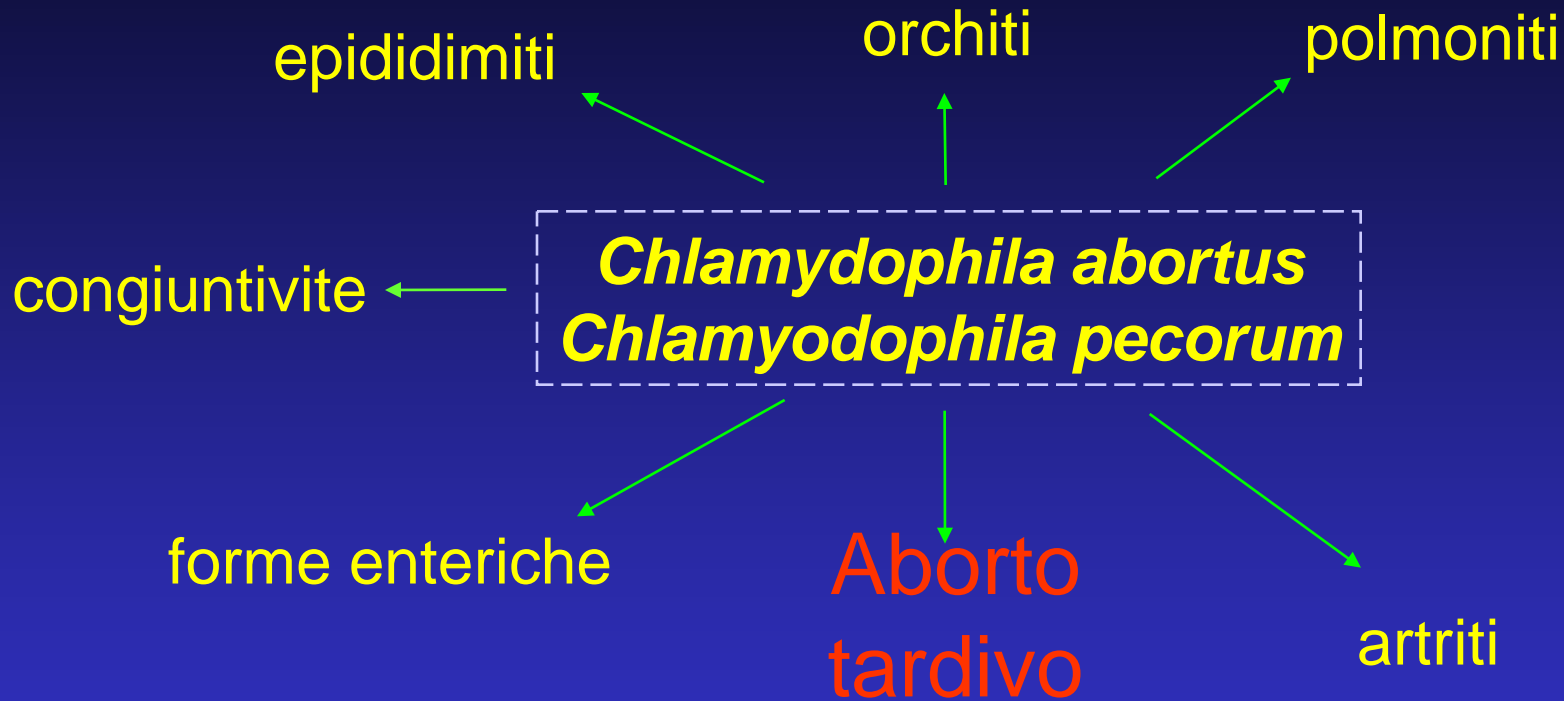


*Le chlamydiosi dei ruminanti: "vecchia"
patologia "nuove" strategie*



Chlamidiosi dei ruminanti



Chlamydophila abortus

- aborto tardivo
- natimortalità
- nascita di agnelli deboli e disvitali
- orchiti

Chlamydophila pecorum

- polmonite
- poliartrite
- congiuntivite
- enterite



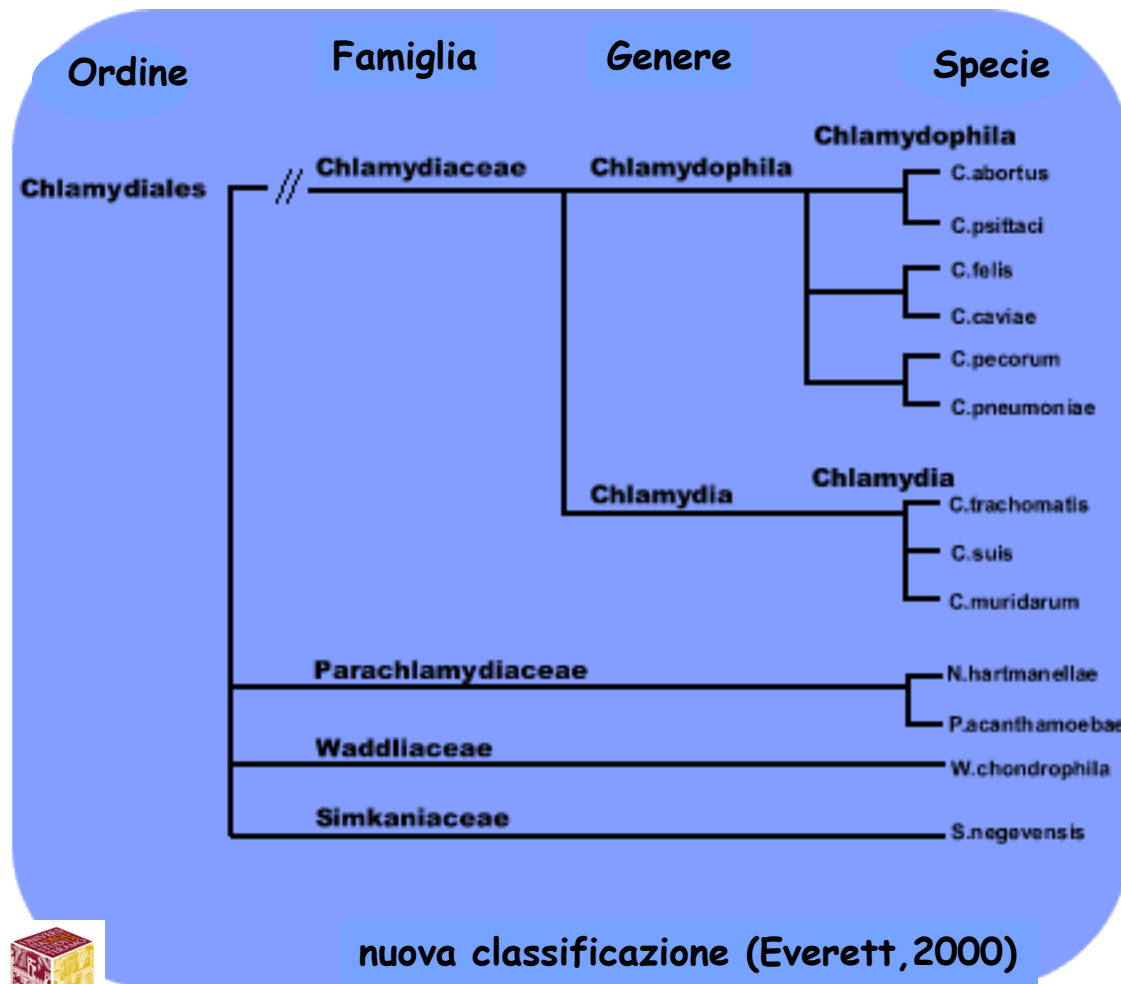
Importanza economica delle chlamydiosi

- Perdite dirette
 - Letalità nelle forme più gravi
 - Perdita degli incrementi ponderali
 - Bassa resistenza alle malattie infettive e parassitarie
 - Spese mediche
 - Aborti, ritorni in calore

ZOONOSI



CHLAMYDIA O CHLAMYDOPHILA?



OSPITI

Mammiferi

Volatili

Gatti

Cavie

Mammiferi

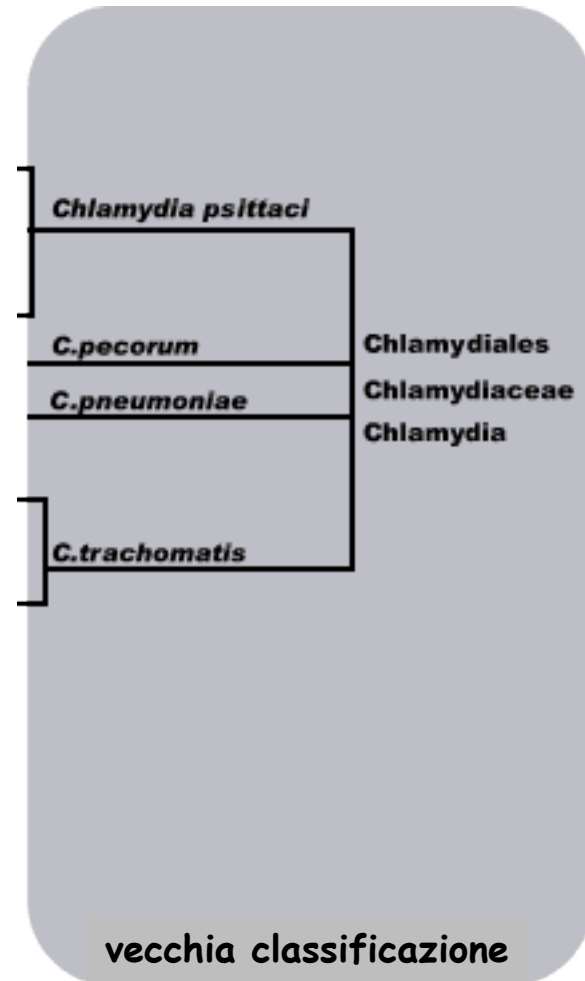
Uomo

Uomo

Suini

Topo

Criceto



Le nuove denominazioni

- *Chlamydophila abortus*
 - *Chlamydia psittaci* biotipo 1/sierotipo 1
 - aborto enzootico
- *Chlamydophila pecorum*
 - *Chlamydia psittaci* biotipo 2/sierotipo 2
 - encefalomielite, poliartrite
 - *Chlamydia psittaci* biotipo 3/sierotipo 3
 - enterite



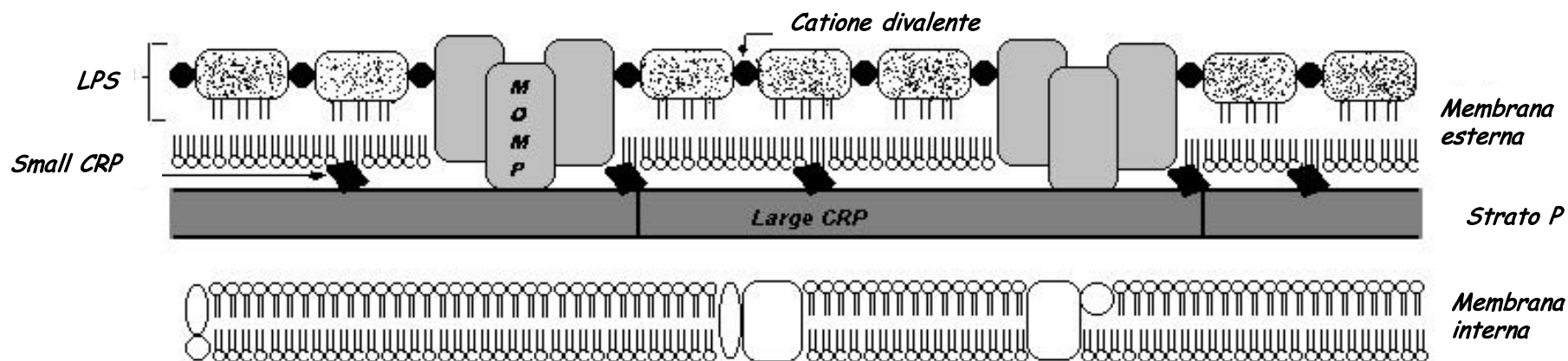
SPETTRO D'OSPITE

- *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 (Marrey et al., 2003)
- *Chlamydophila caviae*
 - cavia
- *Chlamydophila abortus*
 - **ovi-caprini**, mammiferi (uomo)



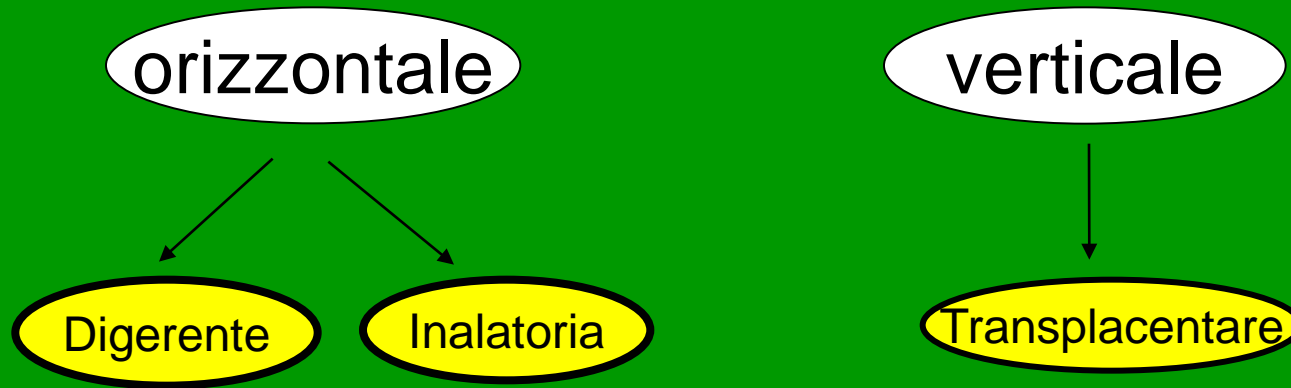
Caratteristiche delle chlamydie/chlamydophile

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



EPIDEMIOLOGIA DI *C. ABORTUS*

- Vie di trasmissione:



- Pecore non gravide e **agnelle**
- Dopo il 90° giorno di **gravidanza**
- Oltre il 120° giorno di **gravidanza**



PATOGENESI dopo il 90° gg



Dopo il 120° gg



- Aborto tardivo
- natimortalità
- nascita di agnelli deboli e disvitali



DIAGNOSI

- Anamnesi
 - Clinica
 - Laboratorio
- sospetto
- certezza
- 
- ```
graph LR; A[Anamnesi] --- B{ }; C[Clinica] --- B; B --- D[sospetto]; E[Laboratorio] --> F[certezza]
```



# Diagnosi differenziale

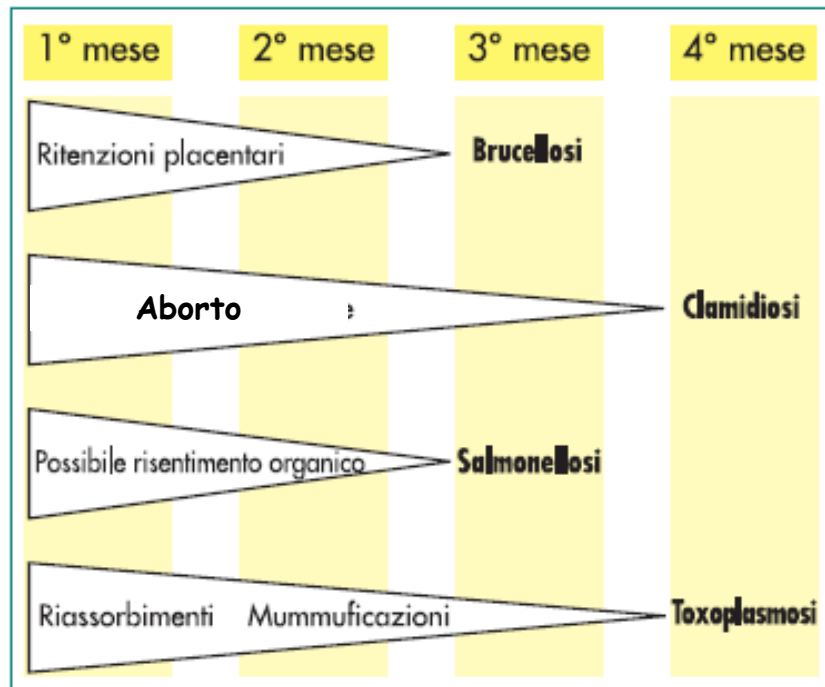
**Brucellosi**

**Toxoplasmosi**

**Salmonellosi**

(Listeriosi, febbre Q,  
agalassia, border  
disease)

## *Cronologia degli aborti*



*Antenucci e Ermini (Internews, 3, 2005)*



# La diagnosi di laboratorio dell'Aborto Enzootico Ovino

Essenziale per:

- ✓ Giungere a una diagnosi di certezza
- ✓ Escludere altri agenti abortigeni (*Salmonella spp.*, *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Toxoplasma*, *Rickettsia spp.*, *Coxiella spp.*)
- ✓ Individuare gli animali con infezione asintomatica



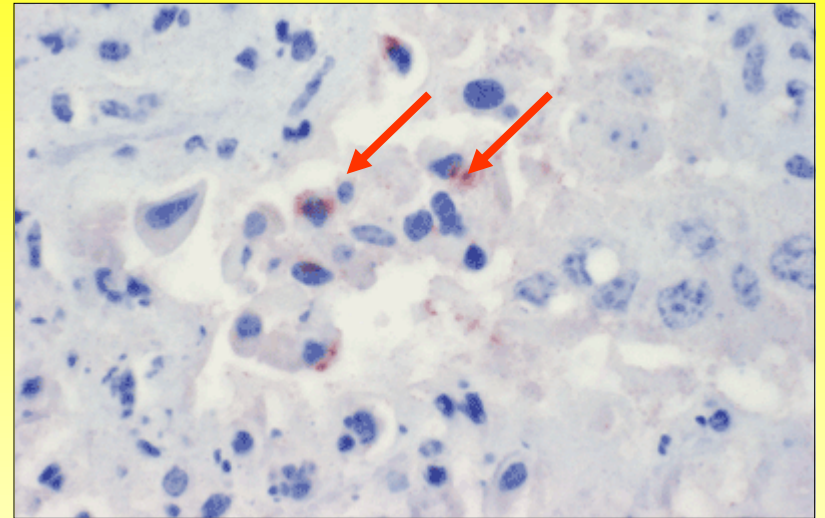
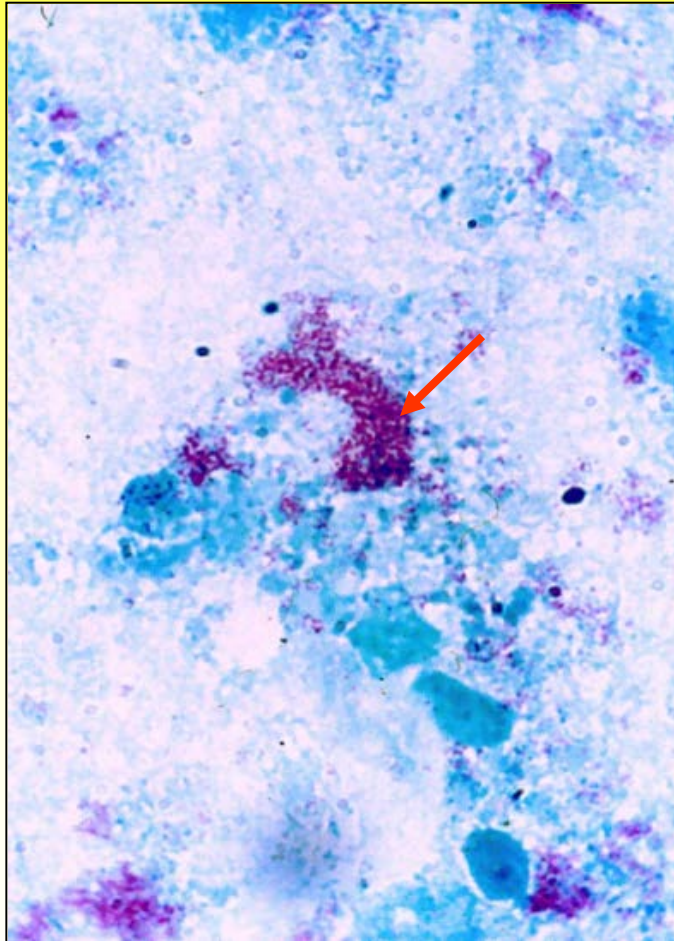
# Identificazione dell'antigene

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

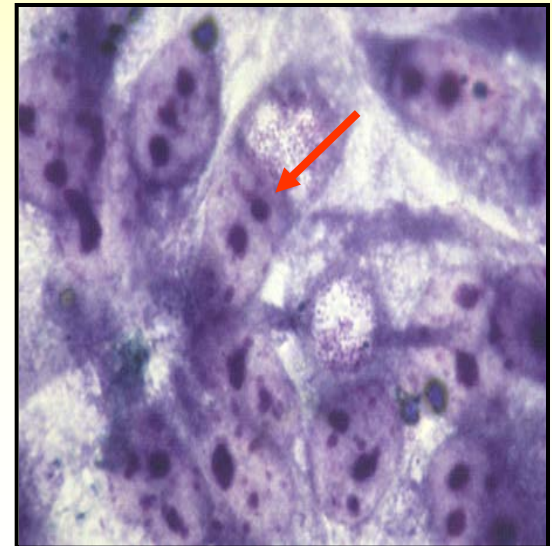


# Immunoistochimica

## Ziehl-Neelsen



## Giemsa



# Isolamento dell'agente

## Uova embrionate di pollo:

- ✓ Placente, tamponi vaginali, feti
- ✓ *Inoculum* nel sacco vitellino
- ✓ Morte tra il 4° e il 13° giorno PI
- ✓ Edema della membrana corionallantoidea e *pocks*

## Colture cellulari:

- ✓ Placente, tamponi vaginali, feti
- ✓ *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**





# Amplificazione del DNA mediante PCR

## Sequenze bersaglio:

- ✓ *Momp*
- ✓ *16S e 23S*
- ✓ *Pmp*

## Campioni:

- ✓ Placente
- ✓ Feti
- ✓ Tamponi vaginali

Identificazione di specie mediante tecniche di RFLP,  
Southern ibridazione



# Tests sierologici

- ✓ Fissazione del Complemento (LPS, animali vaccinati, cross-reazioni *C. pecorum* e *Acynetobacter sp.*)
- ✓ Immunofluorescenza
- ✓ ELISA:
  - Corpi Elementari (CHEKIT- ELISA, AG-IDEXX)
  - Antigene ricombinante *PMP90* (Institute Pourquoi, Montpellier)



# Scopo della ricerca

Allestire una reazione di PCR-RFLP da tamponi vaginali in grado di differenziare i ceppi di *Chlamydophila abortus* nei ruminanti nella diagnosi di Aborto Enzootico Ovino



# Materiali e Metodi: Campioni


44 tamponi vaginali e due aborti prelevati da 9 allevamenti ovini tra Aprile e Settembre 2003


| Gregge   | Numero animali | Animali vaccinati per <i>C. abortus</i> | Sintom | Tamponi vaginali prelevati | Aborti e/o invogli fetali prelevati |
|----------|----------------|-----------------------------------------|--------|----------------------------|-------------------------------------|
| <b>A</b> | 150            | No                                      | No     | 10                         | -                                   |
| <b>B</b> | 150            | No                                      | No     | 8                          | -                                   |
| <b>C</b> | 150            | No                                      | Aborto | 4                          | -                                   |
| <b>D</b> | 150            | No                                      | Aborto | 1                          | -                                   |
| <b>E</b> | 150            | No                                      | Aborto | 1                          | -                                   |
| <b>F</b> | 450            | No                                      | Aborto | 6                          | -                                   |
| <b>G</b> | 700            | No                                      | Aborto | 6                          | 1                                   |
| <b>H</b> | 180            | No                                      | Aborto | 4                          | 1                                   |
| <b>I</b> | -              | No                                      | Aborto | 4                          | -                                   |



# Materiali e Metodi

## Estrazione degli acidi nucleici

Tamponi vaginali  QIAamp Ultrasens Virus Kit (*Qiagen, Germania*)

Aborti  Dneasy Tissue Kit (*Qiagen, Germania*)



# Materiali e Metodi

## Sequenza bersaglio

✓ Frammento di 587 bp del gene *Omp2* che codifica per una proteina strutturale ricca di cisteina dal peso molecolare di 60 kDa

✓ Primers:

Forward: Ch1a AF

5'-ATG TCC AAA CTC ATC AGA CGA G-3'

Reverse: Ch1a AR

5'-CCT TCT TTA AGA GGT TTT ACC CA-3'



# Materiali e Metodi

## PCR-RFLP

- ✓ Enzima *AluI* (Biolabs, Inghilterra)
- ✓ Sito di restrizione: **AGCT**
- ✓ 37°C per 2 ore
- ✓ Mix di reazione:

- 10 µl di amplificato
- 1 µl di enzima
- 2 µl di Buffer 1X
- 7 µl acqua distillata sterile

| Specie                              | Lunghezza del frammento (bp) |
|-------------------------------------|------------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i>        | 158, 119, 114, 84, 77        |
| <i>Chlamydia muridarum</i>          | 216, 117, 97, 77, 26, 22, 5  |
| <i>Chlamydia suis</i>               | 339, 119, 77, 36, 5          |
| <u><i>Chlamydophila abortus</i></u> | <u>352, 235</u>              |
| <i>Chlamydophila psittaci</i>       | 227, 220, 140                |
| <i>Chlamydophila caviae</i>         | 355, 140, 105                |
| <i>Chlamydophila felis</i>          | 224, 142, 93, 85, 47, 46     |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i>     | 444, 127                     |
| <i>Chlamydophila pecorum</i>        | 397, 193                     |



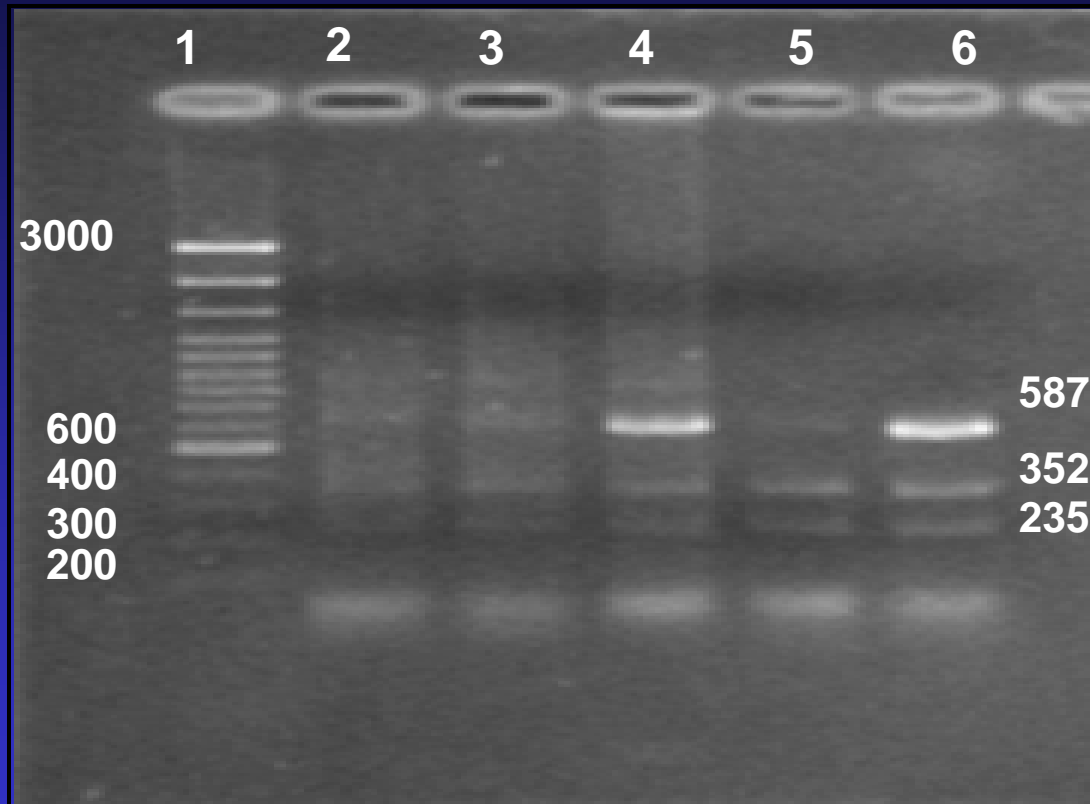
# Risultati PCR

| <i>Gregge</i> | Tamponi vaginali esaminati | Tamponi vaginali positivi | Aborti e/o invogli fetali esaminati | Aborti e/o invogli fetali positivi |
|---------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>A</b>      | 10                         | 0                         | -                                   | -                                  |
| <b>B</b>      | 8                          | 0                         | -                                   | -                                  |
| <b>C</b>      | 4                          | 0                         | -                                   | -                                  |
| <b>D</b>      | 1                          | 0                         | -                                   | -                                  |
| <b>E</b>      | 1                          | 0                         | -                                   | -                                  |
| <b>F</b>      | 6                          | 2                         | -                                   | -                                  |
| <b>G</b>      | 6                          | 1                         | 1                                   | 0                                  |
| <b>H</b>      | 4                          | 0                         | 1                                   | 0                                  |
| <b>I</b>      | 4                          | 1                         | -                                   | -                                  |





# Risultati PCR-RFLP



# Risultati

- ✓ Diagnosi molecolare come valida alternativa alle tecniche più tradizionali
- ✓ Diagnosi rapida e precoce
- ✓ Caratterizzazione della specie di appartenenza dei ceppi chlamydiali individuati



# Risultati

- ✓ Possibilità di utilizzare i tamponi vaginali
- ✓ **Maggiore sicurezza per gli operatori**
- ✓ Quantità modeste di materiale biologico
- ✓ Possibilità di individuare animali con infezione asintomatica e eliminatori



# TERAPIA

A brown goat is shown in profile, facing right, wearing a light pink protective garment that covers its back and neck. The goat is standing in a metal cage with straw bedding. The word "TERAPIA" is written in large, yellow, bold letters at the top of the image.

- Oxitetraciclina long-acting 20mg/Kg IM (Ad intervalli di due settimane fino al termine della gravidanza)
- Il trattamento spesso risulta inefficace negli animali gravemente infetti
- Può essere utile per il trattamento degli animali eliminatori asintomatici

# PROFILASSI

Vaccino inattivato (Mydiovac)

Vaccino attenuato termosensibile  
(ceppo AB7, Variante 1B) (INRA, Nouzilly)  
(Enzovax, Tecvax Chlamidia)



# CONCLUSIONI

L'aborto enzootico ovino continua ad essere una patologia importante degli allevamenti ovini

La diagnosi clinica di questa malattia risulta difficile dal momento che i sintomi clinici e anatomopatologici non sono specifici per l'infezione da *Chlamydophila abortus*

## Per una corretta profilassi:

- necessario l'ausilio del laboratorio mediante l'impiego delle tecniche di biologia molecolare e sierologiche
- importanza della vaccinazione
- allestimento di prodotti vaccinali alternativi che permettano di differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati

