



LA NOSTRA  
ESPERIENZA,  
LA VOSTRA  
**SICUREZZA.**



# Clamidiosi aviare

*Approcci diagnostici ed emergenze sanitarie  
delle specie avicole e del coniglio da carne e d'affezione*

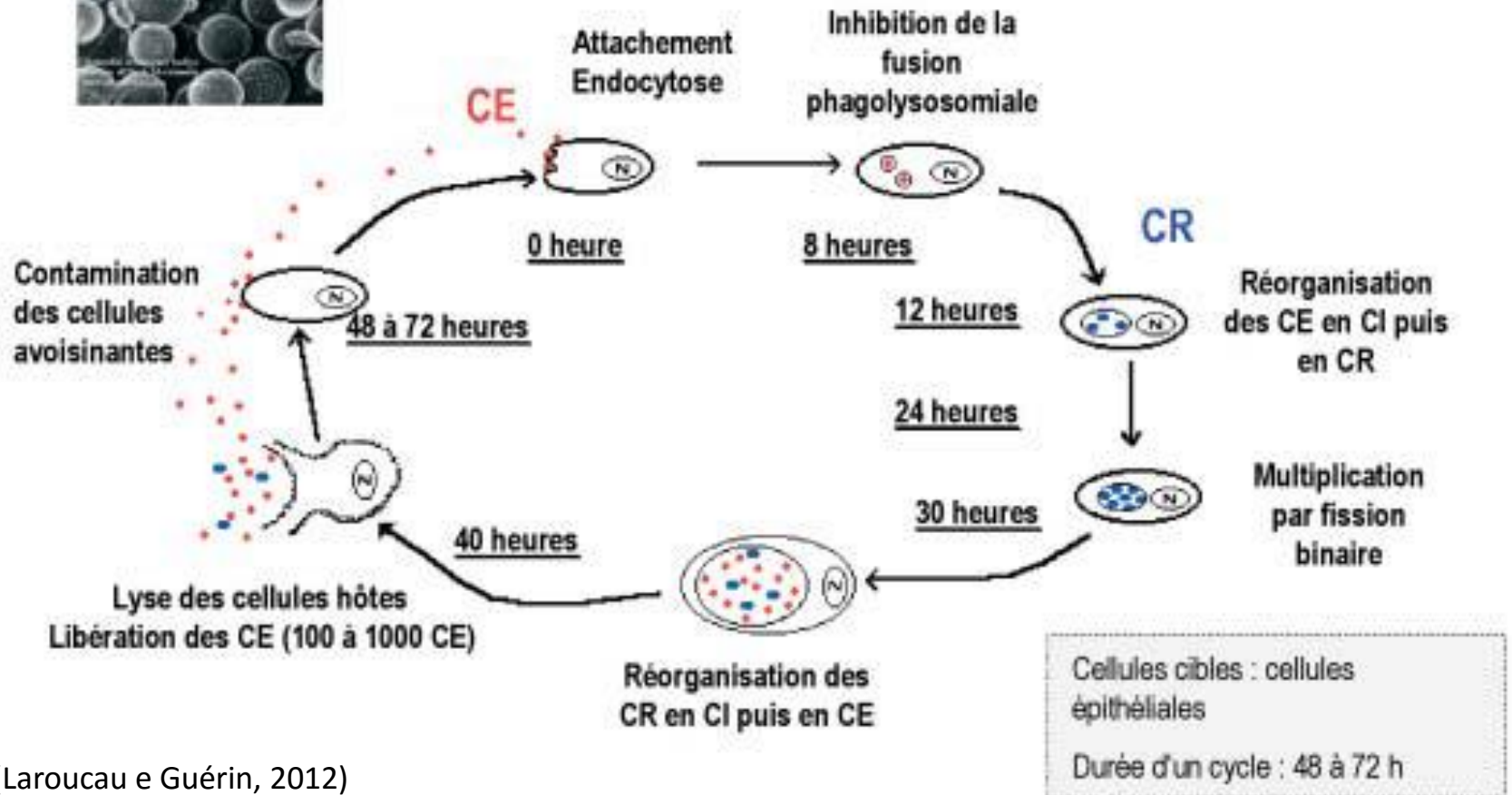
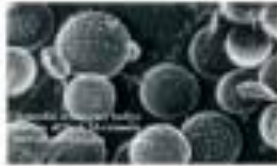
**22.02.2018**  
**Grugliasco (TO)**



# Ciclo vitale delle clamidie



Batteri Gram-negativi intracellulari a ciclo bifasico  
(corpi elementari extracellulari / corpi reticolari intracellulari)





# Il genere *Chlamydia*



Specie	Principali ospiti
<i>C. trachomatis</i>	uomo
<i>C. muridarum</i>	topo, criceto
<i>C. suis</i>	suino
<i>C. psittaci</i>	uccelli, uomo
<i>C. abortus</i>	ruminanti, suino, cavallo, uomo
<i>C. pecorum</i>	ruminanti, suino, koala
<i>C. pneumoniae</i>	uomo, koala, cavallo, rettili
<i>C. caviae</i>	cavia
<i>C. felis</i>	gatto
<i>C. gallinacea</i>	uccelli
<i>C. avium</i>	uccelli

candidatus *Chlamydia ibidis*      ibis sacro

candidatus *Chlamydia corallus*      rettili

candidatus *Chlamydia sonzini*      serpenti

■ agente di zoonosi





# Eziologia della clamidiosi aviare

Fino al 2014 attribuita alla sola specie *Chlamydia psittaci*

Nel 2014 sono descritte **due nuove specie** di clamidie aviari

Systematic and Applied Microbiology 37 (2014) 79–88

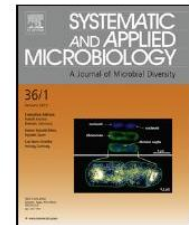


ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.de/syapm](http://www.elsevier.de/syapm)



Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov.



Konrad Sachse<sup>a,\*</sup>, Karine Laroucau<sup>b,1</sup>, Konstantin Riege<sup>c</sup>, Stefanie Wehner<sup>c</sup>, Meik Dilcher<sup>d</sup>, Heather Huot Creasy<sup>e</sup>, Manfred Weidmann<sup>d</sup>, Garry Myers<sup>e,g</sup>, Fabien Vorimore<sup>b</sup>, Nadia Vicari<sup>f</sup>, Simone Magnino<sup>f</sup>, Elisabeth Liebler-Tenorio<sup>a</sup>, Anke Ruetzger<sup>a</sup>, Patrik M. Bavoil<sup>g</sup>, Frank T. Hufert<sup>d</sup>, Ramon Rosselló-Móra<sup>h</sup>, Manja Marz<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany

<sup>b</sup> University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup> Faculty of Mathematics and Computer Science, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany

<sup>d</sup> Department of Virology, Universitätsmedizin Göttingen, Germany

<sup>e</sup> Institute for Genome Sciences & Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

<sup>f</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione Diagnostica di Pavia, Pavia, Italy

<sup>g</sup> Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

<sup>h</sup> Institut Mediterrani d'Estudis Avançats, Esporles, Illes Balears, Spain



# Eziologia della clamidiosi aviare

Gli isolati di *C. psittaci* sono classificati in **sierotipi** e **genotipi** con preferenza di famiglie/specie animali ospiti

## Principali ospiti dei **sierotipi**

A – pappagalli	B – piccione, tortore	C – anatra, tacchino, starna, oca
D – tacchino, gabbiano, pappagallo	E – anatra, piccione, struzzo, nandù	F – pappagallo
M56 – topo muschiato	WC - bovino	

## Principali ospiti dei **genotipi** (basati sul gene *ompA*)

A – pappagallo	B – tacchino, piccione, tortora	C – oca, anatra
D – tacchino	E – piccione, tacchino	F – pappagallo, tacchino
E/B – piccione, anatra	M56 – topo muschiato	WC - bovino
1V - corvidi	G1 – cigno, alzavola, folaga	G2 – cigno, germano
6N – corvo comune	Mat116 – ara macao	R54 – stercoreario antartico
YP84 – amazone f.g.	CPX0308 – cicogna orientale	... ..



# Ospiti di *C. psittaci*



Almeno **467 specie di 30 ordini di uccelli** selvatici e domestici

- uccelli d'affezione      pappagalli, passeriformi, ecc.
- pollame      tacchini  
    anatre  
    oche  
    pollo  
    faraona
- selvaggina allevata      fagiano, struzzo, colino della Virginia
- uccelli sinantropi      piccioni, tortore
- avifauna selvatica      rapaci diurni e notturni  
    anatidi  
    limicoli  
    ecc.



# Epidemiologia della clamidiosi aviare

*C. psittaci* viene escretta con **secrezioni nasali e oculari, feci e polvere di piume** di uccelli infetti, può rimanere vitale nell'ambiente per diversi mesi, essere inalata da soggetti recettivi e indurre malattia

Situazioni di **sovraffollamento, stress** da trasporto, cambi di alimentazione e di ambiente, **infezioni concomitanti** possono attivare l'escrezione delle clamidie e determinare l'insorgenza di quadri clinici anche gravi

La trasmissione ad opera di **vettori** (acari, zecche, pidocchi e insetti pungitori) e la trasmissione **verticale** di *C. psittaci* appare molto meno rilevante



# Due aspetti importanti delle clamidiosi

Sono molto frequenti

- le **infezioni latenti**, con manifestazioni cliniche ricorrenti
- le **escrezioni intermittenti** di *C. psittaci* da parte di animali portatori asintomatici che sono serbatoio dell'infezione







# Resistenza di *C. psittaci*



*C. psittaci* è molto resistente all'essiccamento e resta infettante

- per 2 mesi nell'alimento
- fino a 8 mesi nella lettiera
- per 2-3 settimane sulla paglia e sulle superfici
- per più di 1 anno in carcasse infette di tacchino

La resistenza è favorita dalla presenza di detriti organici



# Patogenesi della clamidiosi aviare

L'infezione da *C. psittaci* induce

- **danni vascolari** —> essudazione sierofibrinosa e versamenti toracici e addominali, deposizione di fibrina sul pericardio, sui polmoni e su altri organi
- **flogosi** —> anche purulente, unite a emorragie e necrosi
- **reazioni proliferative** in alcuni organi (fegato, milza) —> epato-splenomegalia



# Lesioni riferibili a clamidiosi aviare

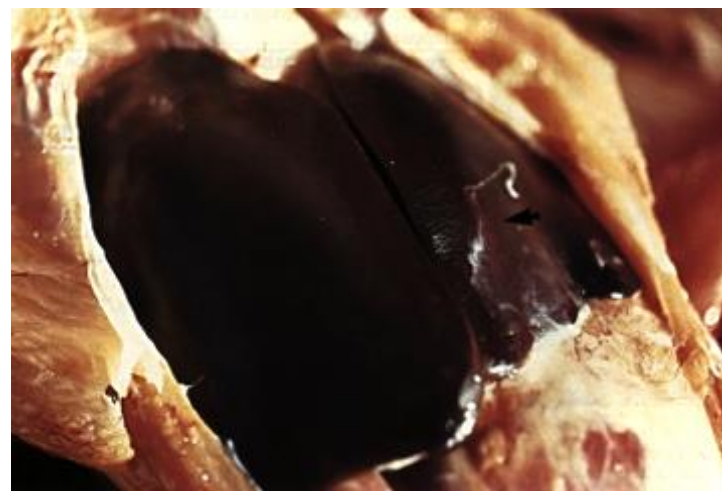
**N.B.: adottare cautele per l'esecuzione dell'esame necroscopico!  
È UNA ZONOSI !**



- lesioni simili in tutte le specie di volatili, a vari stadi di gravità a seconda della durata della malattia
- **epato-splenomegalia**, congestione, emorragie petecchiali e formazione di depositi superficiali di **essudato fibrinoso**, anche focolai necrotici



pericardite fibrinosa



periepatite fibrinosa



# Segni clinici



Incubazione da 3 giorni a diverse (2-8) settimane

Gravità da congiuntivite e patologie non gravi del tratto respiratorio superiore e apparato digerente fino a morte

Segni clinici sono NON specifici e talvolta lievi

- **letargia**, anoressia, arruffamento delle penne
- **congiuntivite, scolo oculare e/o nasale** o altri segni dovuti a patologie del tratto respiratorio superiore
- **diarrea** e segni di epatopatia (escrezione di urati verdi/giallo-verdi)
- possibili perdite riproduttive e morte neonatale nei volatili in riproduzione
- segni acuti o cronici e gravità dipendono dalla specie aviare, età, virulenza del ceppo, dose infettante, fattori stressanti e livello di trattamento o profilassi





# Controllo - terapia



- serve a contrastare e prevenire morbilità, mortalità e sopravvivenza delle clamidie nei tessuti
- le **tetracicline** sono il farmaco di scelta, ma le clamidie sono sensibili anche ai **macrolidi** (tilosina, eritromicina, azitromicina)
- tutti i farmaci hanno azione batteriostatica



# Controllo - vaccinazione



- Non è disponibile un vaccino per le clamidiosi aviari
- Diversi studi sono stati intrapresi per produrre vaccini innovativi (a subunità, DNA, ecc.) ma nessuno è finora arrivato alla fase di produzione e commercializzazione



# Eziologia della clamidiosi aviare

2014 – Descritte due *nuove* specie di clamidie aviari

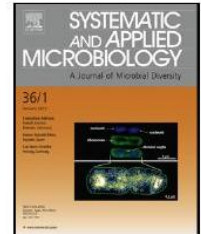
Systematic and Applied Microbiology 37 (2014) 79–88



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.de/syapm](http://www.elsevier.de/syapm)



Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov.



Konrad Sachse<sup>a,\*</sup>, Karine Laroucau<sup>b,1</sup>, Konstantin Riege<sup>c</sup>, Stefanie Wehner<sup>c</sup>, Meik Dilcher<sup>d</sup>, Heather Huot Creasy<sup>e</sup>, Manfred Weidmann<sup>d</sup>, Garry Myers<sup>e,g</sup>, Fabien Vorimore<sup>b</sup>, Nadia Vicari<sup>f</sup>, Simone Magnino<sup>f</sup>, Elisabeth Liebler-Tenorio<sup>a</sup>, Anke Ruetzger<sup>a</sup>, Patrik M. Bavoil<sup>g</sup>, Frank T. Hufert<sup>d</sup>, Ramon Rosselló-Móra<sup>h</sup>, Manja Marz<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany

<sup>b</sup> University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup> Faculty of Mathematics and Computer Science, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany

<sup>d</sup> Department of Virology, Universitätsmedizin Göttingen, Germany

<sup>e</sup> Institute for Genome Sciences & Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

<sup>f</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Sezione Diagnostica di Pavia, Pavia, Italy

<sup>g</sup> Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland, Baltimore, MD, USA

<sup>h</sup> Institut Mediterrani d'Estudis Avançats, Esporles, Illes Balears, Spain



# Eziologia della clamidiosi aviare

***C. avium***

pappagalli, piccioni

***C. gallinacea***

pollame (pollo, tacchino, faraona, anatra)

Specie	Sigla	Paese	Specie ospite	Sintomatologia
<i>C. avium</i>	10DC88	Germania	parrocchetto	enterite catarrale, epatosplenomegalia
<i>C. gallinacea</i>	08-1274/3	Francia	pollo	nessuna

- perlopiù infezioni inapparenti
- quadri clinici non gravi, ma con riflessi sulla produzione
- alta prevalenza di infezioni miste con *C. psittaci*
- possibili agenti di zoonosi ?





# Eziologia della clamidiosi aviare

## Altre specie di clamidie aviari

- candidato ***C. ibidis***
  - in tamponi cloacali di ibis sacro apparentemente sano ritrovato in Francia
- specie intermedia ***C. abortus* / *C. psittaci***
  - dal fegato di una poiana codarossa con malattia respiratoria e diarrea ritrovata in Louisiana, USA
- ***C. abortus*** – ceppi aviari
  - geneticamente differenti dai ceppi che infettano i ruminanti
  - finora rilevati solo nell'avifauna selvatica (2017)

## Altre clamidie raramente rinvenute in specie aviari

- ***C. pecorum***
- ***C. suis***



# Epidemiologia – *C. gallinacea*



- rilevata nel **pollame**, primi ritrovamenti in Germania e Francia
  - pollo, faraone, tacchini, anatre
- finora in 4 Paesi UE, Cina, Argentina, Nord America (2017)
- Cina: 12,4% di positività in tamponi orofaringei
- **14 biotipi** (lineaggi genetici distinti → diversa patogenicità?)
- **infezione persistente**
- l'infezione sperimentale **non induce segni di malattia**, ma riduzione dell'incremento ponderale
- Francia: preferenza per galline e faraone vs anatre
- Italia: rilevata in galline ovaiole
- **zoonosi sospettata** in macellatori con polmonite atipica (FR)



# *C. gallinacea* in Italia



Prima descrizione e isolamento di *C. gallinacea*  
(Natale e coll., 2015)

- allevamento di **galline ovaiole nel nord Italia**
- a 13 settimane: insorgenza di una **forma respiratoria con congiuntivite**
- a 18 settimane: scadimento dello stato generale, mortalità 2%
- a 36 settimane: 1-2% cecità a seguito di grave congiuntivite
- marcata **riduzione della produzione di uova** (88-90%)
- infezione concomitante con *M. gallisepticum* e *M. synoviae*
- congiuntivite, edema palpebrale e reattività della ghiandola
- rilievo con PCR di *C. gallinacea* da ghiandola di Harder, milza, fegato, polmoni
- isolamento di *C. gallinacea* in coltura cellulare



# *C. gallinacea* in Italia



- Rilevamento di *C. gallinacea* e *C. psittaci* (Rizzo e coll., 2017)
  - **studio di prevalenza** in aziende avicole del Piemonte  
ASL CN1 Cuneo – IZS PLV – CRN Clamidiosi
  - N aziende = 85 (galline, anatre, oche, tacchini)
  - tamponi faringei e cloacali

	Number of farms tested	Number of farms positive for <i>Chlamydiaceae</i> (prevalence)	Number of farms positive for <i>C. psittaci</i> (prevalence)	Number of farms positive for <i>C. gallinacea</i> (prevalence)
Chickens	34	11 (32.4%)	0	9 (26.5%)
Ducks	25	4 (16%)	1 (4%)	2 (8%)
Geese	17	6 (35.3%)	4 (23.6%)	3 (17.6%)
Turkeys	9	0	0	0
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>21 (25%)</b>	<b>5 (5.9%)</b>	<b>14 (16.5%)</b>





# Epidemiologia – *C. avium*



- ospiti: **piccioni, psittacidi**
- primi ritrovamenti in Italia, Francia, Germania
- prevalenza
  - in popolazioni di piccioni urbani: Germania 3%, Francia 8%
  - in allevamenti di piccioni: Germania 15%
  - pappagalli: sconosciuta (casi individuali)
- isolamento da tamponi cloacali, feci, visceri
- **infezione asintomatica** (piccione) o **enterite catarrale** (pappagallo)
- infezioni miste con *C. psittaci*
- potenziale zoonotico: sconosciuto



# *C. avium* in Italia



- Primo rilevamento di clamidie non riferibili a specie conosciute, poi rivelatesi *C. avium* (Vicari e coll., 2009)

First European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications  
Murcia, Spain  
June 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2009

---

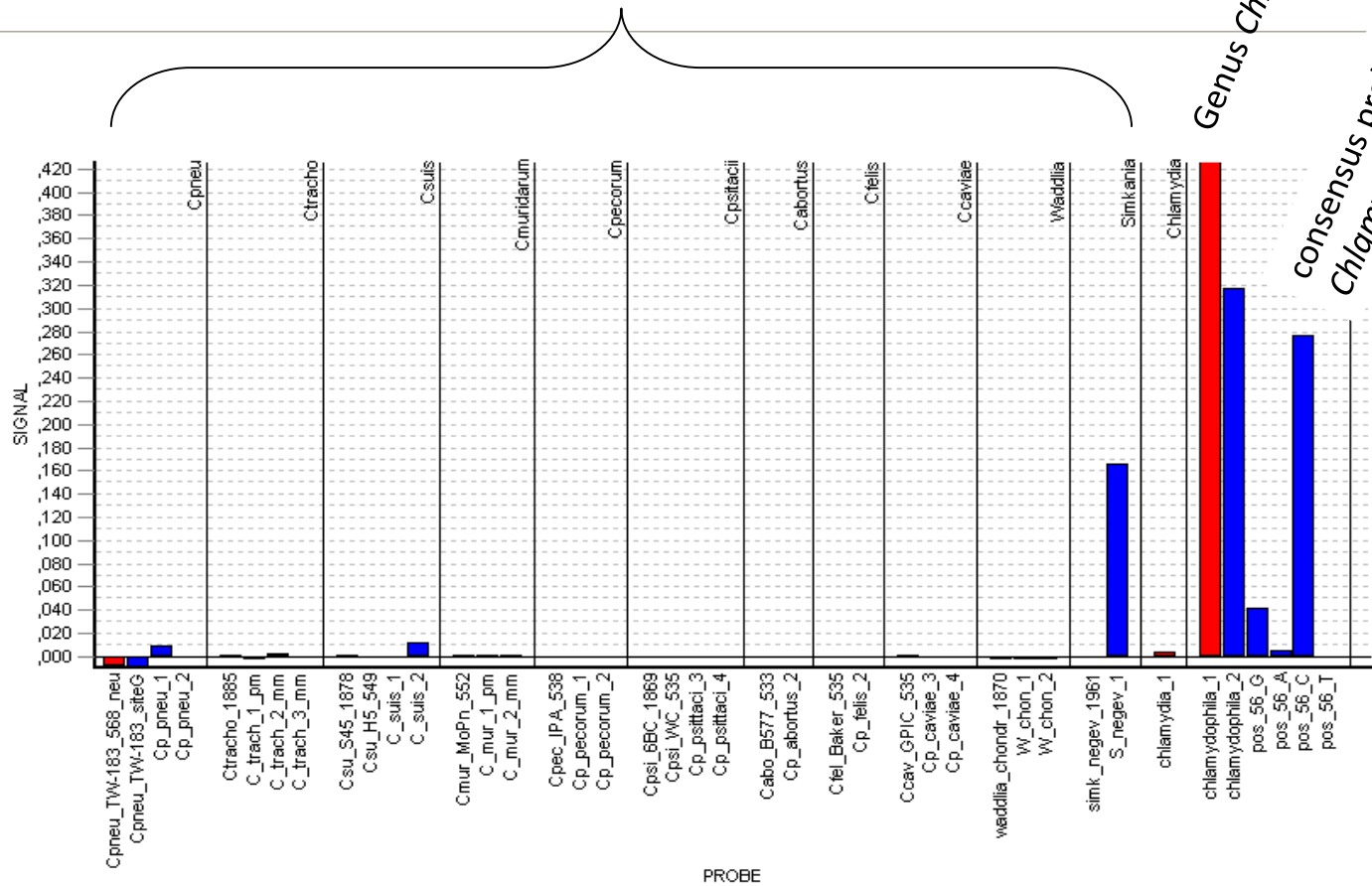
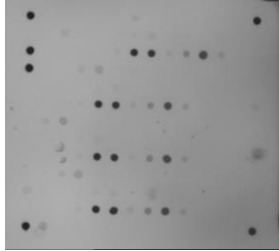
**Molecular analysis  
of four chlamydial isolates  
from the intestine and cloacal swabs  
of feral pigeons  
sampled in Milan and Ferrara, Italy**

---

N. Vicari, K. Laroucau, F. Vorimore, I. Barbieri,  
K. Sachse, H. Hotzel, I. Labalestra, S. Magnino

# ArrayTube testing of sample 2806/51

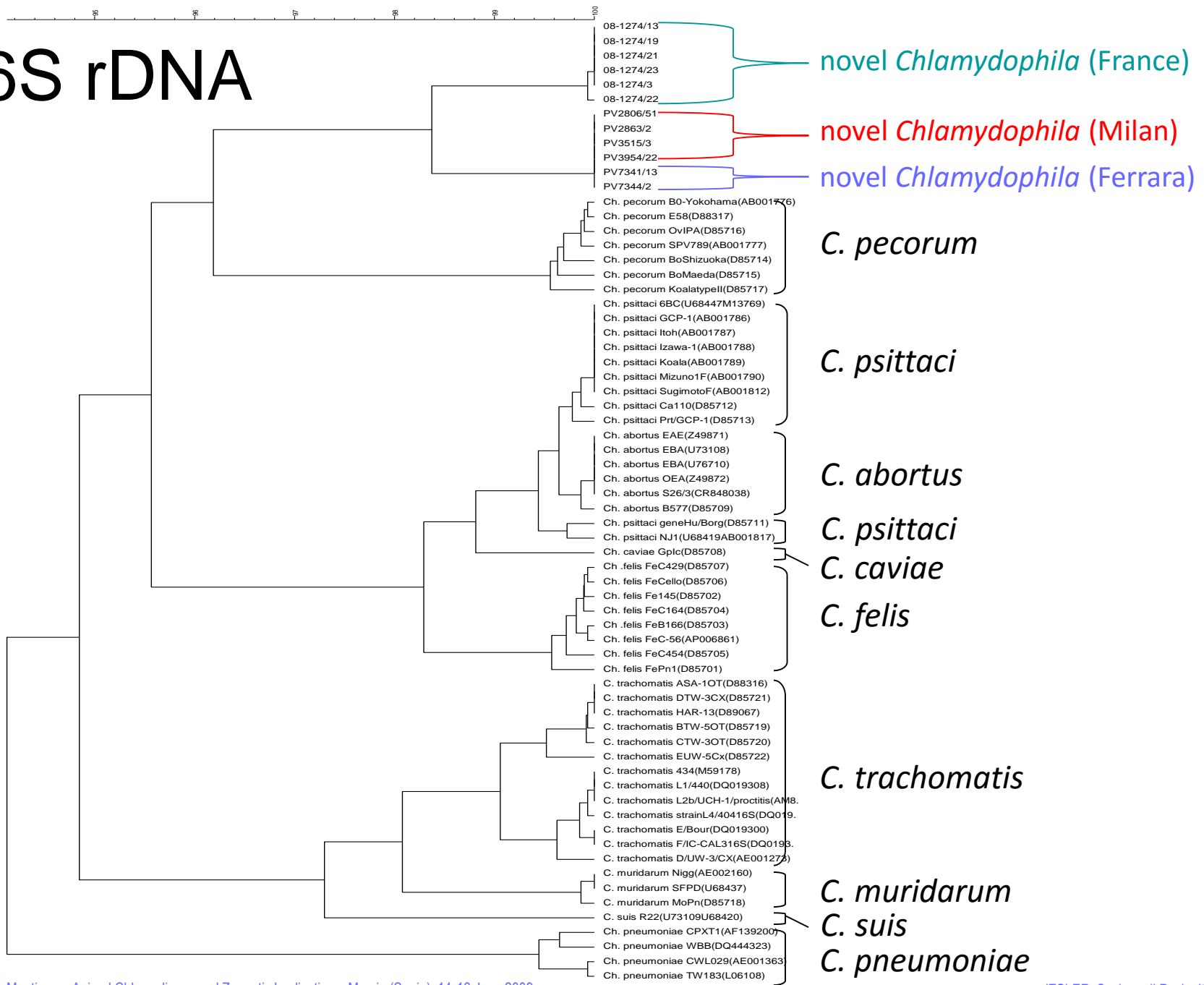
## Species-specific probes



Genus *Chlamydophila*  
*consensus probes*  
*Chlamydiaceae*

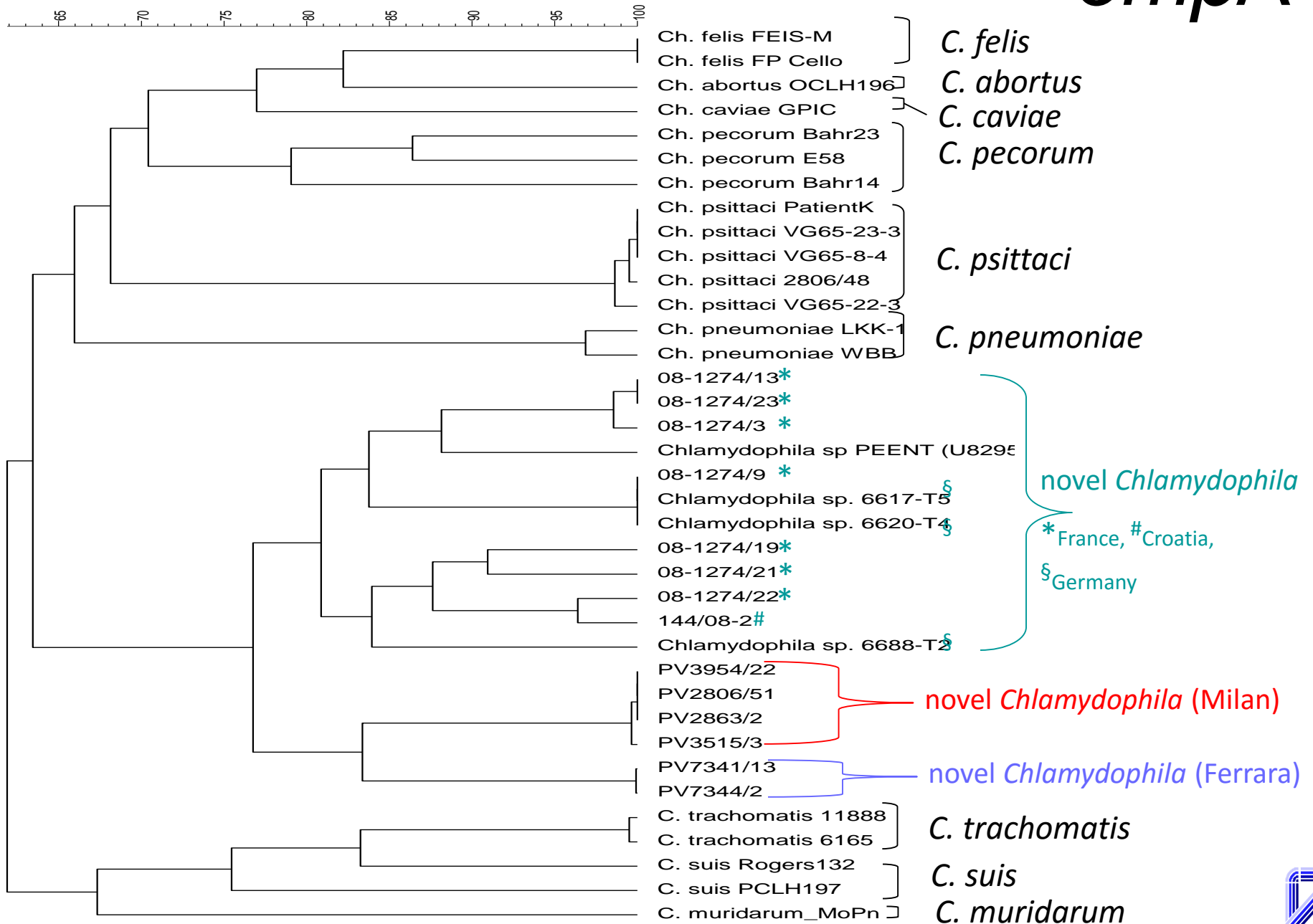


# 16S rDNA





# ompA





# Diagnosi



- la diagnosi può essere difficile in assenza di segni clinici
- se possibile, ricorrere a una combinazione di accertamenti (metodi molecolari, coltura, ricerca di anticorpi)
- consultare preventivamente il laboratorio per definire gli esami da eseguire e procedere a un corretto campionamento, prelievo e inoltro del materiale da esaminare



# Materiali da prelevare



- carcasse – organi: fegato, milza, polmone, essudati
- tamponi
  - dai distretti interessati da sintomatologia
  - cloacali, congiuntivali, coanali in assenza di segni clinici
- feci
  
- non utilizzare i comuni terreni di trasporto per batteri
- inviare il materiale al laboratorio in breve tempo in condizioni di refrigerazione, altrimenti congelare



# Compendium of measures (2017)

*Journal of Avian Medicine and Surgery* 31(3):262–282, 2017  
© 2017 by the Association of Avian Veterinarians

*Special Report*

## Compendium of Measures to Control *Chlamydia psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2017

Gary Balsamo, DVM, MPH&TM, Co-chair,<sup>a</sup>  
Angela M. Maxted, DVM, MS, PhD, Dipl ACVPM,<sup>a</sup>  
Joanne W. Midla, VMD, MPH, Dipl ACVPM,<sup>a</sup>  
Julia M. Murphy, DVM, MS, Dipl ACVPM, Co-chair,<sup>a</sup> Ron Wohrle, DVM,<sup>a</sup>  
Thomas M. Edling, DVM, MSpVM, MPH (Pet Industry Joint Advisory Council),<sup>b</sup>  
Pilar H. Fish, DVM (American Association of Zoo Veterinarians),<sup>b</sup>  
Keven Flammer, DVM, Dipl ABVP (Avian) (Association of Avian Veterinarians),<sup>b</sup>  
Denise Hyde, PharmD, RP,<sup>b</sup> Preeti K. Kutty, MD, MPH,<sup>b</sup>  
Miwako Kobayashi, MD, MPH,<sup>b</sup> Bettina Helm, DVM, MPH,<sup>b</sup>  
Brit Oulfsstad, DVM, MPH (Council of State and Territorial Epidemiologists),<sup>b</sup>  
Branson W. Ritchie, DVM, MS, PhD, Dipl ABVP, Dipl ECZM (Avian),<sup>b</sup>  
Mary Grace Stobierski, DVM, MPH, Dipl ACVPM (American Veterinary Medical Association Council on Public Health and Regulatory Veterinary Medicine),<sup>b</sup>  
Karen Ehnert, DVM, MPVM, Dipl ACVPM (American Veterinary Medical Association Council on Public Health and Regulatory Veterinary Medicine),<sup>b</sup>  
and Thomas N. Tully Jr, DVM, MS, Dipl ABVP (Avian), Dipl ECZM (Avian) (Association of Avian Veterinarians)<sup>b</sup>

On Behalf of the National Association of State Public Health Veterinarians *Chlamydia psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis) Compendium Committee and Committee Consultants, 2017.

From the Louisiana Office of Public Health, Infectious Disease Epidemiology Section, 1450 Poydras Street, Suite 1641, New Orleans, LA 70112, USA (Balsamo); New York State Department of Health, Bureau of Communicable Disease Control, 651 Coming Tower, Albany, NY 12237, USA (Maxted); United States Food and Drug Administration, Office of New Animal Drug Evaluation, 7500 Standish Place, Rockville, MD 20855, USA (Midla); Virginia Department of Health, Office of Epidemiology, 109 Governor Street, Madison Building, 4th Floor, Richmond, VA 23218, USA (Murphy); Washington State Department of Health, Zoonotic and Vector-borne Diseases Program, 243 Israel Rd, Tumwater, WA 98501, USA (Wohrle); Petco Animal Supplies Inc, 10850 Via Frontera, San Diego, CA 92127, USA (Edling); National Aviary, 700 Arch Street, Pittsburgh, PA 15212, USA (Fish); College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, 1040 William Moore Dr, Raleigh, NC 27607, USA (Flammer); The Eden Alternative, 1900 Clinton Ave, PO Box 18369, Rochester, NY 14618, USA (Hyde); Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE, MS A31, Atlanta, GA 30329, USA (Kutty); Division of Bacterial

Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE, MS C-25, Atlanta, GA 30329, USA (Kobayashi); US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service/Veterinary Services, Live Animal-Avian Imports, National Import Export Services, 4700 River Rd, Riverdale, MD 20737, USA (Helm); County of Los Angeles-Public Health, Acute Communicable Disease Control Program, 313 N Figueroa St, Rm 212, Los Angeles, CA 90012, USA (Oulfsstad); University of Georgia College of Veterinary Medicine, Infectious Disease Laboratory, 220 Riverbend Rd, Athens, GA 30602, USA (Ritchie); Michigan Department of Health and Human Services, 333 South Grand Ave, Lansing, MI 48909, USA (Stobierski); Los Angeles County Department of Public Health, 313 N Figueroa St, Rm 1127, Los Angeles, CA 90012, USA (Ehnert); Louisiana State University School of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Clinical Sciences, Skip Bertman Dr, Baton Rouge, LA 70803, USA (Tully). Present address (Midla) US Food and Drug Administration Center, Office of New Animal Drug Evaluation, Division of Generic Animal Drugs, 7500 Standish Place, Rockville, MD 20855, USA.

<sup>a</sup> Committee member.

<sup>b</sup> Consultant to the Committee.



# Compendium of measures (2017)

**Compendium of Measures to Control *Chlamydia psittaci*  
Infection Among Humans (Psittacosis) and  
Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2017**

<http://www.nasphv.org/Documents/PsittacosisCompendium.pdf>





# Esami di laboratorio



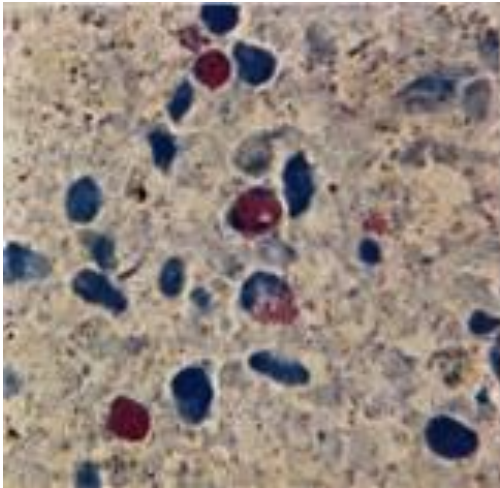
- esame di impronte di organi e tessuti (*in vivo e post mortem*)
  - **colorazioni** (Giemsa, Gimenez, Machiavello, Castaneda)
  - **immunofluorescenza** diretta
  - esame immunoistochimico

permette di avanzare una diagnosi presuntiva  
da confermare con metodiche molecolari o isolamento

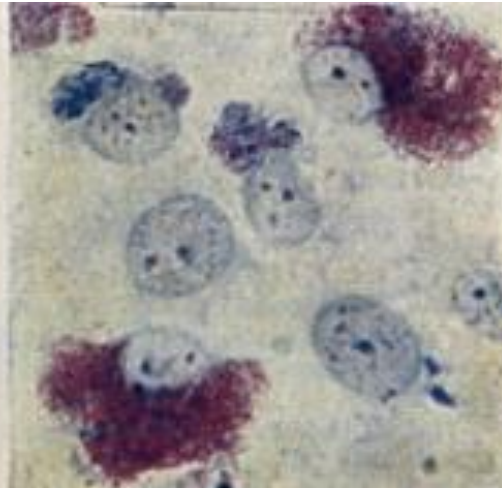


# Immagini di clamidie al microscopio

1



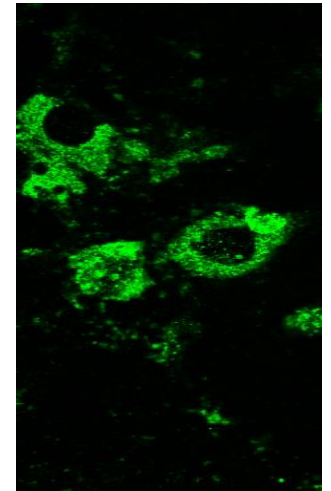
2



a



b



Colorazione di Machiavello

1 - impronta da placenta    2 - colture cellulari

(da Buxton e Fraser, 1977)

a) colorazione all' arancio acridina  
(microscopio a fluorescenza)

b) immunofluorescenza diretta



# Esami di laboratorio – isolamento di *C. psittaci*

- in **uova embrionate di pollo** o **colture cellulari** in **laboratori specializzati** per la complessità delle procedure
- da materiale fresco e mantenuto in uno **specifico terreno di trasporto SPG** ( $\neq$  da quello per batteri)
- campioni preferiti da animali morti
  - **fegato e milza** + altri organi interessati da lesioni
- campioni preferiti da animali vivi
  - **tamponi dalle sedi clinicamente affette**
  - **tamponi combinati da congiuntiva, coane e cloaca** in soggetti subclinici
  - **feci in pool**
  - feci da singolo soggetto: prelievi seriali per 3-5 giorni consecutivi e loro esame in pool



## Esami di laboratorio – rilevazione dell'antigene

- rilevano direttamente e rapidamente la clamidia anche non più vitale
- possono risultare falsamente positivi per reazioni crociate con altri antigeni
- possono risultare falsamente negativi se la quantità di antigene è insufficiente (l'escrezione delle clamidie è intermittente)
- il loro risultato va valutato considerando i segni clinici
- i test ELISA ancora disponibili non sono raccomandati
- i test che si basano su anticorpi fluorescenti hanno vantaggi e svantaggi simili ai test ELISA, possono esserci reazioni crociate tra anticorpi e antigeni non-clamidia



# Esami di laboratorio nel CRN

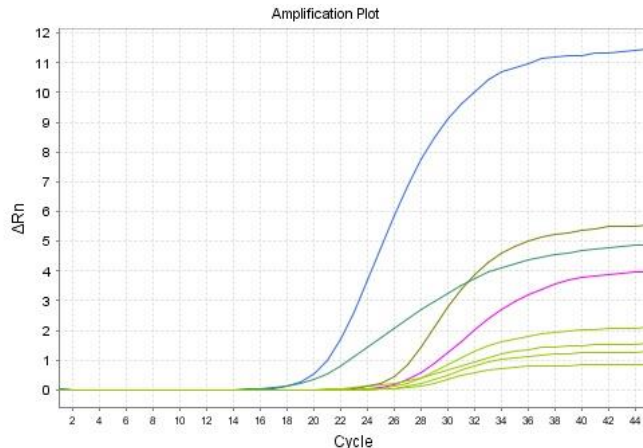


- Screening
  - PCR real-time (Ehricht e coll., 2006)
  - gene bersaglio che codifica rRNA 23S delle *Chlamydiaceae*
- Identificazione di specie
  - sonde specifiche per *C. psittaci*, *C. avium*, *C. gallinacea*
- Verifica (eventuale)
  - PCR *end-point*
  - gene bersaglio che codifica rRNA 16S delle *Chlamydiaceae*
  - sequenziamento nucleotidico





# PCR real-time



*C. avium*

*C. felis*

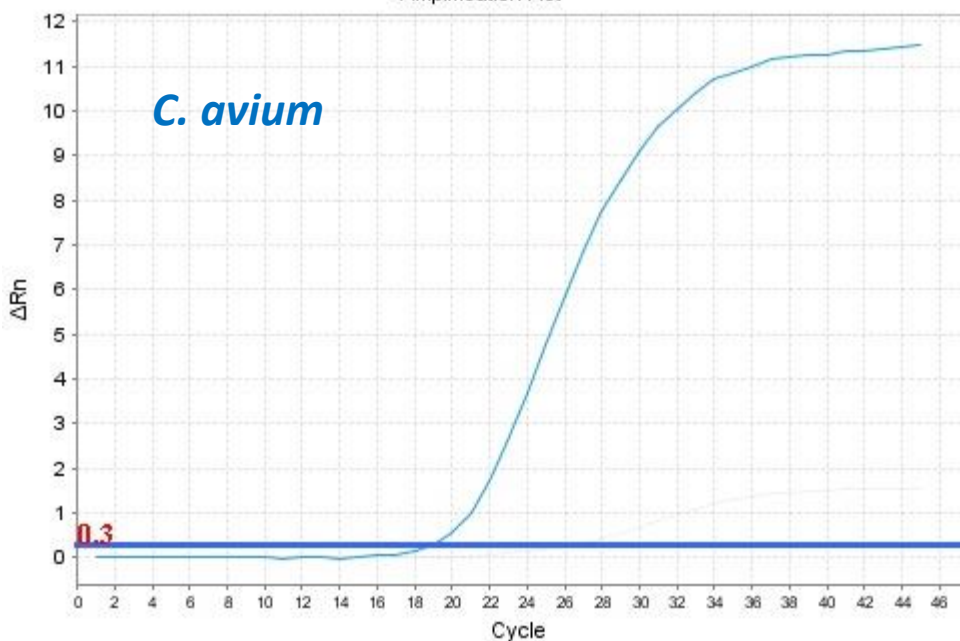
*C. psittaci*

*C. suis*

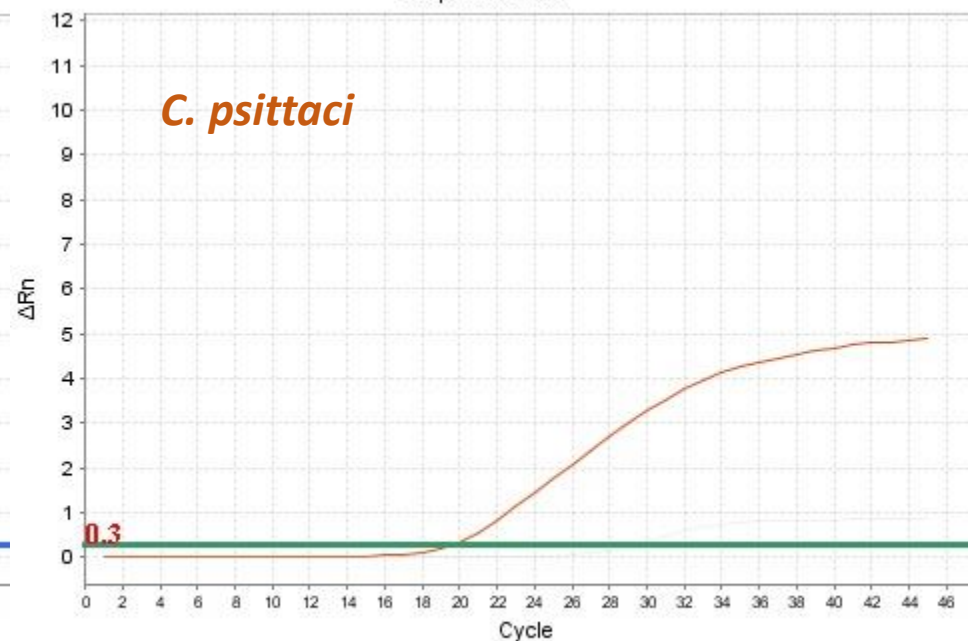
Controlli interni



Amplification Plot

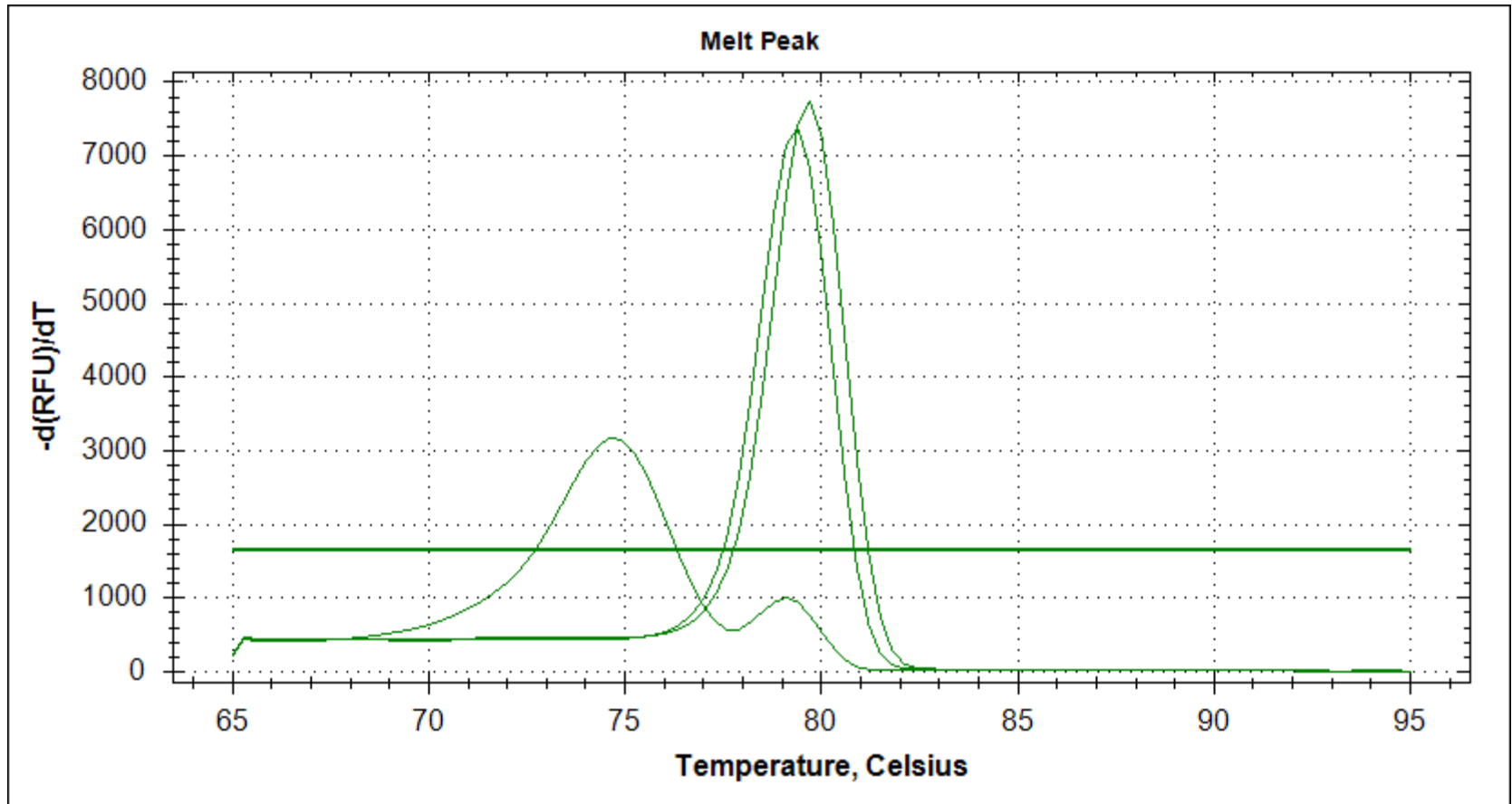


Amplification Plot





# High resolution melt (HRM) curve



1ª curva *C. gallinacea*

2ª curva *C. psittaci*

3ª curva *C. avium*



# Genotipizzazione di *C. psittaci*



- Restrizione del gene *ompA* (Sayada e coll., 1995)
  - classificazione in almeno 7 gruppi (A – F, E/B), in espansione...
  - amplificazione PCR del gene e restrizione con *AluI* e *MbolI*
- MLVA (Laroucau e coll., 2008)
  - classificazione in 20 pattern
- MLST (Pannekoek e coll., 2010)
  - classificazione in 12 genotipi (ST) e 4 gruppi
- Microarrays
- WGS



# Genotipizzazione di *C. psittaci*



## MLVA

*multiple loci variable number of tandem repeats (VNTR) analysis*

- metodo basato sull'**analisi di sequenze ripetute**, non collegate e sparse in tutto il genoma
- considera 8 loci
- permette la classificazione degli isolati in **20 pattern**
- **eseguibile direttamente** da DNA estratto da campioni clinici o di campo

### Limiti

- i genotipi E e B non risultano discriminabili
- il genotipo E/B risulta identico al genotipo C
- alcuni frammenti possono non venire amplificati





# Tipizzazione - MLVA



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Infection, Genetics  
and Evolution

Infection, Genetics and Evolution 8 (2008) 171–181

[www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

## High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA)

Karine Laroucau<sup>a,\*</sup>, Simon Thierry<sup>a</sup>, Fabien Vorimore<sup>a</sup>, Kinndle Blanco<sup>b</sup>, Erhard Kaleta<sup>b</sup>, Richard Hoop<sup>c</sup>, Simone Magnino<sup>d</sup>, Daisy Vanrompay<sup>e</sup>, Konrad Sachse<sup>f</sup>, Garry S.A. Myers<sup>g</sup>, Patrik M. Bavoil<sup>h</sup>, Gilles Vergnaud<sup>i,j</sup>, Christine Pourcel<sup>i</sup>

<sup>a</sup> Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency (AFSSA), 94706 Maisons-Alfort cedex, France

<sup>b</sup> Clinic for birds, reptiles, amphibian and fish, Frankfurter Strasse 91-93, 35392 Giessen, Germany

<sup>c</sup> University of Zurich, Institute of Veterinary Bacteriology, 8057 Zurich, Switzerland

<sup>d</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", National Reference Laboratory for Animal Chlamydioses, Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 61, 27100 Pavia, Italy

<sup>e</sup> University of Ghent, Department of Molecular Biotechnology, 9000 Ghent, Belgium

<sup>f</sup> Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Street 96a, 07743 Jena, Germany

<sup>g</sup> University of Maryland, Institute for Genome Sciences, Baltimore, MD, 21201 USA

<sup>h</sup> University of Maryland, Department of Biomedical Sciences, 650 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

<sup>i</sup> Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, 91405 Orsay, France

<sup>j</sup> Centre d'Etudes du Bouchet, Division de Microbiologie Analytique, 91710 Vert le Petit, France





# Tipizzazione - MLVA

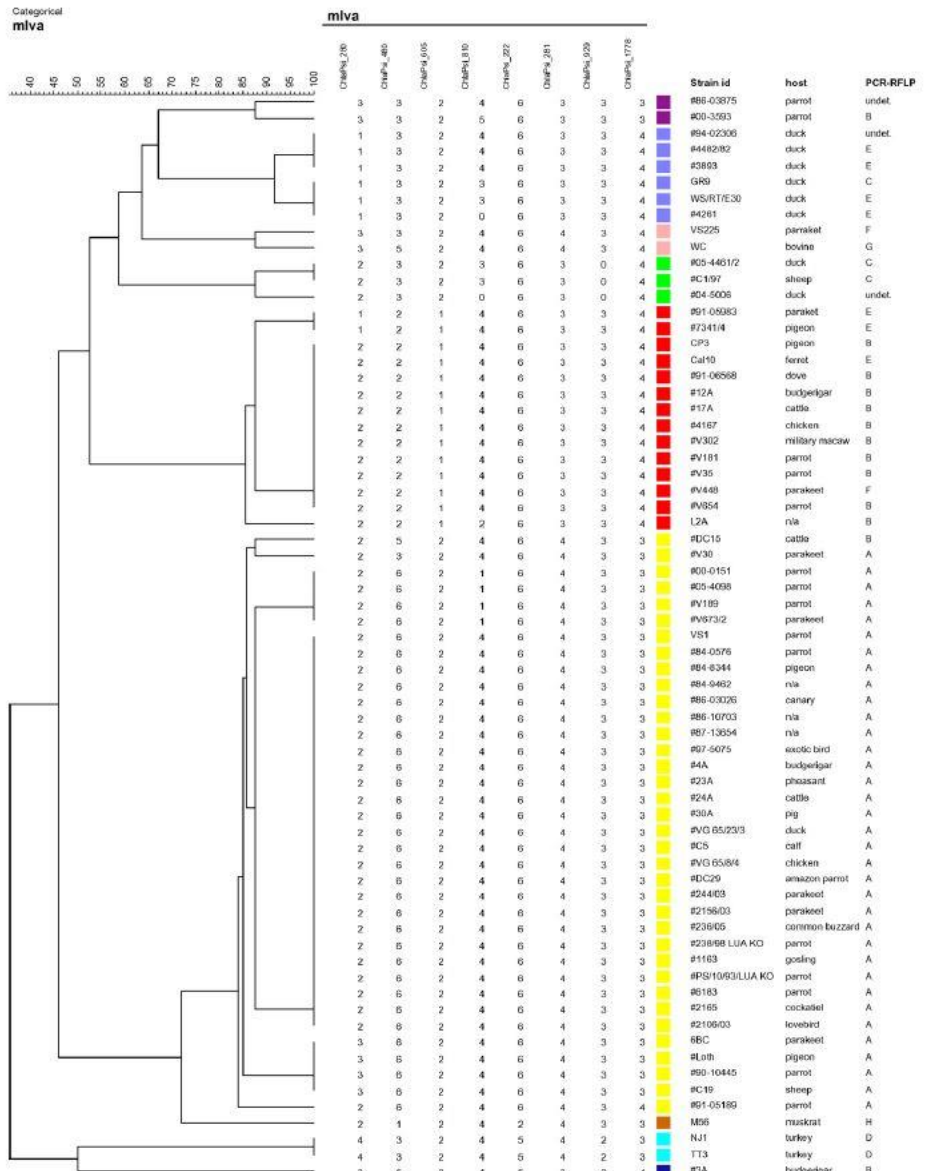
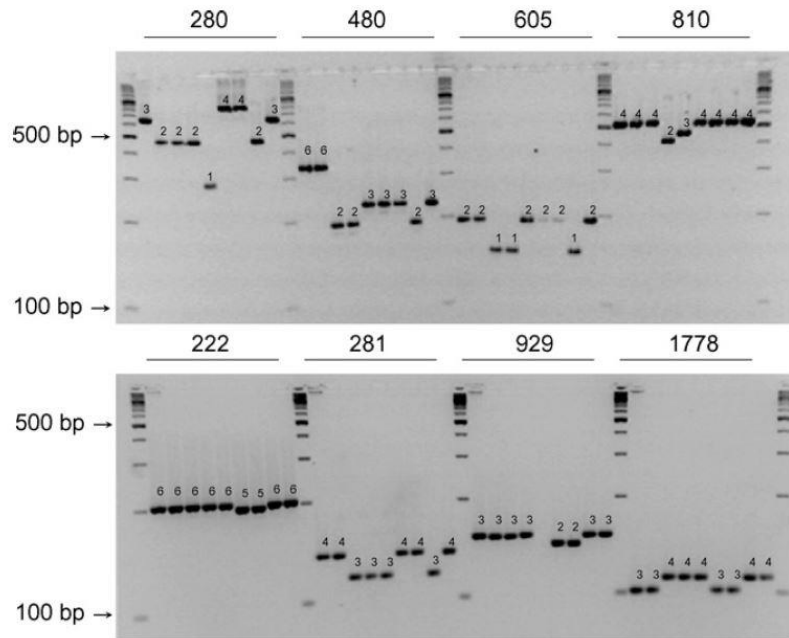


Fig. 2. Clustering analysis of 67 *C. psittaci* strains and isolates using markers ChlaPsi\_280, ChlaPsi\_480, ChlaPsi\_605, ChlaPsi\_810, ChlaPsi\_222, ChlaPsi\_281, ChlaPsi\_929 and ChlaPsi\_1778. Left to right: MLVA genotyping results with the 8 MLVA markers, strain identification, animal host and PCR-RFLP results (undet.: undetermined).

Fig. 1. PCR amplification of 8 VNTRs (ChlaPsi\_280, ChlaPsi\_480, ChlaPsi\_605, ChlaPsi\_810, ChlaPsi\_222, ChlaPsi\_281, ChlaPsi\_929 and ChlaPsi\_1778) using DNA from 9 reference *C. psittaci* strains (6BC, VS1, CP3, L2A, GR9, NJ1, TT3, Cal10, VS225) from the AFSSA strain collection. A 100 bp ladder (100–1000 bp) is run on both sides of each group of samples. The number of repeat units within each allele is indicated.



# Genotipizzazione di *C. psittaci*

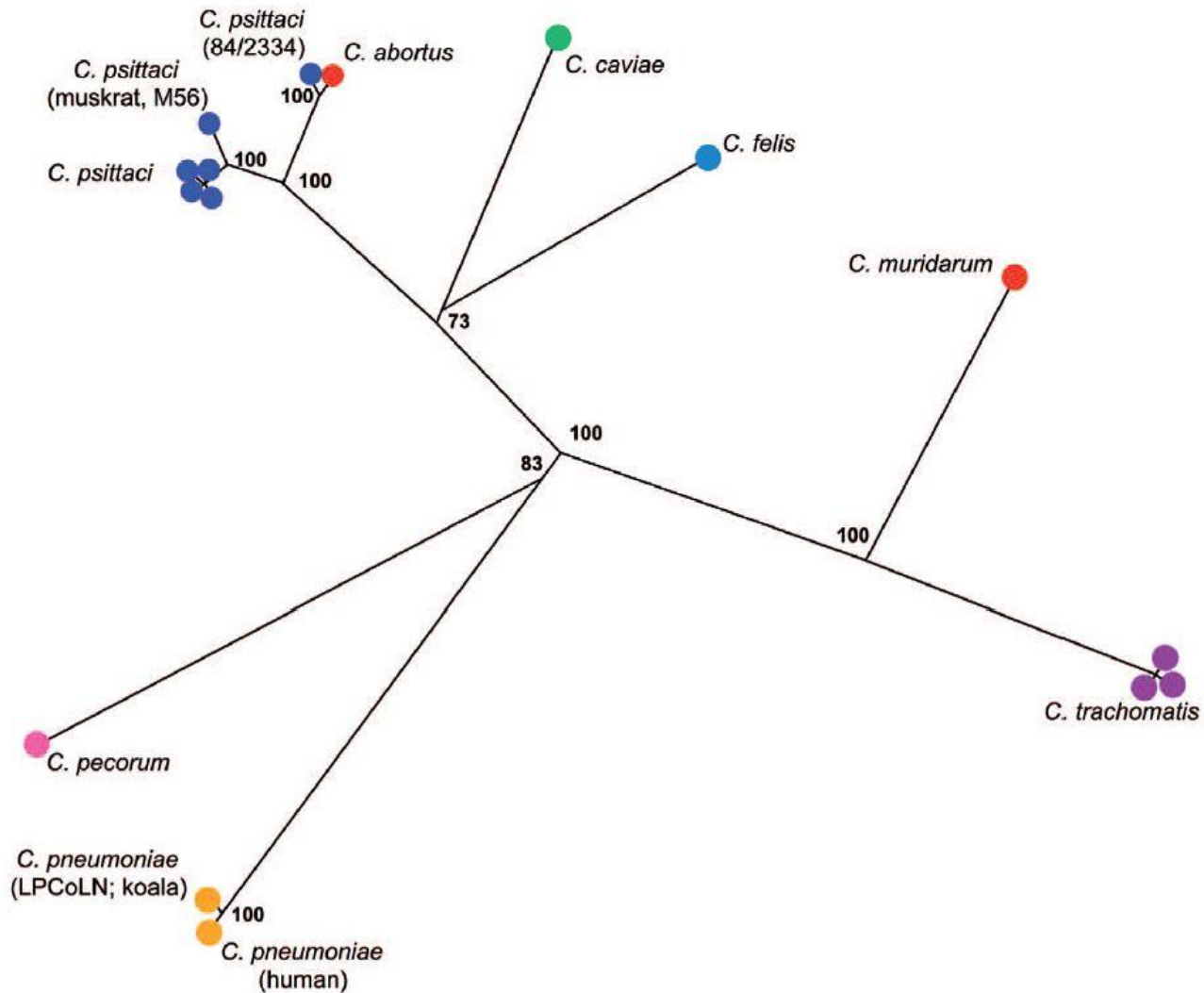
## MLST

*multi locus sequence typing*

- analisi di frammenti di 7 geni costitutivi
- 12 genotipi (ST, *sequence types*)
- **4 gruppi identificati**
  - pappagallo
  - anatra
  - piccione
  - tacchino
- il genotipo è **associato alla specie aviare** ma non alla provenienza geografica



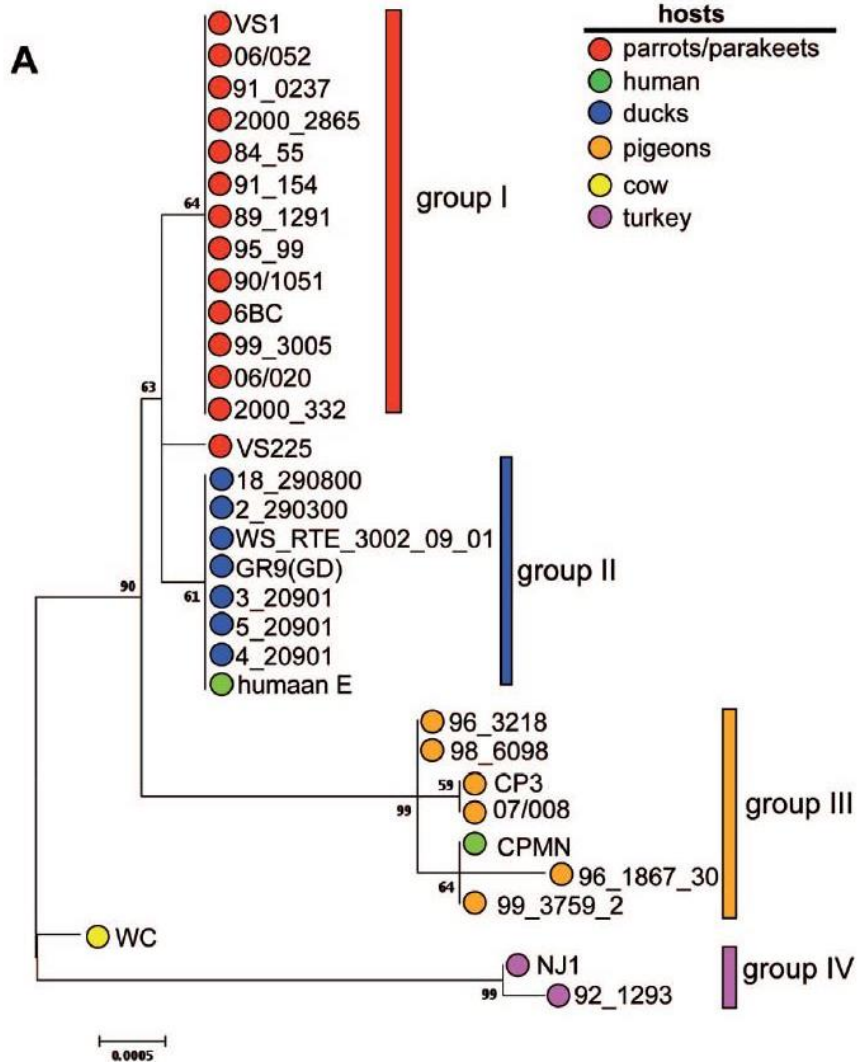
# Tipizzazione - MLST



**Figure 1. Phylogenetic analyses of concatenated sequences of 7 housekeeping gene fragments of *Chlamydia* strains.** Concatenated sequences were aligned and analysed in MEGA 4.0.2. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbour-Joining algorithm using Maximum Composite Likelihood model. Bootstrap test was for 1000 repetitions. Bold numbers indicate bootstrap values over 50% of the main branches. doi:10.1371/journal.pone.0014179.g001



# Tipizzazione - MLST



## 4 gruppi

- pappagallo
- anatra
- piccione
- tacchino

**Figure 3. Phylogenetic analyses of concatenated sequences of 7 housekeeping gene fragments of *C. psittaci* strains, excluding strain 84/2334 and M56.** Concatenated sequences were aligned and analysed in MEGA 4.0.2. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbour-Joining algorithm using Maximum Composite Likelihood model. Bootstrap test was for 5000 repetitions. Numbers indicate bootstrap values over 50%.

doi:10.1371/journal.pone.0014179.g003



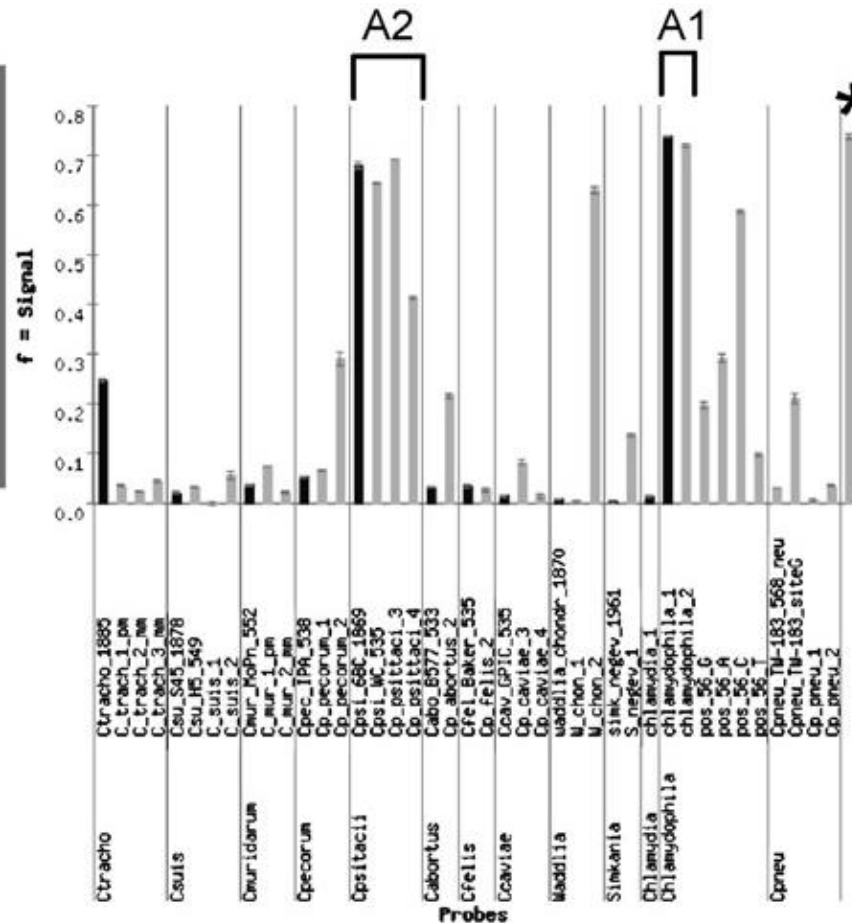
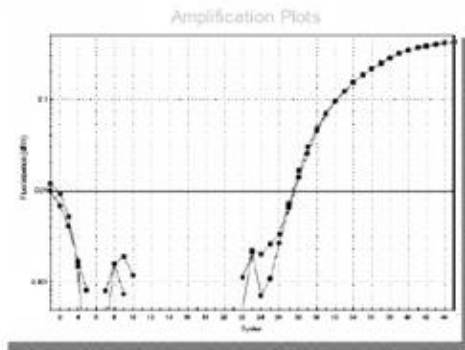
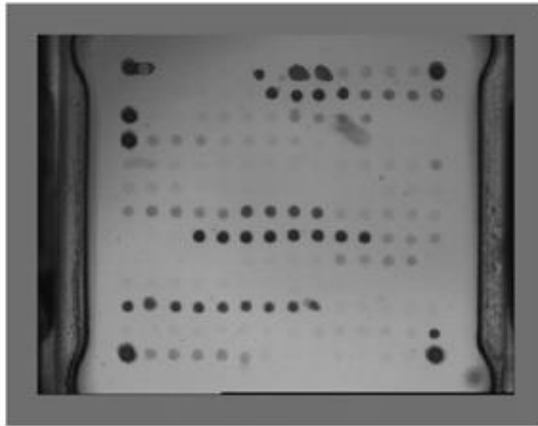


# Microarrays



Ibridazione dell'estratto del campione in esame con sonde disposte a reticolo su un chip

AA







# Sequenziamento genomico completo

Permette di comparare le intere sequenze genomiche di diversi isolati e **identificare le differenze**, in particolare:

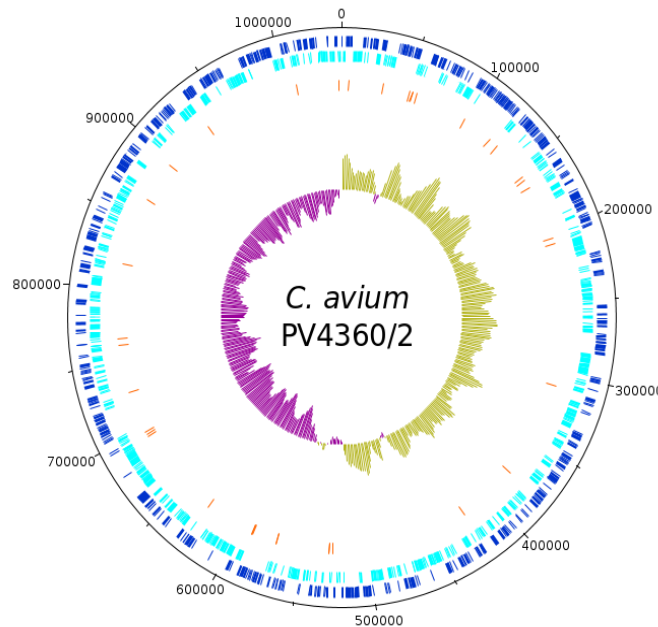
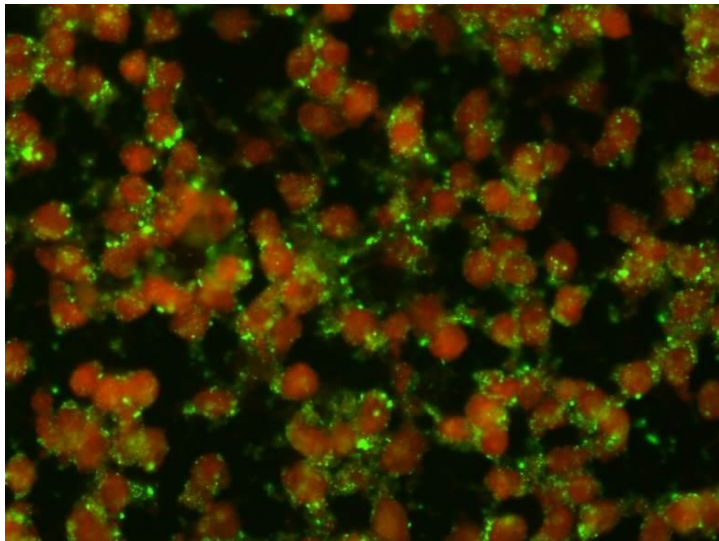
- geni associati a **patogenicità, virulenza, tropismo** di specie e d'organo
  - *pmp* – codificanti le *polymorphic membrane proteins* (PMPs)
  - '*plasticity zone*' – regione ipervariabile contenente fattori di virulenza (cytotoxin, MAC/perforin, phospholipase D enzymes)
- plasmidi
  - presenti in *C. psittaci*, *C. gallinacea*, *C. avium*



# Sequenziamento genomico completo

4<sup>th</sup> European Meeting on Animal Chlamydioses (EMAC-4)  
Zagreb (Croatia), 13-15 September 2017

## Whole genome sequencing of *C. avium* and *C. pecorum* isolates from Italy



Circular representations of *C. avium* PV 4360/2 genome.

From the outside in, the positions of protein-coding genes on the positive (dark blue) and negative (light blue) strands, tRNA and rRNA genes (orange) are represented.

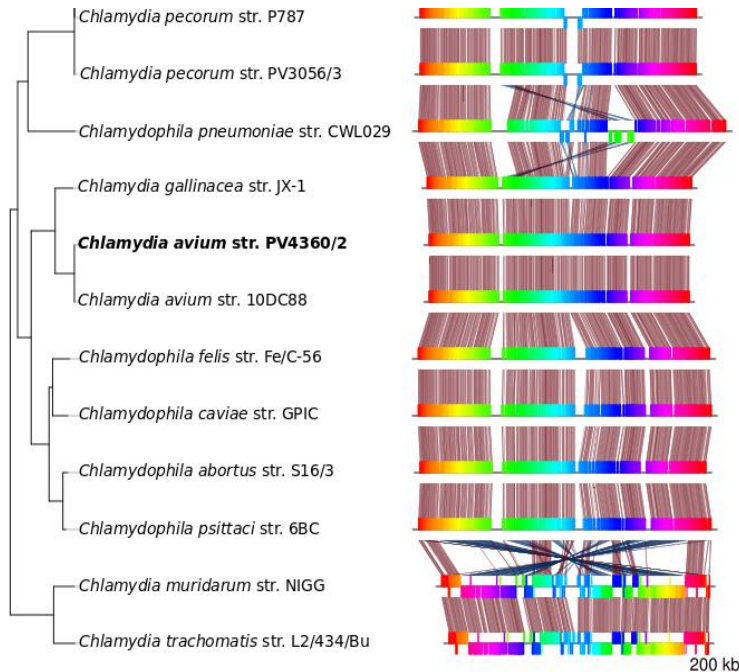
The inner circle shows plot of GC skew plotted as the deviation from the average for the entire sequence with positive (yellow) and negative (purple) values.



# Sequenziamento genomico completo

4<sup>th</sup> European Meeting on Animal Chlamydioses (EMAC-4)  
Zagreb (Croatia), 13-15 September 2017

## Whole genome sequencing of *C. avium* and *C. pecorum* isolates from Italy



The *C. avium* strain PV 4360/2 isolated from an apparently healthy feral pigeon is **the second strain to be sequenced from this species**, the other being the strain 10DC88 that was recovered from a diseased parrot in Germany in 2010. The length and GC-content of the two genomes are very similar and both isolates harbour a plasmid.

Alignment of the genomes of *C. avium* PV 4360/2 with strains of other chlamydial species retrieved from the database. The alignment was performed using the software Mauve.



# Esami di laboratorio – rilevazione di anticorpi

Non disponiamo di test soddisfacenti quanto quelli utilizzabili per la diagnosi diretta della clamidiosi aviare

- fissazione del Complemento (di difficile approvvigionamento)
- ELISA (Ag da Virion/Serion)
- in-house rMOMP ELISA
- recomLine assay
- peptide array

N.B.: l'affidabilità e disponibilità commerciale dei test ELISA appaiono modeste





# Diagnosi della clamidiosi aviare in Italia

- Servizi diagnostici offerti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali
- In Italia sono presenti
  - *C. psittaci* (uccelli d'affezione, piccioni, uccelli selvatici, pollame)
  - *C. avium* (piccioni)
  - *C. gallinacea* (galline ovaiole, anatre, oche, avifauna selvatica)







# Ricerca sulla clamidiosi aviare in Italia

## Progetti di ricerca

- 2016-2018 IZS Lombardia e Emilia Romagna  
*Sequenziamento genomico completo di clamidie isolate nel Centro di Referenza Nazionale per Clamidiosi*
  - studio comparativo dei genomi e determinanti di patogenicità e virulenza di alcuni isolati italiani conservati nel CRN
- 2017-2019 IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta  
*Clamidie di derivazione avicola a potenziale zoonosico: un problema emergente in Europa*
  - studio della prevalenza nell'avifauna selvatica e allevata
  - sviluppo di metodiche di tipizzazione semplici e a basso costo (HRM)
  - sviluppo di protocolli
  - educazione sanitaria (allevatori, veterinari, personale CRAS,...)



# Progetto dei Paesi Bassi (*Plat4m-2Bt-psittacosis*)



Scopo: ridurre il carico di malattia della psittacosi

Modalità: realizzazione di una piattaforma funzionale allo scambio sistematico di dati di laboratorio e di altri dati tra i settori di sanità pubblica e di sanità animale

Durata del progetto: Ottobre 2014 – Settembre 2018

Partner: Central Veterinary Institute

RIVM

Academic Medical Center (Amsterdam)

Università di Utrecht

e altri 6

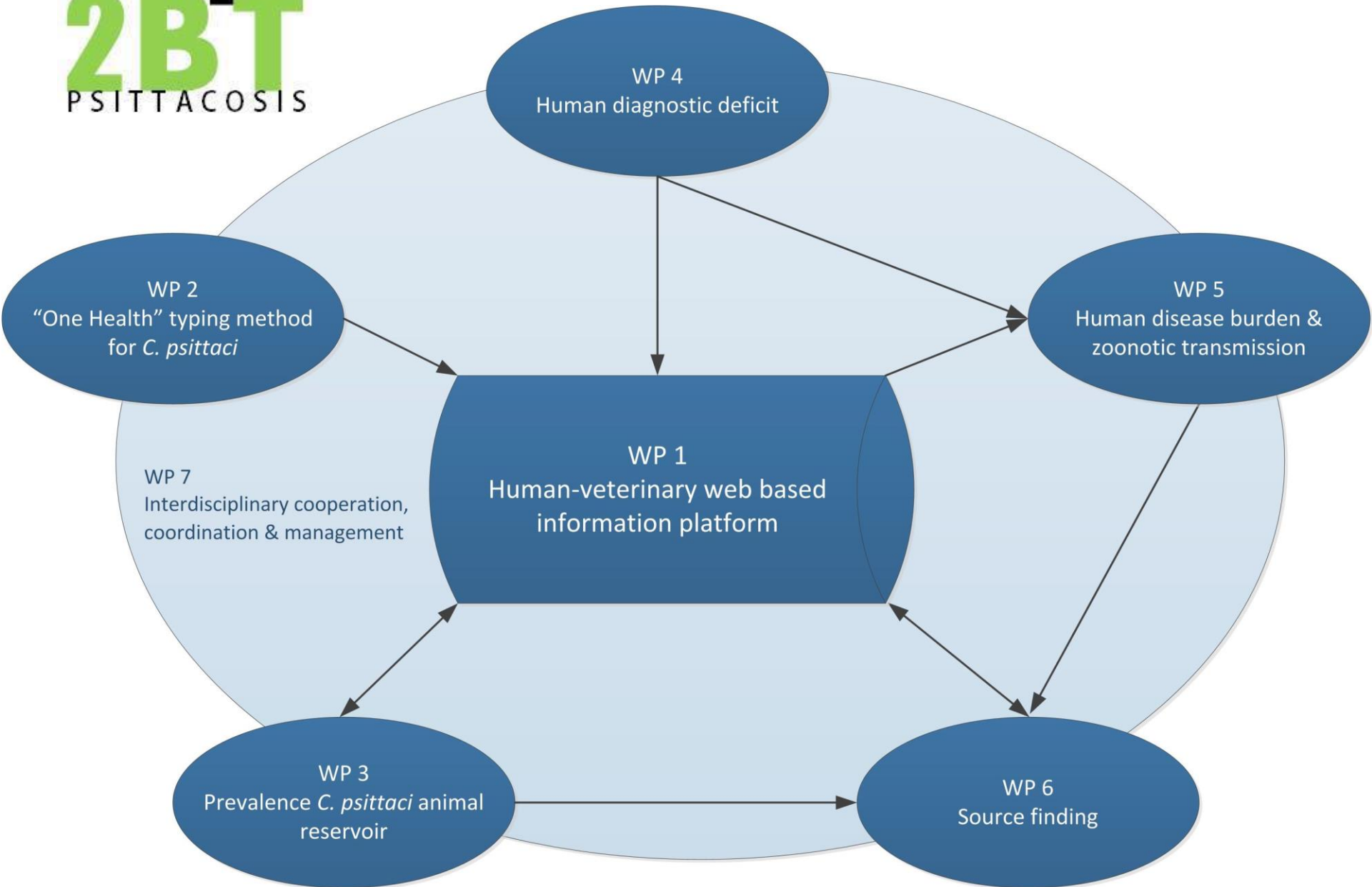


# Progetto dei Paesi Bassi (*Plat4m-2Bt-psittacosis*)



- sviluppo di una piattaforma intersettoriale basata sulla rete per lo scambio dei dati
- uso di un metodo di tipizzazione '*One Health*' per *C. psittaci*
- definizione di presenza e prevalenza di *C. psittaci* nelle popolazioni di pollame, volatili d'affezione e volatili selvatici dei Paesi Bassi
- applicazione di un metodo PCR armonizzato nei laboratori di microbiologia medica per la diagnostica delle patologie respiratorie
- determinazione del carico di malattia relativo alla psittacosi nell'uomo
- rilevazione dell'incidenza della malattia e dei genotipi circolanti nell'uomo e negli animali per identificare reservoirs
- valutazione della piattaforma per finalità di *source finding*

# Schema del progetto





Grazie  
dell'attenzione !



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"  
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

Sede Centrale Brescia  
Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia - Italy  
T. +39 030 2290.1 - F. +39 030 2425251  
info@izsler.it - www.izsler.it