

- Si riscontra soprattutto nelle colonie feline
  - eliminatori sintomatici
    - in forma acuta
    - in forma cronica
  - portatore latente
    - eliminatore
    - non eliminatore
- Trasmissione verticale



# EPIDEMIOLOGIA

Fenomeno della latenza: capacità del DNA virale di rimanere localizzato in forma inerte nel nucleo delle cellule ospiti sottoforma di plasmide extracromosomiale.

Siti di latenza: gangli trigeminali, nervi ottici, chiasma ottico, bulbo olfattorio, ghiandole lacrimali, cornea e turbinati nasali

Condizioni stressanti quali ad esempio trattamenti con corticosteroidi, gravidanza e lattazione o la concomitante presenza di patologie immunosoppressive possono determinare la riattivazione e conseguente eliminazione del virus nell'ambiente esterno

La latenza è un fenomeno diverso dalla persistenza

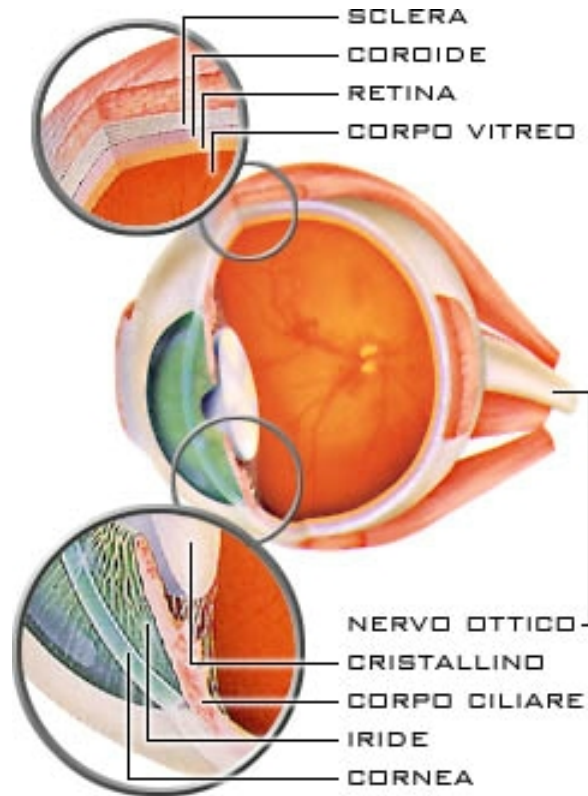
# SINTOMATOLOGIA

Starnuti, scolo sieroso nasale e oculare, febbre e anoressia.

Congiuntivite, inizialmente sierosa, che spesso evolve in forma mucopurulenta, fino a cheratocongiuntivite secca.

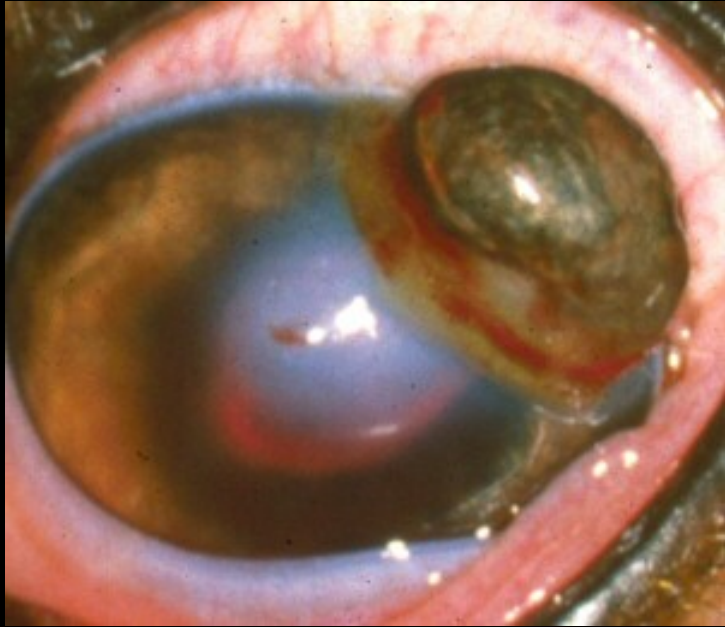
Le ulcere corneali possono evolvere nel descemetocèle e lesioni congiuntivali quali il simblefaro (adesione della congiuntiva con se stessa o alla cornea lesionata), e il prolasso permanente della terza palpebra.





La cornea ha uno spessore di circa 1 mm ed è composta dall'esterno all'interno da 5 strati:

- 1) un epitelio pavimentoso (stratificato)
- 2) la membrana di Bowman
- 3) lo stroma
- 4) la membrana di Descemet
- 5) l'endotelio





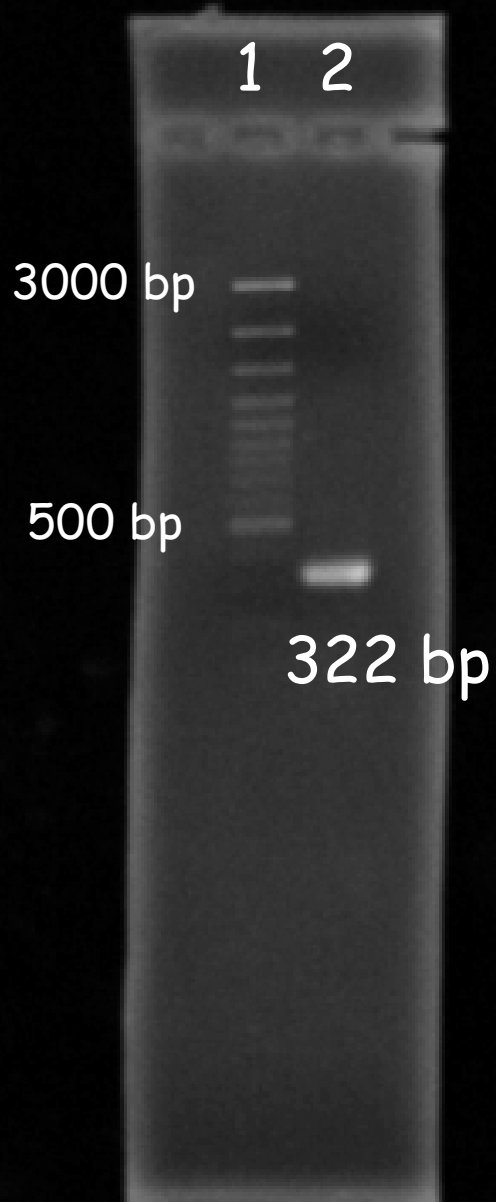
# DIAGNOSI

- La diagnosi clinica non permette altro che avanzare un sospetto sulla presenza della malattia ⇒
- Fondamentale è la diagnosi di laboratorio diretta

Campione di partenza: tampone congiuntivale e faringeo

- 1) Isolamento virale
- 2) Immunofluorescenza indiretta
- 3) ELISA
- 4) PCR

# FHV-1



# I vantaggi connessi con l'impiego della PCR sono:

- 1) possibilità di identificare il genoma bersaglio anche se nei campioni di partenza vi è un'esigua quantità di virus;
- 2) più semplice conservazione e trasporto dei campioni al laboratorio;
- 3) tempi più rapidi per ottenere la diagnosi eziologica.

# PROFILASSI

- Profilassi igienico-sanitaria
- Profilassi immunizzante
  - vaccini attenuati
  - vaccini inattivati
  - vaccini a sub-unità
  - vaccini ricombinanti

# PROBLEMI CONNESSI ALLA VACCINAZIONE

- Capacità del ceppo vaccinale attenuato di latentizzare e di ricombinarsi
- Capacità di FHV-1 di variare il suo assetto antigenico

# TERAPIA

- 1) Trifluoridina all'1% (Viroptic®, Monarch Pharmacy; Trifluoridine Ophthalmic Sol., Wedgewood Pharmacy)
- 2) Idoxuridina allo 0.1% o 0.5% che rispetto alla prima, risulterebbe meno irritante, più economica e di facile preparazione.
- 3) Nei gattini che presentano una sintomatologia acuta grave si può ricorrere all'impiego di interferone omega felino (FeIFN $\omega$ ) somministrato per via sottocutanea o per via oftalmica
- 4) Analogamente si può ricorrere all'impiego di Interferone alpha-2B come terapia adiuvante sia per via orale (30 UI al giorno) che topica (30-50 U/ml diluito in lacrime artificiali, applicate 3-5 volte al giorno).

E' sconsigliato l'impiego di antivirali ad uso sistemico quali ad esempio Aciclovir (Zovirax/Burroughs Wellcome): possono compromettere la funzionalità midollare e renale

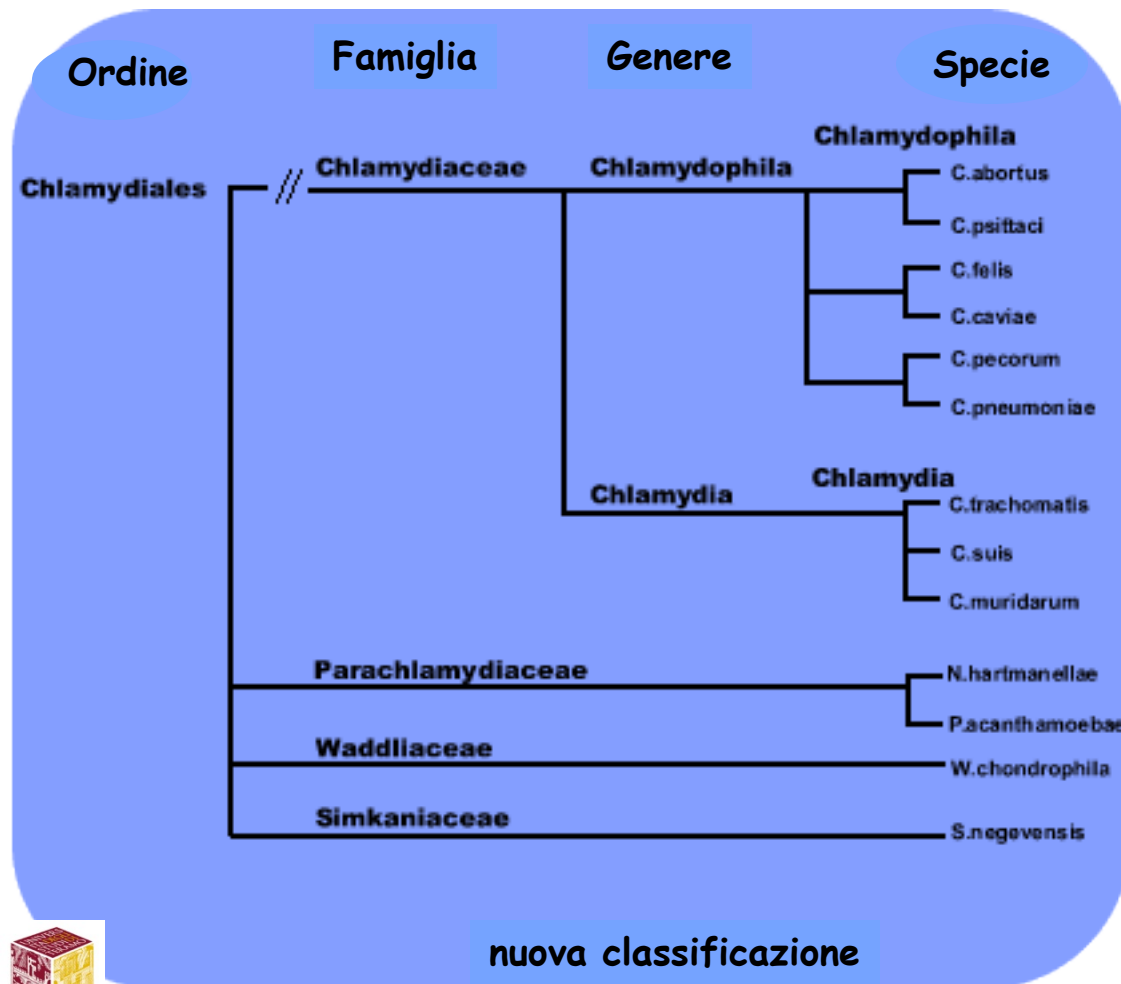


# *Chlamydophila felis*

- congiuntivite
- polmonite



# CHLAMYDIA O CHLAMYDOPHILA?



OSPITI

Mammiferi

Volatili

Gatti

Cavie

Mammiferi

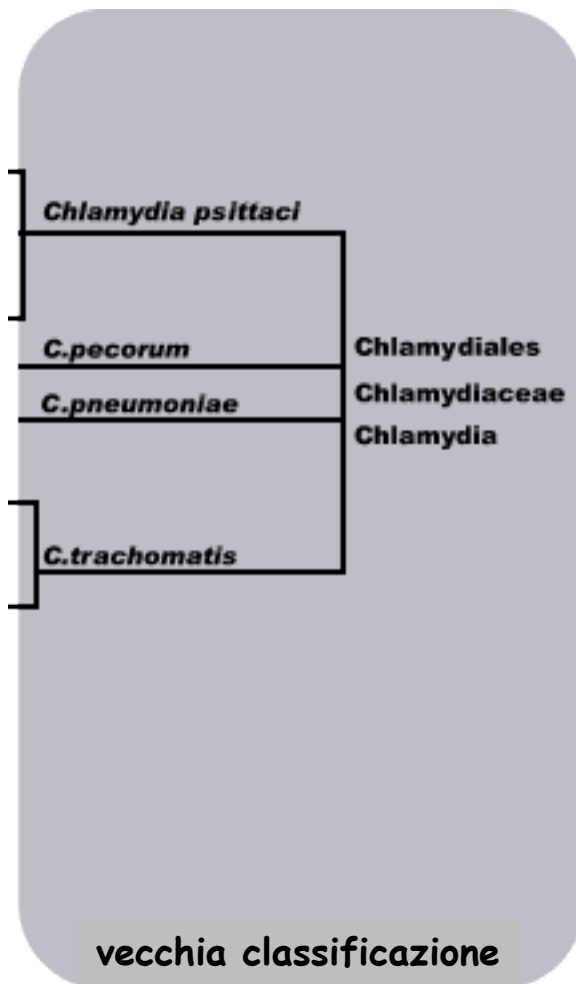
Uomo

Uomo

Suini

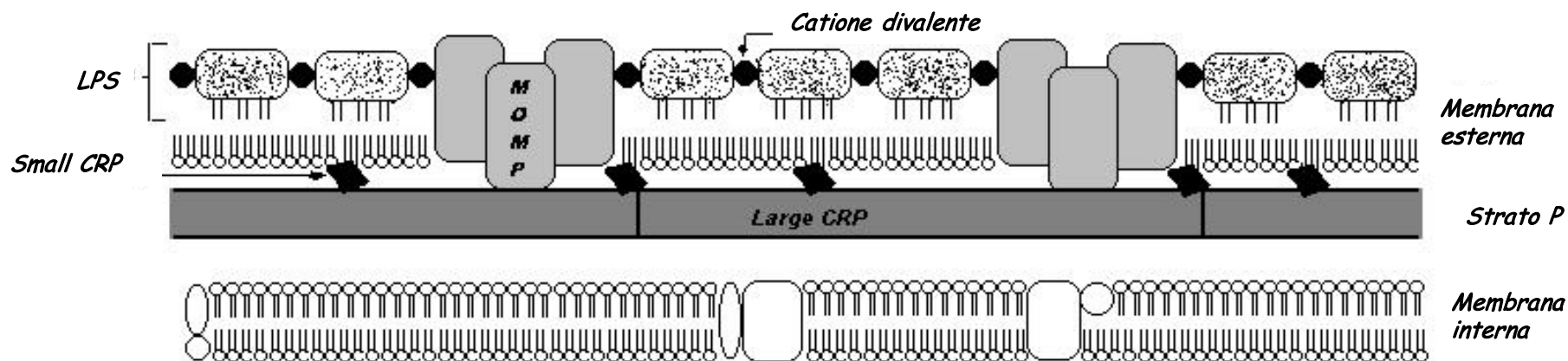
Topo

Criceto



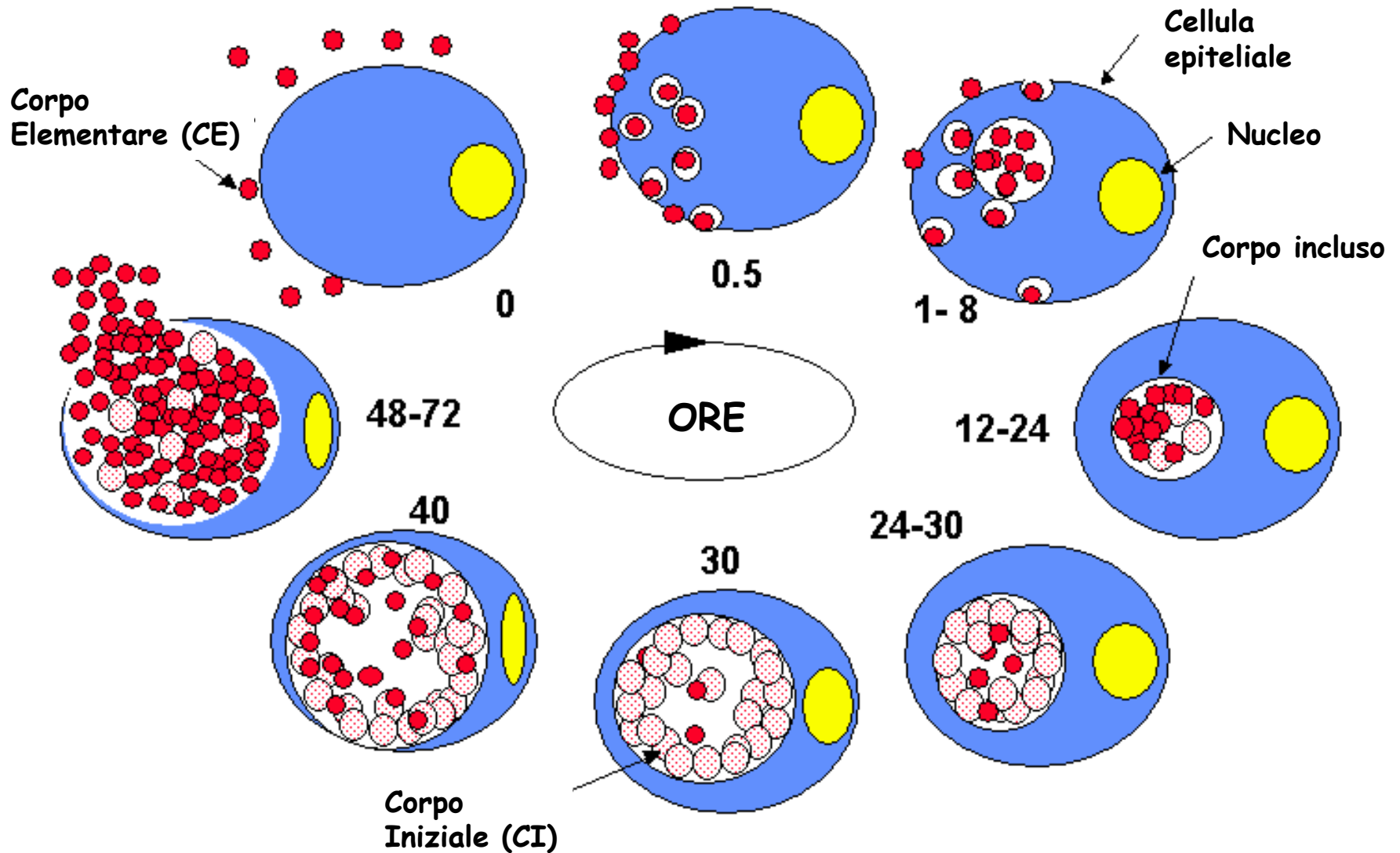
# Caratteristiche delle chlamydie/chlamydophile

- gruppo di batteri intracellulari obbligati
- batteri Gram-negativi
  - Presenza di una doppia membrana trilaminare





# Ciclo di sviluppo delle chlamydie



# SPETTRO D'OSPITE

- *Chlamydia trachomatis*
  - uomo
- *Chlamydia suis*
  - suino
- *Chlamydia muridarum*
  - topo, hamster
- *Chlamydophila psittaci*
  - Volatili, uomo
- *Chlamydophila pneumoniae*
  - uomo, koala, cavallo
- *Chlamydophila pecorum*
  - bovini, ovi-caprini, suini, koala
- *Chlamydophila felis*
  - **Gatto**, uomo
- *Chlamydophila caviae*
  - cavia
- *Chlamydophila abortus*
  - ovi-caprini, mammiferi (uomo)







# La diagnosi di laboratorio

Essenziale per:

- ✓ Giungere a una diagnosi di certezza
- ✓ Escludere altri agenti associati a URTD
- ✓ Individuare gli animali con infezione asintomatica



# Identificazione dell'antigene

- ✓ Colorazione di impronte o sezioni di tessuto (*Machiavello, Ziehl-neelsen, Giemsa*)
- ✓ Immunoistochimica
- ✓ Immunofluorescenza (*MOMP, LPS*)
- ✓ ELISA



# Isolamento dell'agente

## Uova embrionate di pollo:

- ✓ Tamponi congiuntivali, vaginali
- ✓ *Inoculum* nel sacco vitellino
- ✓ Morte tra il 4° e il 13° giorno
- ✓ Edema della membrana corionallantoidea e *pocks*

## Colture cellulari:

- ✓ Tamponi congiuntivali, vaginali
- ✓ *McCoy, BGM, BHK, HeLa*
- ✓ Inclusioni chlamydiali nel citoplasma cellulare
- ✓ Immunofluorescenza sui vetrini allestiti dai monostrati infetti

Prelievo, trasporto e conservazione adeguati per preservare la vitalità delle chlamydie



# Tests sierologici

- ✓ Fissazione del Complemento (LPS, animali vaccinati)
- ✓ Immunofluorescenza
- ✓ ELISA:
  - Corpi Elementari
  - Antigene ricombinante (*LPS*, 80-90 kDa, *POMP90*)
  - Antigene sintetico (*MOMP*)
  - Antigene solubile
  - ELISA competitiva con anticorpi monoclonali (*MOMP*)



# Amplificazione del DNA mediante PCR

## Sequenze bersaglio:

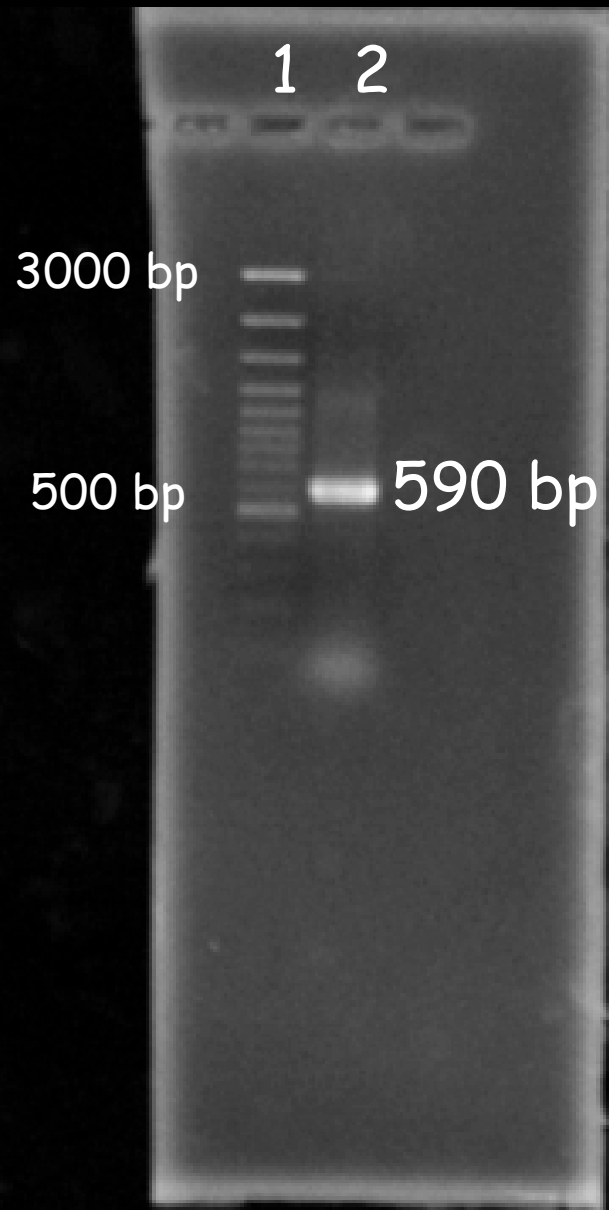
- ✓ *OmpA*
- ✓ *KDO-transferasi*
- ✓ *16S e 23S*
- ✓ *Pmp*
- ✓ *Omp2*

## Campioni:

- ✓ Tamponi congiuntivali
- ✓ Tamponi faringei (!)
- ✓ Tamponi vaginali

Identificazione di specie mediante tecniche di RFLP,  
Southern ibridazione





*Chlamydophila spp.*



1 2 3

*Ch. felis*

3000 bp

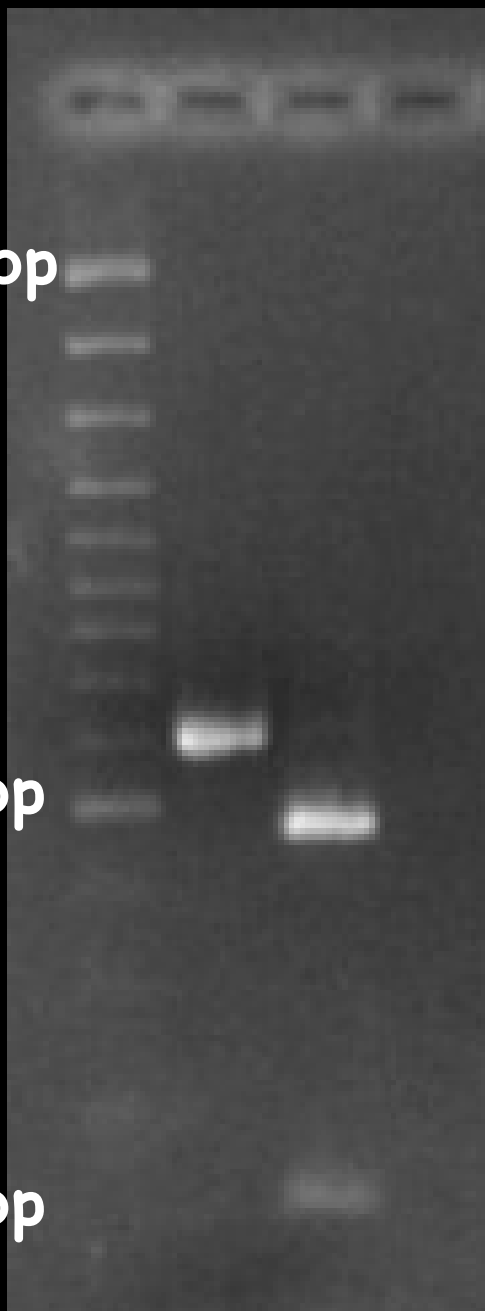
500 bp

100 bp

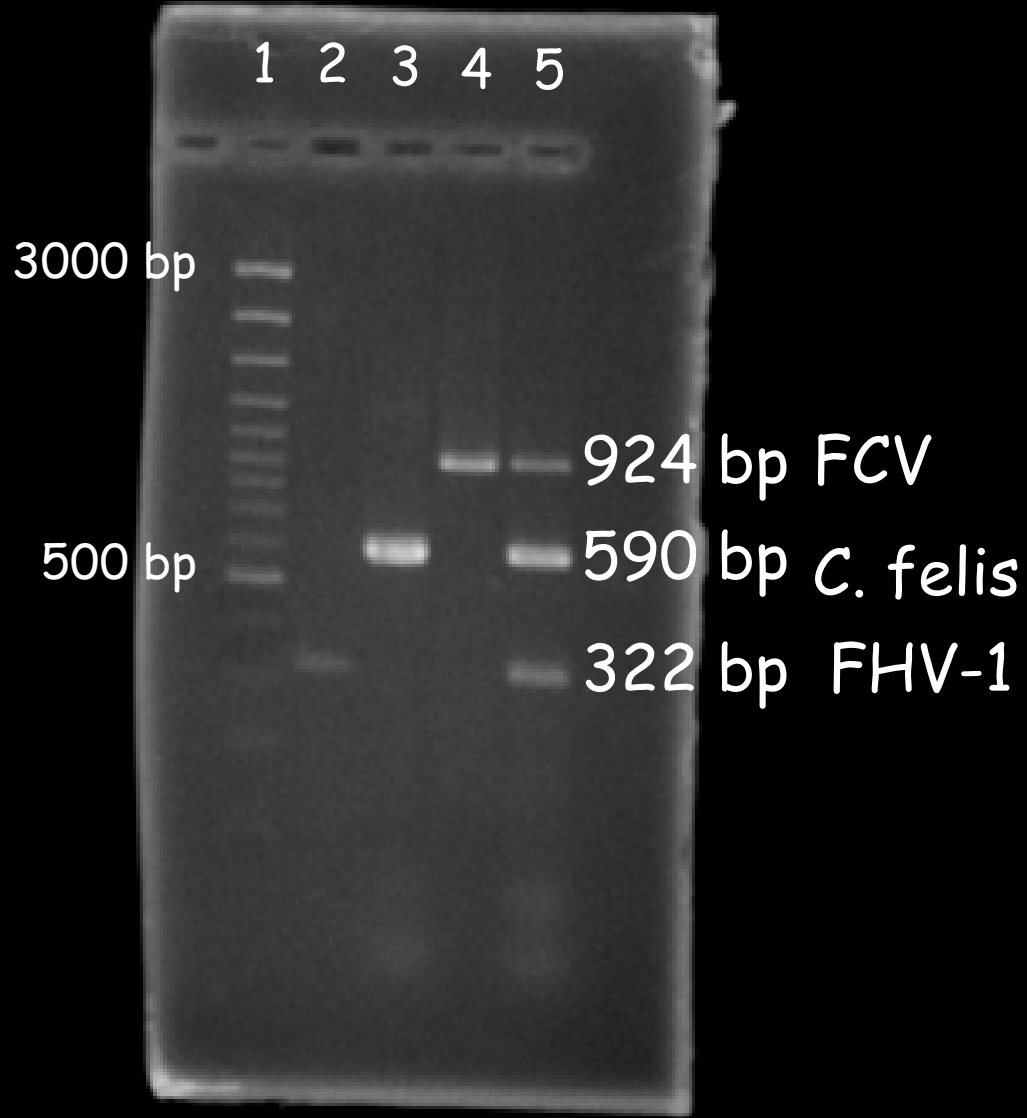
590 bp

468 bp

122 bp



# RT MULTIPLEX-PCR



# PROFILASSI

- Profilassi igienico-sanitaria
- Profilassi immunizzante
  - Vaccini attenuati
  - Vaccini inattivati

# TERAPIA

## 1) La doxiciclina è l'antibiotico di scelta

- 10 mg/kg una volta al dì per 3-4 settimane
- 5 mg/kg due volte al dì per 3 settimane

## 1) Problemi in seguito alla somministrazione di doxiciclina

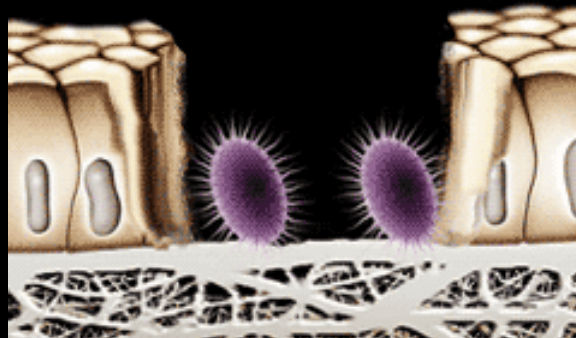
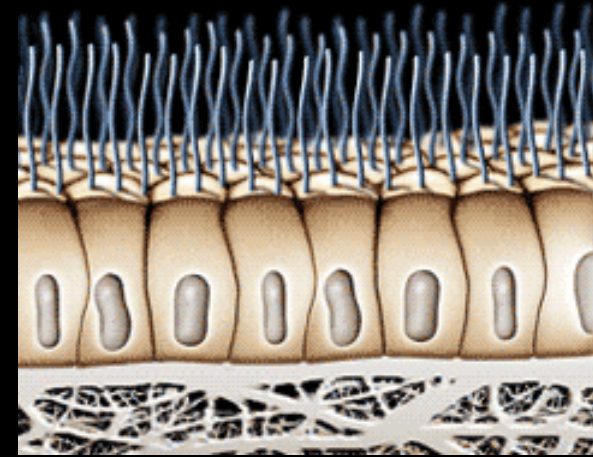
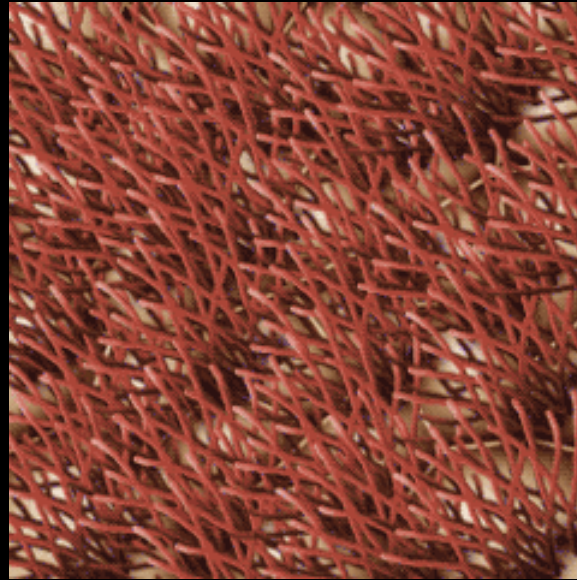
- Colorazione giallastra permanente dei denti
- Epatopatie
- Esofagite
- Difficoltà nell'uso all'interno delle colonie feline

## 1) Eseguiti studi su altri antibiotici (Owen et al., 2003)

- Azitromicina è il macrolide utilizzato in medicina umana
  - Singola dose invece del trattamento per una settimana
- Nei gatti: 10-15 mg/kg una volta al dì per 3 gg.
  - ✓ Azitromicina per 25 gg.
- Trattamento infezione acuta efficace
- Trattamento infezione cronica non efficace



# *Bordetella bronchiseptica*



# *Bordetella bronchiseptica*

Rappresenta il batterio più frequentemente associato alla sindrome "tosse dei canili" nel cane!!!!

Nel gatto è uno dei patogeni più comunemente associati alle URTD.

Altre specie recettive:

-coniglio

-topo

-uomo per il quale è stato ipotizzato il rischio di trasmissione interspecie animale-uomo



# *Bordetella bronchiseptica*

*Diagnosi :*

- ✓ *Isolamento su terreni di coltura*
- ✓ *PCR*



# PROFILASSI

- Profilassi igienico-sanitaria