

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Epidemiologia e controllo delle zoonosi

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H3

Settore Scientifico disciplinare: VET 05

***CHLAMYDIA PSITTACI* NEL COLOMBO DI CITTÀ:  
ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI, SIEROLOGICI E  
BIOMOLECOLARI**

Presentata da: Dott.ssa Dania Bilato

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Giovanni Poglayen

Prof.ssa Elena Catelli

Correlatore Dr. Salvatore Catania

Esame finale anno 2012



# INDICE

## PARTE GENERALE

### *Chlamydiae*

1. EZIOLOGIA	pag. 6
1.1. Storia delle clamidie	pag. 6
1.2. Tassonomia	pag. 7
1.3. Morfologia	pag. 10
1.4. Proprietà chimico-fisiche	pag. 11
1.4.1. Caratteristiche di colorazione	pag. 11
1.4.2. Resistenza agli agenti chimici e fisici	pag. 11
1.4.3. Struttura antigenica	pag. 12
1.4.4. Sensibilità agli antibiotici	pag. 15
1.5. Ciclo biologico	pag. 16
1.6. Classificazione delle clamidie: <i>serovar</i> e correlazioni patogenetiche	pag. 18
2. EPIDEMIOLOGIA	pag. 22
2.1. Specie animali sensibili alla clamidiosi	pag. 22
2.2. Modalità di trasmissione	pag. 28
2.3. Aspetti del colombo di città	pag. 30
2.4. Uomo e Clamidia	pag. 33
2.4.1. Storia della psittacosi	pag. 33
2.4.2. Genotipi associati a clamidiosi nell'uomo	pag. 35
2.4.3. Uomo, Clamidia e columbiformi	pag. 36
2.4.4. La malattia nell'uomo	pag. 38
2.4.5. Casi segnalati in letteratura	pag. 40
2.4.6. Casi umani denunciati negli anni	pag. 42
3. PATOGENESI	pag. 43
4. SINTOMATOLOGIA	pag. 45
5. LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE	pag. 47

5.1. Lesioni macroscopiche	pag. 48
5.2. Lesioni microscopiche	pag. 49
<b>6. DIAGNOSI</b>	pag. 51
6.1. Diagnosi Clinica	pag. 51
6.2. Metodologie diagnostiche della clamidiosi	pag. 52
6.3. Isolamento	pag. 53
6.4. Diagnosi sierologica	pag. 55
6.5. Colorazioni	pag. 57
6.5.1. Esame microscopico	pag. 57
6.5.2. Colorazioni istochimiche	pag. 57
6.5.3. Colorazioni immunoistochimiche	pag. 58
6.6. Metodi immunoenzimatici	pag. 58
6.7. Immunofluorescenza e Microimmunofluorescenza	pag. 59
6.8. Diagnostica biomolecolare	pag. 60
<b>7. CONTROLLO DELLA MALATTIA</b>	pag. 65

## **PARTE SPERIMENTALE**

1. SCOPO DEL LAVORO	pag. 70
2. MATERIALI E METODI	pag. 71
2.1. Fase iniziale dello studio	pag. 71
2.2. Seconda fase dello studio	pag. 72
2.3. Scelta degli animali per lo studio	pag. 73
2.4. Esame autoptico delle carcasse	pag. 74
2.5. Area di studio e distribuzione geografica dei siti di cattura	pag. 75
2.6. Fissazione del complemento	pag. 77
2.7. RFLP-PCR ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR</i> )	pag. 78
2.7.a. <i>Real Time PCR</i>	pag. 80
2.8. DNA <i>microarray</i>	pag. 80
2.9. MLVA ( <i>Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i> )	pag. 80

2.10. Isolamento in uova embrionate di pollo SPF ( <i>Specific Pathogen Free</i> )	pag. 81
2.10.1. Preparazione dell'inoculo	pag. 81
2.10.2. Modalità di inoculo del campione	pag. 82
2.10.3. Controllo della vitalità delle uova	pag. 82
2.10.4. Estrazione degli embrioni dalle uova e prelievo del sacco vitellino	pag.83
2.10.5. Colorazione di Gimenez delle impronte di sacco vitellino	pag. 85
2.11. Isolamento di <i>Chlamydia</i> spp. in colture cellulari LLC-MK2	pag. 85
2.12. Immunofluorescenza diretta	pag. 86
2.13. Congelamento dei ceppi	pag. 86
3. RISULTATI	pag. 87
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 100
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 107
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 108

RINGRAZIAMENTI

# **PARTE**

# **GENERALE**

# *Chlamydiae*

## 1. EZIOLOGIA

### 1.1. STORIA DELLE CLAMIDIE

All'inizio del XIX secolo furono segnalati i primi sospetti di correlazione tra infezione in pappagalli e polmoniti nell'uomo. Nel 1895, Morange propose il nome di psittacosi per questa infezione, ma l'agente eziologico responsabile della malattia fu isolato solamente 35 anni dopo, tra il 1929 e il 1930, durante una epidemia causata dall'introduzione in USA ed in Europa di pappagalli argentini infetti. Nel 1930, contemporaneamente ed indipendentemente, Levinthal descrisse minuscoli corpi sferici basofili in tessuti di pappagalli infetti mentre Coles e Lillie fecero la stessa osservazione in tessuti di pazienti umani infetti ed uccelli, da cui derivò il nome dalle rispettive iniziali, *Levinthal-Coles-Lillie*, di *LCL-bodies*.

Bedson e Western (1930), in Inghilterra, stabilirono e dimostrarono il ruolo eziologico di questo microorganismo nella malattia e successivamente nel 1932, Bedson e Bland, definirono per primi il ciclo bifasico intracellulare dell'agente della psittacosi e descrissero l'agente della malattia come un virus filtrabile, da cui il nome in suo onore di *Bedsonia*. Sempre nel 1930 l'agente del Linfogramuloma Venereo (LGV) fu isolato dall'uomo (Hellerström e Wassén, 1930). Furono entrambi classificati come virus del gruppo psittacosi-LGV.

Due anni dopo, Thygeson (1934a; 1934b) notò similitudini fra lo sviluppo e la morfologia delle inclusioni riscontrate nella congiuntivite da tracoma umano, evidenziate per prime da Halberstädter e Prowazek nel 1907 che ne proposero il nome di Chlamydozoa, con quelle ritrovate nella psittacosi, rafforzando l'ipotesi che questi agenti appartenessero allo stesso gruppo.

Nel 1935, Burnet e Rountree ne dimostrarono la crescita nella membrana corion-allantoidea di uova embrionate di pollo. Nel 1940, Rake *et al.*, scoprirono che l'agente del LGV poteva moltiplicare nel sacco vitellino e successivamente nel 1941, Yanamura e Meyer ne dimostrarono la crescita nel sacco vitellino di uova embrionate di pollo. In seguito, si dimostrò che tutte le altre clamidie erano in grado di crescere nel sacco vitellino (Stamp *et al.*, 1950; Tang 1957). Oltre a

pappagalli ed uccelli esotici, successivamente infezioni da clamidia vennero riportate in piccioni domestici (Pinkerton e Swank, 1940) e anatre (Wolins, 1948).

Più tardi, nel 1954, Bedson e Gostling, dimostrarono la moltiplicazione per fissione binaria, supportando che questi microrganismi erano più correlabili a batteri che non a virus.

La natura di questo agente patogeno fu poi chiarito definitivamente alla fine del 1960. Con l'avvento della microscopia elettronica e delle tecniche di isolamento è stata esclusa l'appartenenza di questo agente ai virus. Per molti anni sono state quindi incluse e considerate tra i virus, in seguito come forme intermedie tra virus e batteri, ed infine come batteri (Moulder, 1966; Page, 1966).

## 1.2. TASSONOMIA

Differenti termini sono stati utilizzati in passato in letteratura per definire questi microrganismi (tabella 1), ed il termine *Chlamydia* appare in bibliografia nel 1945, quando Jones, Rake e Stearns, dimostrarono la suscettibilità dell'agente del LGV alla sulfadiazina e suggerirono di separare tali agenti dai virus nel genere *Chlamydia* (Jones *et al.*, 1945; Page, 1966).

LCL <i>bodies</i> (Levinthal-Coles-Lillie)	Coles, 1930, Levinthal, 1930, Lillie, 1930; Fortner, 1953.
<i>Psittacosis virus</i>	Bedson e Western, 1930; Levinthal, 1930.
<i>Rickettsia psittaci</i>	Lillie, 1930.
<i>Bedsonia</i>	Meyer, 1952, 1965; Bedson e Western 1930.
<i>Chlamydozoon, Ehrlichia, Rickettsiaformis, Rakeia</i>	citato in Page, 1968.
<i>Miyagawanella psittaci</i>	Miyagawa <i>et al.</i> , 1935; Meyer 1952.
PLT ( <i>Psittacosis-Lymphogranuloma-Trachoma group</i> )	Rake <i>et al.</i> , 1940; Rake, 1953.
<i>Neo Rickettsia mundi</i>	Giroud, 1955; citato in Meyer, 1967.
PLV <i>group</i> ( <i>Psittacosis-Lymphogranuloma-Venerum</i> )	Page 1959,1966,1968.

**Tabella 1.** Tassonomia prima del 1999 (Kaleta *et al.*, 2003). Alcuni dei principali nomi proposti in passato per *Chlamydia*.

In particolare, dal punto di vista storico, nel 1938, il parassitologo francese Brumpt, propose il genere *Miyagawanella* per l'agente della linfogranulomatosi in onore del professor Miyagawa che per primo ne descrisse la morfologia, trasmissione ed isolamento. Nel 1952, invece Meyer propose che gli agenti del gruppo psittacosi-LGV-tracoma venissero raggruppati in un unico genere *Bedsonia*, in onore del primo che descrisse il ciclo del microorganismo. Nel 1948 sono state classificate nell'ordine delle *Rickettsiales*, in seguito Storz e Page (1971), le hanno classificate in un nuovo ordine, *Chlamydiales*, con un genere e due specie, *C. trachomatis* e *C. psittaci* distinte sulla base della suscettibilità alla sulfadiazina, e dell'accumulo di glicogeno evidenziabile con colorazione di iodio nelle inclusioni di clamidia. *C. psittaci* risulta iodio negativa, con inclusioni citoplasmatiche prive di glicogeno, e sulfadiazina resistente. Mentre *C. trachomatis* mostra inclusioni citoplasmatiche compatte che contengono glicogeno, risulta essere iodio positiva e sulfadiazina sensibile. Le inclusioni di *C. trachomatis* sono rotonde od ovali, relativamente rigide e generalmente appaiono singolarmente in ogni cellula ospite infetta (Page, 1968). Le inclusioni di *C. psittaci*, invece, sono più irregolari, non notevolmente rigide, e solitamente le cellule ospiti infette contengono molte inclusioni.

Successivamente, nel 1999, con lo sviluppo della biologia molecolare e delle analisi filogenetiche basate sul sequenziamento ribosomiale del 16S rRNA e 23S rRNA, gene *ompA*, venne modificata la classificazione e la tassonomia delle clamidie in due generi, *Chlamydia* e *Chlamydophila* (Everett *et al.*, 1999). Successivamente tale tassonomia è stata confermata da Bush ed Everett nel 2001 (tabella 2).

Analisi filogenetiche degli antigeni di superficie e altre proteine della clamidia sono state utilizzate per ricostruire l'evoluzione delle *Chlamydiaceae* (Bush e Everett 2001). In particolare mediante l'analisi dei seguenti geni codificanti determinate proteine: MOMP (*ompA*), *GroEL* *chaperonin* (*groEL*), *KDO-transferase* (*kdtA*), *small cysteine-rich lipoprotein* (*omp3*, *envA*, *omcA*, *omlA*) 60 kDa *large cysteine-rich protein* (*ompB*, *omp2*, *envB*, *omcB*, *cmcB*) e l'operone ribosomiale.

Molti ricercatori negli anni hanno però contestato la divisione in questi due generi (Stephens *et al.*, 2009), e nel 2011 si è proposto di riunire i due generi nuovamente in un unico genere: *Chlamydia* (tabella 3).

Attualmente le clamidie sono classificate nell'ordine *Chlamydiales*, famiglia *Chlamydiaceae*. L'ordine *Chlamydiales* comprende microrganismi con caratteri comuni a virus e batteri, come questi ultimi possiedono sia DNA che RNA, la composizione della loro parete cellulare è simile a quella dei batteri Gram negativi, si moltiplicano per scissione binaria, sono dotati di ribosomi,

possiedono autonoma sintesi proteica, e sono sensibili ad alcuni antibiotici. Invece con i virus condividono il ciclo intracellulare obbligato.

Pur possedendo un corredo enzimatico proprio non sono in grado di ossidare il piruvato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici e di sintetizzare i nucleosidi fosfati ad alta energia e quindi ATP, essenziali per l'attività metabolica e sono costretti ad utilizzare l'ATP prodotto dalla cellula ospite. Dipendono quindi dal metabolismo della cellula ospite.

Sono considerate microrganismi Gram negativi, di forma rotondeggiante, immobili, e possono essere evidenziate con vari metodi di colorazione quali il metodo Castaneda in blu ed in rosso con il metodo Macchiavello, oltre che con colorazione di Gimenez e Giemsa.

Tutte le *Chlamydiae* si moltiplicano nel citoplasma delle cellule infette dove danno origine a microcolonie inglobate in vacuoli, che all'osservazione microscopica appaiono sotto forma di inclusioni. Nelle fasi iniziali gli inclusi appaiono basofili, mentre nelle forme mature si presentano come vacuoli citoplasmatici solitamente multipli e con corpi elementari in parte o totalmente oscurati dalla densa matrice basofila che li circonda.

Vecchia Classificazione	Nuova Classificazione	Specie Ospite
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Uomo
	<i>Chlamydia muridarum</i>	Topo, Criceto
	<i>Chlamydia suis</i>	Suino
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>	Uccelli, Ruminanti, Cavallo
	<i>Chlamydophila abortus</i>	Pecora, altri ruminanti, suino, uccelli
	<i>Chlamydophila caviae</i>	Cavia, cavallo
	<i>Chlamydophila felis</i>	Gatto
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Uomo, koala, cavallo, anfibi
<i>Chlamydia pecorum</i>	<i>Chlamydophila pecorum</i>	Bovino, pecora, capra, suino, koala

**Tabella 2.** Tassonomia dal 1999 al 2011. Comparazione tra le vecchie classificazioni tassonomiche delle *Chlamydiaceae* (Everett *et al.*, 1999).

Nuova Classificazione 2011	
<i>Phylum</i>	<i>Chlamydiae</i>
Classe	<i>Chlamydiia</i>
Ordine	Chlamydiales
Famiglia	<i>Chlamydiaceae</i>
Genere	<i>Chlamydia</i>
Specie	<i>Chlamydia muridarum</i> <i>Chlamydia suis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Chlamydia abortus</i> <i>Chlamydia caviae</i> <i>Chlamydia felis</i> <i>Chlamydia pecorum</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i>

**Tabella 3.** Recente riclassificazione e quindi attuale tassonomia delle clamidie (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Edition, Volume Four, 2011*).

### 1.3. MORFOLOGIA

Sulla base del suo specifico ciclo biologico possono essere distinte due diverse forme morfologiche di *Chlamydia*, la forma infettante, denominata anche CE (Corpo Elementare, *Elementary Body*) e una forma non infettante, denominata anche CR (Corpo Reticolare, *Reticular Body*). Il CE è piccolo, denso, sferico, di circa 0,2-0,3 µm di diametro, immobile, privo di flagello, e non dotato di pili. Questo rappresenta la forma infettante, in grado di sopravvivere nell'ambiente extracellulare, metabolicamente inerte, ed ha come bersaglio le cellule epiteliali cilindriche attraverso le quali penetra nell'organismo ospite. La rigidità di membrana del CE è dovuta alla presenza di ponti disolfuro tra le proteine esterne di membrana più che a legami di tipo classico a livello della matrice di peptidoglicani considerando che l'acido muramico è assente. Il CR, intracellulare, è la forma metabolicamente attiva e non infettante della clamidia rispondente alle esigenze della replicazione endocellulare e adattato alla vita intracellulare. Si divide per scissione binaria, ha un diametro maggiore, di circa 0,6-1,5 µm, ed è sensibile alle

variazioni di pressione osmotica. Gli acidi nucleici si ritrovano sia nel CE che CR, ma il rapporto tra RNA e DNA è maggiore nel CR. Quest'ultimo è in grado di sintetizzare il DNA, RNA e le proteine. I CR non sono in grado di completare il ciclo dei pentoso-fosfati e non utilizzano i piruvati attraverso il ciclo dell'acido tricarbossilico. Sono però in grado di catabolizzare l'acido piruvico, aspartico e glutammico, generando CO<sub>2</sub> e residui a 2 e 4 atomi di carbonio. Per quanto riguarda la distribuzione degli aminoacidi nelle pareti delle clamidie questa è rappresentata da proteine al 70%, i lipidi rappresentano il 5,1%, mentre la parte restante è costituita da carboidrati.

## **1.4. PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE**

### **1.4.1. Caratteristiche di colorazione**

E' possibile rilevare la clamidia per impronta da tessuti, organi, mediante colorazioni appropriate, quali quella di Gimenez, Castaneda, Giemsa, Macchiavello. Le clamidie si presentano di color porpora scuro con la colorazione di Giemsa, blu con il Castaneda, e rosse con la colorazione di Gimenez e Macchiavello. La colorazione di Gimenez rappresenta quella più utilizzata come metodo per l'evidenziazione di clamidie dal sacco vitellino di embrioni di pollo infetti. Con la colorazione di Giemsa i corpi elementari maturi appaiono sotto forma di inclusioni paranucleari di colore rosso porpora con netto contrasto dal fondo blu che è assunto dal citoplasma della cellula ospite. Solo le colorazioni di iodio vengono utilizzate in medicina umana per l'identificazione della *Chlamydia trachomatis*. Anche se sono considerate come Gram negative la colorazione di Gram non è diagnostica in quanto microrganismi endocellulari.

### **1.4.2. Resistenza agli agenti chimici e fisici**

Le clamidie sono molto sensibili all'azione delle sostanze chimiche in grado di alterare il contenuto in lipidi o l'integrità della loro parete cellulare, in quanto la presenza di elevate quantità di lipidi nella loro parete rappresenta una caratteristica che ne condiziona la labilità ai differenti solventi organici e detergenti.

Molto efficaci, in quanto in grado di inattivare rapidamente le clamidie, risultano i sali quaternari d'ammonio, la formalina 0,1 %, il fenolo 0,5% ed i solventi dei lipidi.

Risultano invece un pò meno sensibili alle soluzioni alcaline ed acide (metanolo, etanolo, solfato di ammonio o zinco, fenolo, acido idrocloridrico, idrossido di sodio) (Calnek, 2001).

E' stato dimostrato che perdono il proprio potere infettante in pochi minuti se esposte ai comuni disinfettanti come benzalconio cloruro, le soluzioni iodio-alcoliche, l'etanolo al 70%, l'acqua ossigenata al 3% ed il nitrato d'argento, mentre risultano essere resistenti ai composti del cresolo ed alla calce. I disinfettanti di comune impiego si dimostrano attivi in tempi variabili da 1 a 30 minuti. La resistenza delle clamidie risulta essere comunque variabile in base alla temperatura, pH, umidità e luce solare.

In genere, sospensioni diluite di omogenati di tessuti infetti vengono inattivati in 5 minuti dopo incubazione a 56°C o a 60°C per 10 minuti, in 48 ore a 37°C, in 12 giorni a 22°C, mentre un certo grado di infettività può persistere per diversi giorni, circa 50, a +4 °C. Nelle feci essiccate si conservano per alcuni mesi (Calnek, 2001).

Le forme infettanti del microrganismo presenti nei tessuti o membrane vitelline si mantengono stabili e possono essere conservate per periodi lunghi mantenute a temperature di -20°C, anche se temperature inferiori risultano essere più performanti. Alcuni studi riportano la persistenza di clamidia per 372 giorni in carcasse di tacchini infette mantenute a temperature di -20°C (Andreani E., 1998).

Il congelamento-scongelo determina un abbassamento del titolo di 1-2 log<sub>10</sub>. La clamidia perde il suo potere infettante se sottoposta a sei cicli di congelamento e scongelamento. I CR vengono inattivati a -70°C mentre la parete dei CE può essere distrutta dagli ultrasuoni a frequenze inferiori a 100KC o dal trattamento con sodio desossicolato (Calnek, 2001).

Spencer *et al.* nel 1983, riportano la sopravvivenza di *C. psittaci* per trenta giorni utilizzando un terreno di trasporto specifico in assenza della conservazione a temperatura di refrigerazione, mentre per 34 giorni a +4°C. Questo terreno viene utilizzato anche per il congelamento a -80°C per anni, o per la conservazione a +4°C per breve tempo.

I costituenti principali di questo *medium* sono il saccarosio con funzione di tampone osmotico, il siero fetale bovino per la stabilizzazione del pH, e gli antibiotici per prevenire le contaminazioni batteriche (saccarosio 74,6 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,237 g/l, acido L-glutammico 0,721 g/l, 10% siero fetale bovino, vancomicina e streptomicina 100 µg/ml, gentamicina e nistatina 50 µg/ml).

### **1.4.3. Struttura antigenica**

Le clamidie hanno una struttura antigenica complessa, hanno antigeni gruppo specifici di natura polisaccaridica termostabili e antigeni termolabili. Possiedono anche antigeni tipo-specifici e specie specifici.

La struttura consiste in un Lipopolisaccaride (LPS) di 10 KDa immunodominante genere-specifico ed in numerose proteine. L'LPS rappresenta il principale antigene di superficie e gruppo specifico, fissante il complemento. Non sembra essere ancora stato dimostrato se gli anticorpi prodotti nei suoi confronti siano o meno protettivi.

L'LPS è correlato chimicamente e sierologicamente ai lipopolisaccaridi degli enterobatteri R-mutanti. L'LPS della clamidia possiede almeno tre epitopi. Uno di questi, è genere specifico poiché non è stato riscontrato in nessun altro batterio. Questo epitopo, formato da un trisaccaride di acido 3-deossi-D-manno-octulosonico (KDO), è esposto sulla superficie dei corpi elementari e di quelli reticolari ed è immuno accessibile. I restanti due sono simili a quelli che si rinvengono sui lipopolisaccaridi di altri batteri Gram negativi. Questa è la caratteristica che può spiegare eventuali risultati di *cross* reazione, in particolare con *Acinetobacter calcoaceticus* (Brade e Brunner, 1979) nelle metodiche ELISA. Sia i CE che i CR presentano un rivestimento esterno analogo a quello della parete dei *Gram* negativi, ma privo, a differenza di questi ultimi, di peptidoglicano e costituito da due membrane trilaminari, una esterna (OM: *Outer Membrane*) ed una interna, la membrana citoplasmatica. Dei costituenti delle clamidie, circa il 35% è dato da proteine. Di queste la componente fondamentale è rappresentata dalla proteina MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) presente sulla membrana esterna sia dei CE che CR (figura 1).

La MOMP, ha un peso molecolare di circa 40000 Dalton (40 kD). Rappresenta da sola circa il 60% del totale delle proteine esterne ed è stato dimostrato essere immunogena e quindi importante per la risposta immunitaria.

E' una proteina immunodominante con epitopi genere-specie e *serovar*-specifici, nei cui confronti gli organismi producono anticorpi neutralizzanti. La MOMP è caratterizzata da quattro regioni variabili (VDI-VDIV) e cinque regioni conservate in struttura e funzione. Il gene *ompA* rappresenta uno dei geni più importanti codificante per la proteina esterna di membrana.

A livello di questo gene sono presenti quattro segmenti variabili (VSI-VSIV), dispersi tra cinque segmenti molto conservati, che codificano per le *Variable Protein Domains* VDI-VDIV della MOMP (Andersen e Vanrompay 2003). I segmenti conservati del gene *ompA* codificano le regioni conservate della MOMP e sono conservate addirittura a livello di genere, il che rende questi segmenti interessanti geni per lo sviluppo di PCR diagnostiche.

I geni e i determinanti antigenici specie-specifici sono all'interno delle regioni conservate e nella parti più conservate di VDIV. Antigeni *serovar* specifici sono localizzati entro le variabili VDI e VDII. A causa della variabilità delle regioni variabili, tutti i genotipi conosciuti di *C. psittaci* possono essere identificati da analisi di sequenza del gene *ompA* e questa analisi è strettamente correlata con le *serovars*.

Tra gli altri geni ritroviamo il gene *ompB* che codifica per la CRP grande (*Large Cysteine Rich Protein*) di 60 kD, mentre il gene *kdtA* codifica per l' LPS.

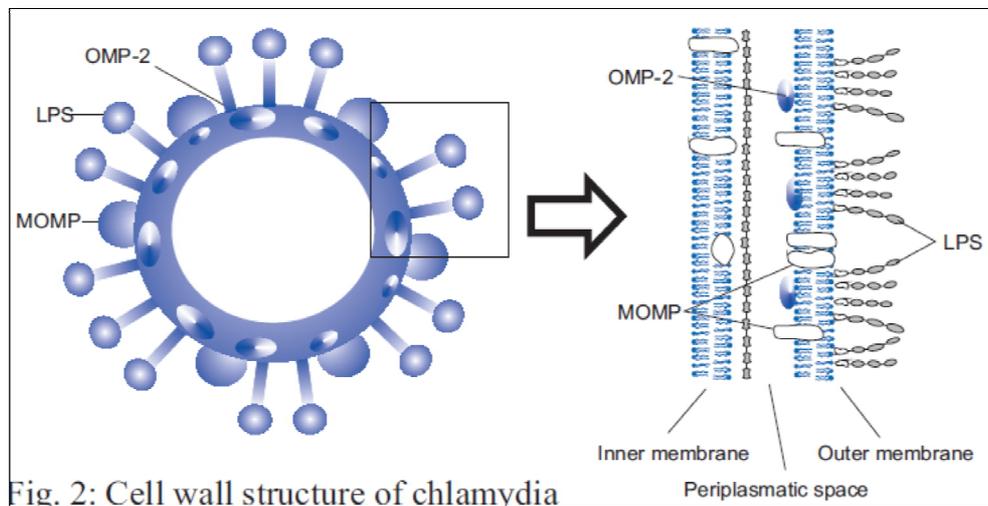


Fig. 2: Cell wall structure of chlamydia

**Figura 1.** Struttura della parete cellulare delle clamidie.

([http://www.medac.de/medac\\_international/data/diagnostics/brochures/rELISA36\\_Ch1-Fibel-engl\\_HP.pdf](http://www.medac.de/medac_international/data/diagnostics/brochures/rELISA36_Ch1-Fibel-engl_HP.pdf))

Sulla membrana esterna sono state descritte altre proteine, che differiscono a seconda delle specie e dei ceppi, e distinte in due gruppi: oligomeri del MOMP che danno rigidità alla parete dei CE in assenza del peptidoglicano, e polipeptidi che svolgono funzione nell'adesione dei CE alla superficie cellulare.

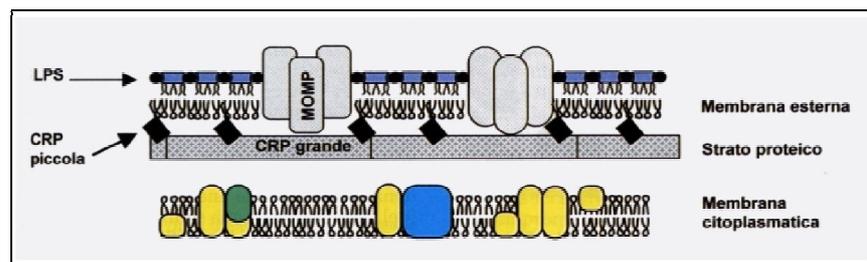
In particolare, importanti costituenti strutturali delle clamidie sono le proteine della membrana esterna ricche in cisteina (CRP) piccola e grande (*small and large Cysteine-Rich Protein*) rispettivamente di 12-15 kDa e di 60 kDa (figura 2). Anche sulla CRP grande sono presenti epitopi specie specifici altamente immunogeni. Infine, altre proteine conosciute sono due *heat shock protein*, tra cui la GroEl.

Tra le proteine di superficie sono presenti ponti disolfuro inter ed intra molecolari responsabili della rigidità della parete delle clamidie.

Le clamidie sono costituite per 40-50% da lipidi sotto forma di lipopolisaccaridi, distribuiti soprattutto sulla parete cellulare dei CE e correlati antigenicamente con i ceppi R-mutanti di alcune specie di enterobatteri (*Proteus mirabilis*, *E. coli*). La parete cellulare contiene antigeni di gruppo, o genere specifici, che stimolano la produzione di anticorpi, rilevabili mediante Fissazione Del Complemento, e specie-specifici rilevabili con Immunofluorescenza.

Il genoma delle clamidie, è formato da una molecola di DNA circolare, del peso molecolare di circa  $660 \times 10^6$  kDa, pari a  $11,9 \times 10^5$  paia di basi. Oltre al DNA cromosomiale in alcuni ceppi

di *C. psittaci* è stata scoperta la presenza di un plasmide la cui funzione non è del tutto chiara. L'RNA ribosomiale è simile a quello dei batteri. In uno studio recente, è stato dimostrato che la proteina plasmidica *pgp3* (28 KDa) è immunogena sia nelle infezioni umane da *C. trachomatis* che in infezioni animali causate da ceppi di clamidie con plasmide. Inoltre, sono stati rilevati anticorpi anti-*pgp3* di *C. psittaci* in sieri di anatre e colombi con infezione da *C. psittaci*. Questa proteina plasmidica potrebbe essere considerata come un *marker* di infezione nell'uomo e negli animali ma il suo ruolo rimane ancora da chiarire (Donati *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Schema dell'organizzazione degli involucri esterni delle clamidie. La MOMP si presenta come un trimero per la sua probabile funzione di porina; la CRP grande è localizzata nel periplasma per le sue proprietà di solubilità, mentre la CRP piccola è proposta come una lipoproteina e quindi localizzata nella membrana esterna con la porzione lipidica e con la parte proteica idrofila che sporge nel periplasma (Storni E., 2007).

#### 1.4.5. Sensibilità agli antibiotici

Le clamidie risultano essere sensibili alle tetracicline, cloramfenicolo ed eritromicina in quanto in grado di inibire la sintesi proteica dei ribosomi della clamidia.

Le tetracicline rappresentano gli antibiotici di prima scelta, sia in medicina veterinaria che in medicina umana in quanto inibiscono la crescita e la moltiplicazione delle clamidie inibendo la sintesi proteica da parte dei ribosomi. Le tetracicline sono efficaci solo durante la crescita e fissione, non sono attive nelle infezioni latenti o persistenti dove clamidia è presente all'interno dei macrofagi. Risultano sensibili anche a tilosina, rifampicina e acido nalidixico, ed in generale a chinoloni e macrolidi. Si dimostrano invece resistenti a streptomina, neomicina, polimixina, bacitracina, gentamicina, vancomicina, nistatina (Page, 1966; Spencer e Johnson, 1983).

Per quanto riguarda le penicilline, queste risultano essere poco efficaci, in quanto interferiscono con la sintesi della parete cellulare con blocco della scissione binaria del CR (Corpo Reticolare) e formazione di CR abnormi che non possono trasformarsi in CE (Corpi Elementari), quindi non

sono in grado di prevenire l'infezione delle cellule con i CE, non impediscono la trasformazione dei CE in CR né l'attività metabolica di quest'ultimi. Inoltre, la parete cellulare delle clamidie manca di peptidoglicano.

I sulfamidici sono stati utilizzati in passato per distinguere la *C. trachomatis* dalla *C. psittaci*. In particolare, la sulfadiazina sodica viene utilizzata per differenziare *C. trachomatis*, che risulta essere la sola specie sensibile, da *C. psittaci* che risulta invece essere resistente (Page, 1968).

## 1.5. CICLO BIOLOGICO

Il ciclo delle clamidie è molto particolare, se paragonato a quello dei comuni batteri, poiché essendo microrganismi intracellulari obbligati, si compie principalmente in due fasi. La prima metabolicamente attiva e non infettante, caratterizzata dalla formazione di Corpi iniziali o Reticolari (CR), l'altra metabolicamente inattiva ed infettante, caratterizzata dalla comparsa dei Corpi Elementari resistenti (CE).

Il CE, del diametro di 0,3 µm, una volta penetrato nella cellula va incontro ad una sorta di riorganizzazione con formazione, entro 6-8 ore, di una nuova struttura indicata come corpo iniziale o reticolo. Questo misura 0,5-1,6µm, è metabolicamente attivo e si moltiplica fino a 18 ore dopo la penetrazione nella cellula (Longbottom e Coulter, 2003). Il ciclo riproduttivo si svolge in circa 30 ore, ma i CR possono continuare a moltiplicarsi per scissione mentre alcuni di essi si riorganizzano e diventano CE, i quali vengono liberati per lisi cellulare e risultano infettanti per altre cellule.

Talvolta questo ciclo che termina con la distruzione della cellula ospite non ha luogo, ma il CE resta all'interno della cellula stessa senza moltiplicarsi dando luogo ad una infezione silente. In determinate condizioni le clamidie sono in grado di sopravvivere e crescere all'interno delle cellule epiteliali e dei macrofagi. Questo si verifica in corso di particolari condizioni quali ad esempio variazioni della temperatura, pH e trattamenti terapeutici.

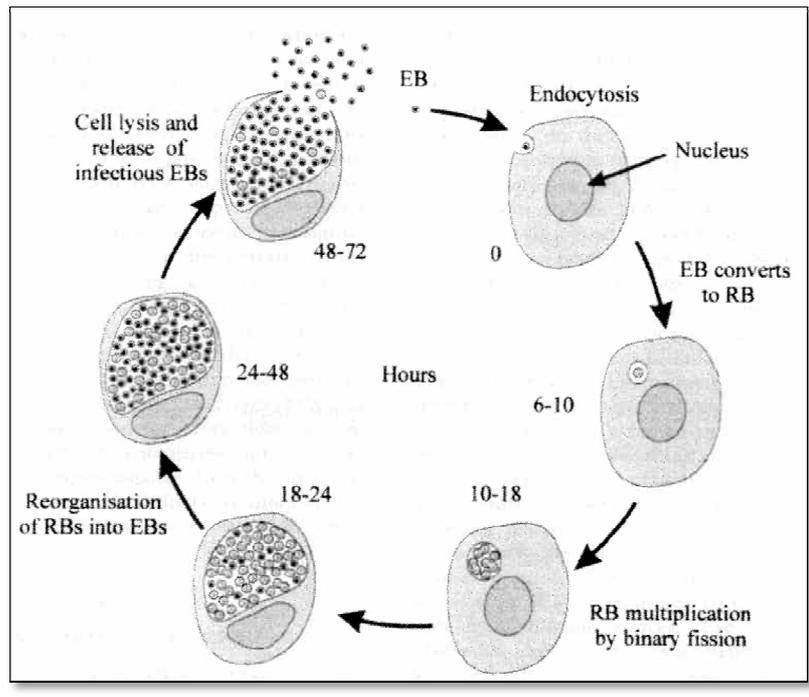
Schematicamente il ciclo di sviluppo si può suddividere in 5 fasi (Calnek, 2001):

- 1-attacco e penetrazione del corpo elementare;
- 2-passaggio dalla forma metabolicamente inerte del CE a quella metabolicamente attiva del CR;
- 3-moltiplicazione per scissione binaria del CR con produzione di numerosi corpi reticolari;
- 4-trasformazione dei CR non infettanti in CE infettanti;
- 5-rilascio dei corpi elementari dalle cellule ospiti, che possono infettare le cellule adiacenti (figura 3).

All'inizio i corpi elementari di *Chlamydia psittaci* si attaccano ai microvilli presenti sulla superficie superiore delle cellule cilindriche degli epitelii. Nella fase successiva, si localizzano al di sotto dei microvilli localizzandosi nelle invaginazioni della membrana plasmatica della cellula assumendo la forma di un nocciolo rivestito. Successivamente penetrano nella cellula attraverso la membrana plasmatica con un meccanismo molto simile alla endocitosi.

Le clamidie quindi protette dalla membrana degli endosomi, evitano il contatto con i lisosomi e si dirigono in prossimità del nucleo dove permangono per tutta la durata del loro sviluppo endocellulare.

Al momento della trasformazione da CE a CR si osserva una alterazione nella struttura della parete cellulare con riduzione dei ponti disolfuro a livello delle proteine esterne di membrana. In seguito iniziano le sintesi proteiche, quella del DNA e dell'RNA. Questo permette la crescita del CR e la sua divisione per scissione binaria. I corpi reticolari non possono generare legami fosfato ad alta energia e pertanto il loro adattamento alla vita intracellulare è legata all'energia fornita dalla cellula ospite. I mitocondri della cellula sono posizionati in prossimità dell'endosoma clamidiale e permettono al CR di utilizzare l'ATP mitocondriale mediante l'azione di una ADP-ATP traslocasi. L'ATP viene scisso in ADP da una specifica ATPasi prodotta dal CR. L'energia che ne deriva viene utilizzata dalla clamidia per favorire il trasporto delle sostanze nutritive. Le clamidie possiedono delle particolari proiezioni cilindriche di membrana disposte a formare un esagono. Queste proiezioni sono ancorate nella membrana citoplasmatica e protrudono all'esterno attraverso dei fori della stessa. Sembra che le proiezioni attraversino la membrana dell'endosoma che circonda la microcolonia di clamidia permettendo la cattura delle sostanze nutritive dal citoplasma della cellula ospite. L'insieme delle clamidie in fase di sviluppo viene definito "incluso" e può contenere da 100 a 500 clamidie. In alcuni casi si può osservare più di un incluso nella stessa cellula infettata con *C. psittaci*. Essi occupano gran parte della cellula infettata nella quale tendono a disporsi intorno al nucleo. La maggior parte dei ceppi di clamidia induce notevoli danni alla cellula ospite dopo 48 ore dall'infezione. La liberazione dei corpi infettanti avviene pertanto a seguito della lisi cellulare (figura 3).



**Figura 3.** Ciclo di sviluppo delle clamidie. In seguito alla penetrazione, l'EB (Corpo Elementare) si trasforma in RB (Corpo Reticolare), il quale si moltiplica per scissione binaria; successivamente, dopo 24-48 ore, si ha la riorganizzazione e trasformazione dei RBs (Corpi Reticolari; *Reticular Bodies*) in EBs (Corpi Elementari; *Elementary Bodies*), fino a produrre un numero elevato di microrganismi che dopo la lisi della cellula ospite (dalla 48<sup>a</sup> ora) vengono liberati per iniziare un nuovo ciclo infettante (Longbottom e Coulter, 2003).

## 1.6. CLASSIFICAZIONE DELLE CLAMIDIE: SEROVAR E CORRELAZIONI PATOGENETICHE

I ceppi di *C. psittaci* sono classificati in *serovars* e genotipi. Attualmente si conoscono otto sierotipi aviari di *Chlamydia psittaci* di cui sei in grado di infettare naturalmente gli uccelli e due *serovars* invece non aviarie ma associate alla clamidiosi dei mammiferi (tabella 4). I diversi sierotipi sono stati evidenziati mediante microimmunofluorescenza e l'impiego di anticorpi monoclonali verso epitopi della MOMP *serovar* specifici, e lo studio delle sequenze nucleotidiche codificanti la MOMP (Andersen, 1991; Andersen, 1997). I diversi sierotipi, specie ospite di primo isolamento ed isolato di riferimento sono riportati in tabella 4.

Analisi di RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR*) hanno in seguito confermato gli stessi risultati ottenuti mediante la sierotipizzazione con anticorpi monoclonali. Ciascuno di questi sierotipi è associato prevalentemente ad un gruppo o ordine di uccelli, da cui

è più frequentemente isolato, e possono essere considerati pertanto quasi ospite-specifici (tabella 5). Di conseguenza, in alcuni casi, è possibile ipotizzare attraverso la conoscenza della *serovar* la possibile fonte d'infezione. Si distinguono quindi otto *serovars* aviari (da A a F). Sei di queste *serovars* di *C. psittaci* sono considerate endemiche negli uccelli, di cui cinque (da A a E) comuni e diffuse nel mondo, mentre una, la F, isolata da un singolo parrocchetto in America (Andersen, 1997), ed otto anni più tardi in Belgio da tacchini da ingrasso di dodici settimane congiuntamente al genotipo A (Van Loock *et al.*, 2005). Le rimanenti due *serovars*, WC e M56, sono state isolate da mammiferi e rispettivamente da bovino e dal topo muschiato (*Ondatra zibethicus*).

È stato dimostrato che *serovar* e genotipi sono correlati e corrispondenti, unica eccezione è rappresentata dal genotipo E/B di cui non esiste il corrispondente sierotipo, quindi è differenziabile solamente tramite metodiche biomolecolari quali sequenziamento dell'*ompA* e DNA *microarray* (Geens *et al.*, 2005a). Il genotipo E/B è stato riscontrato in piccioni, anatre e tacchini (Geens *et al.*, 2005a) e in un pappagallo cenerino (*Psittacus erithacus*) (Harkinezhad *et al.*, 2007).

Recentemente, in alcune aziende avicole della Francia mediante *Real Time* PCR ed in associazione a DNA *microarray*, è stato riscontrato un nuovo ceppo di clamidia, non identificabile con *C. psittaci* e finora non classificato (Laroucau *et al.*, 2009b). Inoltre, anche in Italia in piccioni delle città di Milano e Ferrara mediante tecnologia *microarray* è stata dimostrata una specie non ancora classificata ma appartenente al genere *Chlamydia*, che si suppone essere diversa da quella francese, suggerendo anche in questo caso l'ipotesi della presenza di una nuova specie di clamidia (Vicari *et al.*, 2009). Probabili nuovi ceppi riscontrati anche in colombi svizzeri (Zweifel *et al.*, 2009). Per questi nuovi membri delle *Chlamydiaceae* rimane da chiarirne l'eziologia, l'identificazione e di definirne la patogenicità. Anche se in Francia tali ceppi sono stati associati a casi di polmonite atipica in impiegati del settore avicolo (Laroucau *et al.*, 2009b).

Mediante le diverse metodiche finora utilizzate quali RFLP-PCR sul genoma della MOMP utilizzando l'enzima di restrizione AluI, analisi del gene *ompA* e sequenziamento e DNA *microarray*, attualmente vengono riconosciuti quindi nove genotipi di *C. psittaci*, di cui sette aviari (A, B, C, D, E, F, E/B) e due non aviari (WC, M56) (Sachse *et al.*, 2005). Invece, mediante analisi MLVA (*Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) si distinguono 20 diversi *patterns* di *C. psittaci*, da 1 a 20 (Laroucau *et al.*, 2008).

Sierotipo	Isolato di riferimento	Specie ospite di primo isolamento
A	VS1	Pappagallo
B	CP3	Piccione, colombo, tortora
C	GR9	Oca, anatra
D	NJ1	Tacchino
E	MN	Piccione, tacchino
F	VS225	Pappagallo
M56	M56	Topo muschiato, lepre scarpa da neve (americana)
WC	WC	Bovino
Genotipo E/B	WS/RT/E30	Anatra

**Tabella 4.** Classificazione dei sierotipi, compreso genotipo E/B, dei ceppi aviari di *Chlamydia psittaci* (Andersen e Vanrompay, 2000; Geens *et al.*, 2005a) con specie ospite e ceppo isolato di riferimento.

Specie	Genotipo
Pappagallo	A, B, E/B, F
Tacchino	B, D, A, F, C, E/B
Anatra	C, E/B, B
Oca	C
Piccione	A, B, C, D, E, E/B
Struzzo	E
Pollo	B, D, C, A

**Tabella 5.** Principali specie e genotipi riscontrati (Vanrompay *et al.*, 1993a; Andersen., 1997; Andersen, 2005; Geens *et al.*, 2005a; Sachse *et al.*, 2005; Van Loock *et al.*, 2005; Harkinezhad *et al.*, 2007).

Tra le *serovars* ospite-specifiche, le clamidie che infettano più frequentemente gli psittaciformi appartengono alla *serovar* A, associata sia ad infezioni acute che persistenti. Il genotipo A rappresenta anche quello considerato maggiormente patogeno per l'uomo e la causa primaria di

zoonosi (Wreghitt e Taylor, 1988), a differenza del B, E, E/B, che sono considerati meno patogeni.

La *serovar* B sembrerebbe essere un patogeno primario del colombo, in cui può causare infezioni acute e croniche con eliminazione intermittente, ma è stata isolata anche in soggetti apparentemente sani ed è tra quelle meno patogene per l'uomo. I genotipi che infettano più frequentemente i colombi sono B, E, E/B, ma sono stati riportati anche A, C, D (Vanrompay *et al.*, 1993a; Sayada *et al.*, 1995; Andersen, 1997; Andersen, 2005; Geens *et al.*, 2005a; Heddemma *et al.*, 2006a; Dickx *et al.*, 2010). Inoltre, sono state riportate anche coinfezioni con due o tre genotipi diversi (Geens *et al.*, 2005a; Geigenfeind *et al.*, 2011).

Negli anseriformi, in particolare nelle anatre, cigni e oche ritroviamo con più frequenza il sierotipo C, che non è mai stato rilevato associato a malattia in altre specie di uccelli, e con meno frequenza il sierotipo B ed E/B (Vanrompay *et al.*, 1993a; Andersen, 1997; Geens *et al.*, 2005a; Gaede *et al.*, 2008).

In Europa, le clamidie isolate nel corso di focolai in allevamenti di tacchini appartengono al sierotipo D, altamente patogeno associato anche a mortalità elevata, e B che possiede bassa patogenicità. Il sierotipo D non è mai stato associato a malattie in specie diverse dal tacchino. In USA sono state riportate anche le *serovars* A ed E. Differenze nella virulenza di queste *serovars* sono state dimostrate (Vanrompay *et al.*, 1994b; Beeckman e Vanrompay, 2010). Nei tacchini i sierotipi associati a malattia non sono endemici nell'allevamento industriale ma vengono probabilmente introdotti da specie di uccelli selvatici che possono venire a contatto occasionalmente con i tacchini allevati. Infatti la natura sporadica di questi focolai rafforza tale ipotesi.

La *serovar* D è stata riportata anche in gabbiani ed aironi. In particolare per quanto riguarda i gabbiani tale evidenza è stata dimostrata in vicinanza di un focolaio in allevamenti di tacchini (Andersen, 1997).

Infine, la *serovar* E è stata rilevata in una ampia varietà di ospiti aviari e sembrerebbe non avere un serbatoio specifico. Inoltre, è stata dimostrata in ratiti con presenza di mortalità. In questo caso, il serbatoio causa di infezione è stato ipotizzato essere rappresentato da uccelli selvatici quali tortore e piccioni (Andersen *et al.*, 1998).

## **Potere patogeno**

I ceppi di *C. psittaci* possono essere classificati in due categorie: ceppi ad alta patogenicità e ceppi a bassa patogenicità. I primi causano epidemia acuta e morte nel 5-30% degli animali

infetti in quanto replicano più rapidamente; i secondi causano epidemie ad andamento più lento. Entrambi i tipi di clamidia hanno la capacità di diffondere rapidamente all'interno di un gruppo di animali. Al momento della comparsa della sintomatologia più del 90% degli animali presenti in un determinato allevamento hanno già sviluppato anticorpi nei confronti dell'antigene gruppo specifico. I ceppi a più alta patogenicità vengono isolati più spesso da tacchini e occasionalmente da uccelli selvatici che però non mostrano sintomatologia. Le clamidie isolate nel corso dei primi focolai caratterizzati da mortalità elevata appartenevano al sierotipo D (Winsor e Grimes, 1988; Andersen, 1991). Questi ceppi sono detti tossigeni poiché negli ospiti producono una malattia che rapidamente esita nella morte e che induce lesioni congestizio-infiammatorie a carico degli organi vitali. Tali ceppi possono causare mortalità anche nell'uomo. I ceppi a bassa virulenza causano epidemie a lenta diffusione con percentuali di mortalità inferiori al 5% se non complicate da infezioni secondarie. Questi ceppi sono frequentemente isolati in piccioni, anatre, e occasionalmente da tacchini, passeri e altri uccelli selvatici. I ceppi isolati dai tacchini in corso di focolai a bassa mortalità appartengono invece al sierotipo B ed E. Gli uccelli che si infettano con questi ceppi non sviluppano i danni vascolari che si osservano negli animali infettati con i ceppi tossigeni ad alta virulenza e non presentano sintomatologia clinica grave (Tappe *et al.*, 1989).

Alcune *serovars* come la E nei ratiti o la D nei tacchini sono quindi spesso fatali. Altre come la A causano patologie lievi nei psittaciformi in assenza di fattori stressanti, e spesso sono responsabili di infezioni croniche con eliminazione intermittente (Andersen *et al.*, 1998).

L'uomo solitamente è meno sensibile alle clamidie che più frequentemente si riscontrano nel piccione e nell'anatra, rispetto al pappagallo e tacchino, a meno che non ci siano altre condizioni predisponenti come per esempio l'immunodepressione (Wreghitt, 2003). La clamidiosi nel piccione, anatra e pappagallo si accompagna spesso ad infezioni secondarie, ad esempio a salmonellosi, tricomoniasi e malattie virali, con mortalità elevata (Calnek, 2001).

## **2. EPIDEMIOLOGIA**

### **2.1. SPECIE ANIMALI SENSIBILI ALLA CLAMIDIOSI**

Durante il corso degli anni sono state diverse le pubblicazioni aventi come tema le specie aviari suscettibili a *Chlamydia spp.*, di seguito riportiamo le più importanti.

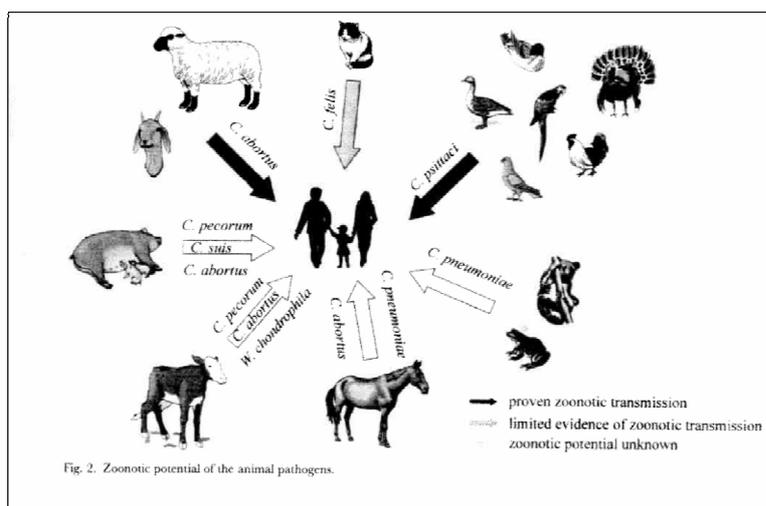
La prima lista di 70 specie aviari e 10 ordini, sia selvatiche che domestiche, sensibili alla clamidiosi è stata pubblicata da Meyer nel 1952. In seguito, tale lista è stata rispettivamente ampliata arrivando a considerare 120 specie e 12 ordini (Meyer, 1967) in un primo momento ed in seguito, 144 specie e 14 ordini (Burkhart e Page, 1971). Successivamente, Brand nel 1989 ha pubblicato che le specie coinvolte erano 159 appartenenti 15 ordini, ed infine Taday, nel 1998, ha esteso la lista a 376 specie e 29 ordini.

Recentemente, la presenza di *Chlamydia spp.*, è stata segnalata in 469 specie aviari appartenenti a 30 ordini di uccelli, principalmente psittaciformi, columbiformi, e passeriformi (Kaleta *et al.*, 2003). Quindi, potenzialmente quasi tutte le specie di uccelli possono essere considerate sensibili.

In alcuni casi, *C. psittaci* è stata dimostrata oltre che negli uccelli anche in mammiferi quali cane (Sprague *et al.*, 2009), cavallo (Theegarten *et al.*, 2008) e suino (Kauffold *et al.*, 2006). In tali specie si manifesta solitamente con aborti e polmoniti, mentre nel koala è stata riportata cheratocongiuntivite e patologie del tratto riproduttivo con infertilità (Girjes *et al.*, 1988; Wood e Timms, 1992).

In altre specie di mammiferi quali gatto, ovi-caprini, ruminanti selvatici, bovino, cavia, coniglio, sono state dimostrate altre specie di clamidia. Alcune di queste specie si ritrovano associate ad una singola specie ospite, come ad esempio *C. caviae* nelle cavie, mentre altre possono infettare più di un ospite (tabella 6). L'uomo è solo occasionalmente infetto da alcune delle diverse specie di clamidia, e possiamo considerarlo un ospite accidentale.

Inoltre, anche rettili e anfibi sono stati dimostrati ospiti occasionali di clamidie, in particolare di *C. pneumoniae*, anche se episodi di trasmissione all'uomo da parte di queste specie non sembra si siano verificati (Berger *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2000; Bodetti *et al.*, 2002; Jacobson *et al.*, 2004). Sebbene sia *C. pneumoniae* la specie predominante riscontrata in queste specie, nel passato in rane e tartarughe è stata rilevata anche *C. psittaci* (Wilcke, 1983; Vanrompay *et al.*, 1994a) (figura 4; tabella 6).



**Figura 4.** Potenziale zoonotico e differenti specie di *Chlamydia*.

**Tabella 6.** Specie di clamidia, relativo ospite principale ed occasionale con segni principali di malattia sia negli animali che nell'uomo (Bodetti *et al.*, 2002; Kutlin *et al.*, 2007; Gaede *et al.*, 2010; Rodolakis e Mohamad, 2010).

Specie di clamidia	Ospite principale	Ospite occasionale	Segni clinici negli animali	Malattia grave negli animali	Via di trasmissione principale nell'uomo	Segni clinici più frequenti nell'uomo	Malattia grave nell'uomo
<i>C. psittaci</i>	uccello	cane, cavallo, suino, bovino, koala	ipertermia, anoressia, letargia, diarrea	congiuntivite, polmonite, pericardite, morte	inalazione	simil influenzali	endocardite, encefalite, polmonite, morte
<i>C. abortus</i>	pecora, capra, bovino	suino, cavallo, cervo	aborto,, mortalità neonatale, epididimite	Metrite	inalazione	simil influenzali	polmonite, aborto, insufficienz a renale, <i>distress</i> respiratorio, morte
<i>C. pecorum</i>	piccoli ruminanti, bovino suino, koala	animali selvatici, piccione	enterite, congiuntivite, patologie del tratto genito-urinario, aborto, metrite, infertilità	encefalomielite, polmonite, artrite	contatto	non riportata	non riportata
<i>C. felis</i>	gatto	non riportato	congiuntivite	polmonite, salpingite cronica	contatto	Congiuntivite	endocardite, insuff. epatica
<i>C. caviae</i>	cavia	cavallo	congiuntivite, infezioni del tratto genitale,	non riportata	contatto	non riportata	non riportata
<i>C. pneumoniae</i>	uomo, koala, cavallo, <i>bandicoot</i> fasciato occidentale	rettili, anfibi	patologie respiratorie	non riportata	inalazione	polmonite, bronchite, asma	aterosclerosi
<i>C. suis</i>	suino	non riportato	enterite, congiuntivite, cheratocongiuntivite	polmonite, patologie genitali	non riportato	non riportato	non riportato

Gli uccelli rappresentano gli ospiti naturali di *C. psittaci*. Tra le specie di uccelli di interesse veterinario, più sensibili a *C. psittaci*, oltre ai psittaciformi e columbiformi, ritroviamo gli anseriformi, i galliformi, i passeriformi. Kaleta e collaboratori (2003), riportano queste percentuali di positività per *Chlamydia* nei diversi ordini, psittaciformi 45%, lariformi 28%, alciformi 25%, sfenisciformi 25%, anseriformi 21%, columbiformi 6%, galliformi 5%, passeriformi 2%.

Mentre in un *report* redatto per la Commissione Europea nel 2002, sono stati riportati interessanti dati riguardanti un monitoraggio di *C. psittaci*, in Germania nel periodo dal 1984 al 2000. Tali dati, relativi ad isolamenti, mostrano una prevalenza del 7,47% in piccioni, 7,25% in canarini e 14,85% in altri passeriformi. Inoltre, tra i psittaciformi è stata riscontrata una maggiore positività nei Cacatua rispetto agli ondulati (14,85% rispetto a 6,57%) (tabella 7).

**Tabella 7.** Rilevamento infezioni da *C. psittaci* in diversi tipi di uccelli dal 1984 al 2000 in Germania in seguito ad isolamento in colture cellulari BMG; (*Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* 16 aprile, 2002).

Bird species or bird group	Number of samples tested*	Negative**	Positive**	% Positive samples
Budgerigars	1066	996	70	6.57
Cockatiels	331	305	26	7.85
African grey parrots	310	291	19	6.13
Amazons	592	514	78	13.18
Macaws	152	137	15	9.87
Cockatoos	101	86	15	14.85
Other Psittacines	988	903	85	8.60
Pigeons	281	260	21	7.47
Canaries	138	128	10	7.25
Other Passeriformes	101	86	15	14.85
<b>Total</b>	<b>4061</b>	<b>3707</b>	<b>354</b>	<b>8.72</b>

\* Spleen, liver, swabs, faecal samples

\*\* Tests in buffy green monkey [BGM] cell cultures and *C. psittaci* detection either by Gimenez staining or immunofluorescence using a monoclonal antibody directed against the major outer membrane protein [MOMP].

Nei passeriformi sono pochi i casi di clamidiosi segnalati, Ketz e Carpenter (1999) riportano alcuni casi in canarini, mentre più recentemente sono stati segnalati da Ferreri *et al.*, 2007 e Circella *et al.*, 2011. Tra le *serovars* rilevate in queste specie ritroviamo la A (Andersen, 2005) e la B (Vanrompay *et al.*, 1993a). In Slovenia, in un monitoraggio sierologico dal 1991 al 2001 sono state evidenziate prevalenze più basse, dello 0,8% nei canarini, 0,9% nei fringillidi e 5,1% in uccelli selvatici (Dovc *et al.*, 2005).

Considerando le specie avicole allevate a scopo zootecnico, i tacchini e le anatre rappresentano le specie più sensibili. La specie pollo rappresenta quella maggiormente resistente all'infezione, infatti gli episodi di clamidiosi sono rari. Sperimentalmente, in questa specie gli animali giovani hanno manifestato resistenza nei confronti di *C. psittaci*, e spesso le infezioni sono transitorie ed

asintomatiche (Calnek, 2001). Tuttavia, l'infezione acuta si può manifestare clinicamente e causare mortalità soprattutto negli animali giovani. Sono stati segnalati casi clinici caratterizzati da congiuntivite, pericardite, periepatite ed aerosacculite (Barr *et al.*, 1986; Arzey G.G. e Arzey K.E., 1990).

Dai dati presenti in letteratura sembrerebbe che le galline ovaiole siano maggiormente sensibili. In Cina, è stata segnalata l'associazione tra la presenza di *C. psittaci* e ovidotto cistico (simile serovar C), con calo della deposizione (Zhang *et al.*, 2008). È stato segnalato inoltre l'isolamento di *C. psittaci* in galline ovaiole con quadri di calo della deposizione ed uova malformate con guscio molle, ascite, anoressia, dimagrimento, diarrea, letargia (Zhou *et al.*, 2010). Il genotipo D è stato recentemente segnalato in un macello di polli (Dickx *et al.*, 2010) ed in campioni di aria collezionati nelle camere di schiusa in un incubatoio in Belgio (Dickx e Vanrompay, 2011),

In Germania, il genotipo A è stato isolato da pollo in coinfezione con un'altro patogeno respiratorio quale *Mycoplasma gallisepticum*, ed associato a sintomatologia respiratoria simil-influenzale nell'uomo (Gaede *et al.*, 2008).

In Germania in allevamenti avicoli industriali sono state rilevate *Chlamydiaceae* non ancora classificate (Gaede *et al.*, 2008), mentre in Francia nuovi ceppi di clamidia, non ancora identificati, sono stati associati a polmoniti atipiche nell'uomo (Laroucau *et al.*, 2009b).

Il tacchino invece, risulta essere il più recettivo e sensibile, inoltre risulta essere la specie avicola più spesso coinvolta in *outbreak* con importanti ripercussioni per la salute umana.

Negli anni '50, in USA la clamidiosi era considerata endemica nel settore tacchino con gravi ripercussioni a livello produttivo, mentre negli '60-'70 la sua presenza è divenuta sporadica (Page, 1975; Anderson *et al.*, 1978; Vanrompay *et al.*, 1997).

La maggior parte dei focolai dimostrati nel tacchino sono stati causati da serovar D (Vanrompay *et al.*, 1993b). Tale serovar è considerata la più virulenta, infatti è correlata ad episodi con elevata mortalità, rispetto alle serovars B ed E caratterizzate da bassa mortalità. Anche le serovars E ed A hanno prodotto focolai di malattia nei tacchini. La serovar A si dimostra patogena per il tacchino ma meno della D (Andersen, 1997). La mortalità può arrivare al 10-30% con genotipi patogeni, mentre del 1-4% con ceppi scarsamente patogeni. La morbilità può variare, sempre a seconda del tipo di ceppo, dal 50%-80% al 5-20% con ceppi meno patogeni (Andersen e Vanrompay, 2000).

Gli anseriformi come i tacchini rappresentano delle specie molto sensibili alla clamidiosi. La clamidiosi delle anatre è stata riportata in Europa, Australia e USA. In USA i casi sono rari e

sostenuti da ceppi a bassa virulenza. Importanti epidemie di clamidiosi, caratterizzate da gravi ripercussioni economiche e sanitarie, si sono verificate nell'est Europa (Strauss *et al.*, 1967).

Negli anni '90 in Europa e Australia sono stati riportati focolai di malattia caratterizzati da segni clinici minimi o assenti e in questi casi la mortalità è stata ricondotta allo *stress* derivante dalla manipolazione degli animali o a malattie concomitanti causate da altri agenti patogeni. Nonostante tali scarse evidenze in ambito zootecnico, la clamidia ha rappresentato un problema di sanità pubblica a causa di infezioni nel personale addetto alla manipolazione degli animali (Arzey *et al.*, 1990; Martinov e Popov, 1992; Newman *et al.*, 1992; Hinton *et al.*, 1993; Andersen e Vanrompay 2000). Di recente, in Francia, sono stati riportati cinque casi gravi di ornitosi in personale che aveva avuto dei contatti con queste specie (Laroucau *et al.*, 2009a).

Nelle anatre la *serovar* più frequentemente riscontrata è la C, con morbilità tra il 10 e l'80%, e mortalità tra 0-30% a seconda dell'età e della concomitante presenza di altre patologie (Vanrompay *et al.*, 1993; Andersen e Vanrompay, 2000). Inoltre è stato segnalato anche il genotipo E/B (Geens *et al.*, 2005a; Gaede *et al.*, 2008) che sembra avere un potenziale zoonosico come segnalato di recente in altre specie (Harkinezhad *et al.*, 2007).

Evidenziata anche nelle oche, la clamidiosi si presenta in questa specie con aspetti sia clinici che necroscopici comparabili a quelli delle anatre (Strauss *et al.* 1967; Kaleta *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda i columbiformi numerosi studi epidemiologici confermano che il colombo è una specie comunemente infetta da *C. psittaci*. La clamidiosi nei piccioni si può considerare endemica. Numerose indagini sierologiche ed alte prevalenze indicano che questa specie è un'importante serbatoio. I dati riguardanti la sieropositività per *C. psittaci* nei piccioni di città in 11 paesi europei oscillano dal 19,4% al 95,6% (Magnino *et al.*, 2009). Mentre la positività per *C. psittaci* mediante isolamento si aggira tra 1,2% al 57,1 (Trap, 1986; Magnino *et al.*, 2009). Dal 2003 al 2007 dati ottenuti mediante PCR riportano prevalenze dal 3,4% al 52,6% (Magnino *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2010). In Inghilterra si riportano invece prevalenze del 37,5% in colombi di città (Sharples e Baines, 2009).

Studi svolti nelle più grandi città europee riportano diversi e differenti valori di prevalenza per *C. psittaci* in piccioni, questi possono variare dal 7,9% di Amsterdam (Heddema *et al.*, 2006a) al 15,8% di Zagreb (Prukner-Radovic, 2005) fino al 52,6% di Madrid (Vázquez *et al.*, 2010).

Studi recenti condotti in città italiane, riportano sieropositività del 41,6% a Venezia, del 65% a Padova e 46,7% a Verona (Ceglie *et al.*, 2007).

Nei colombi oltre a *Chlamydia psittaci* sono state segnalate anche altre specie di *Chlamydia*, come *C. pecorum* (Tanaka *et al.*, 2005).

Positività per *Chlamydia* sono state riportate anche nel fagiano. In queste specie sono segnalati pochi focolai, e sono state evidenziate ed isolate clamidie a bassa patogenicità (Bejleri e Berxholi, 1987; Vanrompay *et al.*, 1993). Indagini sierologiche in Illinois ed Iowa evidenziano la scarsa diffusione di clamidia in questa specie (Grimes, 1991), anche se sono state riportate segnalazioni nell'uomo in seguito a contatti con fagiani (Strauss *et al.*, 1967). Elevate sieroprevalenze (96%) sono riportate in Germania (Ruppner, 1984), mentre in Slovacchia le positività sierologiche oscillano tra 31,5 il 40,4% (Tràvníček *et al.*, 2002).

Anche i ratiti rappresentano specie sensibili, in particolare alle *serovars* tipiche di uccelli selvatici quali la *serovar* E (Andersen *et al.*, 1998). Questo tipo di *serovar* può essere considerata ad alta virulenza in questa specie.

Casi di clamidiosi con elevata mortalità in struzzi adulti con sintomatologia acuta sono stati segnalati in Louisiana (Camus *et al.*, 1994), mentre in Namibia è stato descritto un focolaio in animali giovani da poco introdotti nell'allevamento, la cui origine è probabilmente da ricondurre a probabili contatti con uccelli selvatici nei luoghi di abbeverata e alimentazione (Kolb *et al.*, 1993).

Altri volatili sensibili alla clamidiosi sono rappresentati dai colini della Virginia (*Colinus virginianus*). Nel corso di un focolaio sostenuto da *C. psittaci*, sono stati coinvolti numerosi capi, in particolare soggetti giovani di circa 2-4 settimane di età con mortalità elevata del 40-50%. Durante questo focolaio è stato riportato anche il contagio delle persone che gestivano l'allevamento e che più avevano avuto contatti con questi animali (Erbeck e Nunn, 1999).

Infine, un'altra specie in cui è stata osservata recentemente è il pavone. La sensibilità di questa specie è stata dimostrata in Cina, dove è stata segnalata per la prima volta la presenza di una *C. psittaci* simile al genotipo B da tamponi faringei e polmone. Anche questo rilievo è considerato molto importante in quanto sono stati colpiti anche gli allevatori con *distress* respiratorio e forme di polmonite atipica (Yang *et al.*, 2011).

## **2.2. MODALITÀ DI TRASMISSIONE**

Le vie di trasmissione principali sono rappresentate dalla via orizzontale e dalla via verticale. La trasmissione per via orizzontale rappresenta la via primaria (Meyer *et al.*, 1942; Davis, 1955). La trasmissione di *C. psittaci* per via verticale invece è rara, e attraverso tale via è stata documentata in alcune specie di volatili, tra cui anatre, pappagalli, polli, oca delle nevi, gabbiani (Vanrompay *et al.*, 1995).

La clamidia viene escreta nelle feci, e nelle secrezioni respiratorie dei volatili infetti, viene trasmessa tra volatili per inalazione di aerosol contaminati o polveri, per ingestione e per contatto con materiale ed attrezzature contaminate. L'eliminazione fecale può protrarsi per diversi mesi ed essere continua, ma può anche avvenire in modo intermittente, e può essere attivata da fattori di *stress* quali sovraffollamento, stato di riproduzione e allevamento dei nidiacei, trattamenti antibiotici, manipolazioni, trasferimenti, cambi di alimentazione, carenze nutritive, infezioni batteriche o virali concomitanti.

L'essudato nasale è molto importante come via principale di diffusione della malattia nei tacchini, la ghiandola nasale laterale rappresenta infatti il maggior sito di replicazione della clamidia, viene colonizzata nelle prime fasi dell'infezione e può rimanere infetta per diverse settimane (Vanrompay *et al.*, 1995; Andersen, 1997) od oltre 60 giorni (Tappe *et al.*, 1989).

La clamidia può essere anche trasmessa nel nido come dimostrato in molte specie quali columbiformi, cormorani, aironi, attraverso l'alimento, il rigurgito o il latte del gozzo nel caso dei colombi.

La trasmissione di clamidia può anche avvenire attraverso artropodi vettori (Longbottom e Coulter, 2003), come ipotizzato anche da Circella *et al.*, 2011, nel caso di canarini altamente infestati da *Dermanyssus gallinae*. Anche in tacchini durante una epidemia di clamidiosi nel sud della Carolina è stato ipotizzato che l'alta infestazione con Simulidi fosse coinvolta nella trasmissione dell'infezione (Page, 1975). La trasmissione tramite vettori è comunque ritenuta di importanza trascurabile e da dimostrare sperimentalmente.

La clamidia può essere introdotta in un gruppo "free" attraverso gli uccelli selvatici, come dimostrato dalle analisi dei sierotipi. Tra gli uccelli selvatici, è stata dimostrata in 150 specie e 15 ordini, tra cui piccioni, gabbiani, fulmari, uccelli acquatici, aironi, garzette, tortore, uccelli da canto (Kaleta *et al.*, 2003).

Sembrerebbe che i ceppi isolati da queste specie, in Nord America, spesso infette con *serovar* B ed E, non siano patogeni per queste specie, ma lo siano invece per l'uomo ed altre specie. Ad esempio sono stati riportati casi di clamidiosi in ratiti tra Texas e California causati da *serovar* E, dimostrando la suscettibilità di questi animali a un ceppo di frequente riscontro in uccelli selvatici, come peraltro ipotizzato anche per i tacchini (Andersen, 1997).

Brand nel 1989, ha preso in esame il diverso comportamento alimentare e le abitudini delle specie ospiti con la trasmissione. L'anatra domestica e i tacchini che condividono con gli uccelli selvatici *habitat* acquatici e terreni umidi dove questi eliminano alte concentrazioni di microrganismi, possono acquisire l'infezione attraverso l'acqua stagnante. Mentre gli uccelli granivori, come piccioni, tortore, fagiani, e passerii, possono infettarsi per inalazione di polveri di

feci di animali da cortile e nei siti di stoccaggio del grano. Anche il consumo di carcasse infette può trasmettere *C. psittaci* a specie che sono predatori o saprofaghe di altri uccelli. La trasmissione interspecie negli uccelli arboricoli può essere correlata al loro comportamento gregario e allo stretto contatto reciproco.

### **2.3. ASPETTI DEL COLOMBO DI CITTÀ**

Si definisce animale sinantropo qualsiasi specie animale che viva negli stessi territori in cui si è insediato l'uomo, senza vincoli di dipendenza diretta da lui. In questa categoria vi rientrano tutte le comuni specie selvatiche che vivono a stretto contatto con l'uomo, diffuse sia nelle aree urbane che rurali. Tra queste specie sinantropiche possiamo ricordare, oltre a gatti, storni, gabbiani, tortore, ratti, anche i colombi di città.

I colombi appartengono all'ordine dei Columbiformi e possiamo individuarne quattro diverse varietà, selvatico, torraio, di città e domestico.

Il colombo definito selvatico (*Columba livia livia*), è presente oramai in numeri esigui nell'Italia meridionale ed insulare, lungo tratti di costa rocciosa delle isole ed in alcune zone dell'Appennino centro-meridionale. A causa della pressione selettiva svolta dal colombo di città rimane da chiarire che si tratti effettivamente di individui geneticamente puri. Secondo diversi Autori è probabilmente l'unico elemento ancestrale comune a tutte le razze domestiche di colombi (Toschi, 1939; Goodwin, 1970; Baldaccini, 1986).

Il colombo torraio, è un piccione selvatico, definito con tale termine per l'abitudine di sfruttare torri e campanili come siti di nidificazione.

Colombo di città o di piazza o urbano (*Columba livia* variante domestica, Gmelin, 1789), il colombo che normalmente ritroviamo nelle nostre città. Si rinviene usualmente negli agglomerati urbani dove forma estesi gruppi caratterizzati da una livrea di colorazione variabile. La sua origine non è totalmente discendente dall'inurbamento del colombo selvatico, ma deriva dall'incrocio di quest'ultimo con colombi di varia provenienza e per lo più con razze diverse di origine domestica. La riproduzione è indipendente dall'uomo, mentre l'alimentazione in buona parte è antropica.

Da ultimo, il colombo domestico, colombo allevato e selezionato dall'uomo in razze diverse a scopo ornamentale e alimentare di cui viene controllata direttamente l'alimentazione e la riproduzione. Rientra in questa categoria anche il colombo viaggiatore.

Le popolazioni selvatiche e quelle domestiche differiscono tra loro, oltre che per origini e abitudini di vita, anche per morfologia e caratteristiche genetiche, fisiologiche, comportamentali

e riproduttive. Da un punto di vista morfologico le differenze maggiori riguardano i caratteri della livrea con forte omogeneità nelle popolazioni selvatiche, mentre le popolazioni urbane presentano invece livree con varie combinazioni di colori.

Questo si evidenzia anche in gruppi di colombi abitanti città diverse, poiché le differenti popolazioni sono il risultato di episodi di formazione ben distinta. Spesso le colonie sono stanziali in quanto ritrovano tutte le fonti di cibo per il sostentamento nella zona occupata. Per quanto riguarda la riproduzione, nel colombo di città la stagione riproduttiva è estesa a tutto l'anno, con picchi di deposizione tra marzo e giugno, e con una ripresa in autunno, con un periodo di incubazione di 17-18 giorni. La maturità sessuale viene raggiunta a sei mesi. Dal punto di vista comportamentale è caratterizzato da una attività di volo limitata, in quanto non è necessaria la ricerca di cibo che viene tratto direttamente dalla città, e da una diminuita "distanza di fuga" avvicinandosi esso stesso all'uomo riconoscendone i movimenti intenzionali di distribuzione del cibo (Ballarini *et al.*, 1989; Ghigi, 1989).

Considerato del tutto distinto dal punto di vista tassonomico ed ecologico, il colombo di città è riconducibile ad una variante domestica di colombo, *Columbia livia* forma domestica.

Diversi fattori hanno favorito la sopravvivenza e la riproduzione di questi uccelli, e di conseguenza l'insediamento e l'adattamento nei centri abitati. Tra questi possiamo ricordare lo sviluppo delle attività dell'uomo come le coltivazioni, i disboscamenti, l'inurbamento dei centri rurali, la presenza di parchi, giardini, fontane e le trasformazioni socio-economiche, che hanno favorito la facilità di reperimento di abbondanti risorse trofiche, un fotoperiodo favorevole in quanto allungato per la presenza di illuminazione artificiale, disponibilità di molti siti di nidificazione ed escursioni climatiche contenute.

In particolare, hanno anche contribuito all'aumento di questa popolazione animale le variazioni degli aspetti culturali della società moderna e la struttura urbanistica della città, che hanno messo a disposizione le costruzioni con i loro anfratti per nidificare, diminuendo così le competizioni intraspecifiche e la predazione, integrati dall'usanza di fornire alimento da parte dei cittadini. Tra questi elementi, a Venezia, ha contribuito maggiormente a questo incremento l'atteggiamento tollerante dei veneziani e dei turisti nei confronti di questa specie nella somministrazione di cibo. Di conseguenza, l'ambiente urbano e l'adattamento ad esso, ha permesso ai colombi l'espansione di areale, divenendo cosmopoliti e presenti in tutte le più importanti città europee, con densità maggiori soprattutto nei centri storici, città monumentali e turistiche, tra cui Venezia. Tra le specie sinantropiche il colombo è tra quelle che ha conosciuto un forte aumento demografico, raggiungendo numeri elevati di individui per metro quadrato. In Italia sono stati effettuati diversi censimenti, a Venezia si sono stimati nel 1996 punte da un minimo di 70.000 individui fino ad

un massimo di 116.000. Negli ultimi anni la popolazione risulta diminuita, passando da  $19.124 \pm 2.750$  a marzo 2010, e  $3.2550 \pm 9.013$  a novembre 2010 (dati forniti da Unità Locale Socio Sanitaria 12 Veneziana, Dipartimento di Prevenzione). La elevata densità di popolazione può aumentare il rischio di diffusione e mantenimento dell'infezione nella popolazione e quindi un incremento di rischio in sanità pubblica. Tutto ciò può giustificare le misure di contenimento intraprese in alcuni comuni volte a ridurre le popolazioni di colombi. L'ex Istituto Nazionale della Fauna Selvatica colloca la soglia di densità tra i 300-400 colombi/kilometro quadrato, al di sopra della quale si verifica uno *stress* ambientale e sanitario della specie e per cui sono necessarie misure di contenimento.

Oltre agli aspetti positivi legati alla presenza del colombo nelle città, vanno presi in considerazione anche gli aspetti negativi, tanto maggiori quanto più è elevata la popolazione di colombi, relativi ai danni ambientali (patrimonio architettonico-monumentale), ecologici (all'agricoltura) e sanitari.

Il rischio sanitario di trasmissione di zoonosi ha un rilievo importante soprattutto quando vi sono situazioni predisponenti quali il sovraffollamento per cui aumentano i rischi di infezione sia per le popolazioni di colombi ferali, in quanto vi è una maggiore suscettibilità alle malattie infettive e parassitarie, che per l'uomo. Certe fasce di popolazione sono considerate più a rischio, ovvero i soggetti immunocompromessi, in continuo aumento, bambini, anziani, donne in gravidanza, ospedalizzati, e di conseguenza luoghi potenzialmente a rischio sono rappresentati da ospedali, scuole, mercati, bar e ristoranti all'aperto, giardini, piazze (Ghigi, 1989). I rischi di potenziali zoonosi derivano dai problemi di carattere igienico-sanitario dovuti alla fecalizzazione ambientale.

In letteratura esistono molti dati che riguardano l'isolamento dal colombo di agenti zoonosici, ma il rischio risulta minimo se si rispettano le comuni norme di igiene, a meno che non si tratti di soggetti immunocompromessi. Uno studio epidemiologico del 2004 (Haag-Wackernagel e Moch) ha messo in evidenza i rischi per la salute umana posti dai piccioni urbani. Esistono 60 patogeni che questa specie può trasmettere, 5 virus, 9 batteri, 45 funghi, e un protozoo, ma sono solo questi cinque quelli realmente trasmessi all'uomo in seguito a stretto contatto con questi uccelli, quali *Chlamydia psittaci*, 47 casi su 176, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis*, e meno frequentemente *Salmonella enterica* (1) e *Toxoplasma gondii* (1). Anche ectoparassiti quali zecche molli, come vettore di *Coxiella* (*Argas reflexus*), acari (*Dermanissus gallinae*), e la pulce del piccione (*Ceratophyllus columbae*) sono stati riportati come responsabili di allergie e lesioni cutanee nell'uomo (Haag-Wackernagel e Spiewak, 2004; Haag-Wackernagel e Bircher, 2010).

Ad oggi, il numero di possibili patogeni per l'uomo rilevati nei colombi di città sembra ampliato a 110 microrganismi. Solo sette di questi sono stati documentati come trasmessi all'uomo causando 230 casi di malattia, di cui 13 fatali. Di rilievo è emerso che di questi 230, 101 sono stati attribuiti a *C. psittaci* di cui due casi fatali (Magnino *et al.*, 2009 dati supplementari in accordo con Haag-Wackernagel).

## **2.4. UOMO E CLAMIDIA**

Al genere *Chlamydia* appartengono principalmente tre specie considerate patogene per l'uomo, *C. psittaci*, *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*. Altre due specie però sono state correlate a casi sporadici di clamidiosi, quali la *C. abortus* e *C. felis*. La *C. abortus*, identificata in passato come ceppo ovino di *C. psittaci*, è responsabile dell'aborto enzootico in piccoli ruminanti, ed è stata associata a casi sporadici di aborto in donne gravide, quali ad esempio, mogli di pastori o allevatori, o impiegate al macello venute a contatto con animali infetti. Sporadicamente sono state segnalate anche congiuntiviti ed infezioni del tratto respiratorio da *C. felis* (Schachter *et al.*, 1969; Cotton e Partridge, 1998).

### **2.4.1. Storia della Psittacosi**

La malattia, nell'uomo e negli psittaciformi, era nota con il nome di psittacosi o febbre del pappagallo in quanto inizialmente descritta in queste specie e diagnosticata in uomini che avevano avuto dei contatti con questi volatili. Con il termine ornitosi, descritto per la prima volta da Meyer nel 1941, invece si usavano descrivere le infezioni umane contratte da uccelli non appartenenti all'ordine dei psittaciformi, e apparentemente meno gravi rispetto a quelle derivanti da questo ordine. In particolare, il termine ornitosi era utilizzato in riferimento ai piccioni, e Meyer descrisse il primo caso di ornitosi in seguito al contatto con queste specie, in una famiglia di New York, dimostrando che i piccioni rappresentavano una fonte di infezione per l'uomo. Attualmente psittacosi e ornitosi sono considerate il nome di una unica malattia.

La psittacosi od ornitosi è una zoonosi che nell'uomo si manifesta più frequentemente sotto forma di affezione respiratoria acuta febbrile.

I primi casi di psittacosi trasmessi da pappagalli domestici risalgono al 1879, quando un medico svizzero, *Jacob Ritter*, descrisse sette casi di polmonite atipica, di cui tre mortali, nella sua famiglia e li mise in relazione all'introduzione nell'ambiente familiare, in particolare nello studio della casa del fratello ad Uster in Svizzera, di alcuni pappagalli e fringuelli acquistati da un

importatore. Questi casi vennero da lui definiti inizialmente con il termine di "pneumotifo". La storia epidemiologica ci riporta che gli uccelli erano stati importati da Amburgo e non mostravano sintomatologia clinica, né lesioni anatomo-patologiche ad un successivo esame necroscopico.

*Ritter*, oltre ad aver riconosciuto la fonte di infezione, ne determinò il periodo di incubazione e la non trasmissibilità della malattia da uomo a uomo. Negli anni successivi, tra il 1892 e il 1893 a Parigi si verificò una epidemia di polmoniti in soggetti che avevano avuto contatti con pappagalli provenienti dall'Argentina e proprio a seguito a tali episodi fu denominata psittacosi. Tale termine fu coniato dalla parola greca pappagallos, psittakos, e fu per la prima volta applicato da *Morange* (*Morange*, 1895).

Successivamente, tra il 1929 e il 1930, molti casi umani furono correlati all'importazione di psittaciformi infetti dal Sud America all'Europa e Nord America, in particolare dall'Argentina nazione che svolgeva un importante ruolo nel commercio internazionale di uccelli. In seguito, la malattia è stata dimostrata anche in California e negli USA a seguito di contatto con specie aviari differenti dai psittaciformi, quali piccioni selvatici, anatre e tacchini. In particolare, tra il 1930 e il 1938 diversi casi di clamidiosi, si sono verificati nelle isole *Faroe* e correlati a contatti con giovani fulmari (*Fulmarus glacialis*) catturati per il consumo alimentare, a seguito di ciò la caccia a tali uccelli fu proibita fino al 1954 (*Rasmussen-Ejde*, 1938).

Negli anni '50 in concomitanza con le epidemie in allevamenti di tacchini negli Stati Uniti, furono dimostrate infezioni respiratorie nei lavoratori delle industrie avicole (*Meyer e Eddie*, 1953, *McCulloh*, 1955; *Dickinson et al.*, 1957; *Graber e Pomeroy*, 1958). Successivamente l'incidenza di tali forme respiratorie è diminuita. Anche se nel 1978 anche alcuni studenti di Medicina Veterinaria sono stati coinvolti in un focolaio. Ulteriori casi, correlati all'industria avicola, sono stati riportati sia negli USA che in Europa tra gli anni '80 e '90. A seguito di tali evidenze, la psittacosi è stata considerata una zoonosi di tipo occupazionale, malattia professionale, per la quale è obbligatoria la denuncia, come da pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale del 19 marzo 2010, lista I (malattie la cui origine lavorativa è di alta probabilità) e gruppo 3 (malattie da agenti biologici esclusi i tumori). Proprio per questo motivo opportune precauzioni dovrebbero essere intraprese quando vengono manipolati animali infetti o materiale contaminato soprattutto nelle categorie professionali a rischio quali Medici Veterinari, laboratoristi, operatori dei macelli, custodi degli animali, allevatori, operatori di zoo, proprietari di *pet bird* e impiegati di *pet shop*. Oltre a queste categorie occupazionali, altre categorie a rischio possono essere rappresentate dai giovani, bambini, anziani, donne in gravidanza, ed immunocompromessi, come malati di HIV e trapiantati.

Nel corso degli anni, la malattia nell'uomo è stata spesso associata a contatti diretti con specie di uccelli ornamentali in particolare con psittaciformi, oltre che con specie avicole infette allevate a scopo zootecnico industriale, come tacchini e anatre, piuttosto che polli. Meno frequenti risultano essere i casi umani correlati ai columbiformi, anche se rari casi di infezione mortale sono stati correlati a contatti con queste specie. Negli USA, la maggior parte dei casi sono correlati ai *pet birds* ed al pollame. La fonte principale di infezione nell'uomo è rappresentata dai psittaciformi, seguiti da piccioni, oche e anatre (Potter *et al.*, 1983).

#### **2.4.2. Genotipi associati a clamidiosi nell'uomo**

Tutti i genotipi possono essere considerati potenzialmente trasmissibili all'uomo, sebbene il genotipo A ed il D si sono dimostrati maggiormente patogeni. Recentemente, in Francia, sono stati segnalati quadri clinici di grave polmonite originati da probabili nuovi ceppi di clamidie e correlati ad allevamenti di anatre (Laroucau *et al.*, 2009a). In Cina sono stati riportati casi di infezione umana non fatale sostenuti da genotipi simili al B e correlati a contatti con pavoni (Yang *et al.*, 2011).

Purtroppo in medicina umana la genotipizzazione non è ancora una pratica comune, per tale motivo la letteratura risulta carente di tali importanti dati epidemiologici.

Per quanto riguarda le segnalazioni riguardanti i genotipi solitamente associati al colombo, quali il B, E ed E/B, i dati infatti sono carenti, anche se è dimostrata la trasmissione di quest'ultimo genotipo da un pappagallo cenerino (*Psittacus erithacus*) all'uomo, in cui la sintomatologia è risultata essere piuttosto lieve dando una certa rilevanza al ritrovamento di questo genotipo anche nei colombi (Harkinezhad *et al.*, 2007). Il genotipo B è stato dimostrato nel 30% di casi di psittacosi in Olanda, anche se il campione esaminato consisteva solamente di 10 casi (Heddema *et al.*, 2006b). Il ruolo zoonosico più rilevante sembra essere svolto dai psittaciformi e dai genotipi ad essi correlati (Heddema *et al.*, 2006b; Kaibu *et al.*, 2006; Harkinezhad *et al.*, 2007) in particolare il genotipo A è considerato quello che riveste maggiore importanza zoonotica (Wreghitt e Taylor, 1988).

Tuttavia, sembra che gli ultimi casi umani registrati siano più legati al pollame domestico che non ai psittaciformi, forse anche in funzione della notevole numerosità di animali allevati (Laroucau *et al.*, 2009a; 2009b).

A tale proposito si può menzionare il caso di trasmissione di tre differenti genotipi di *C. psittaci* D, F, E/B, e la trasmissione simultanea di tali genotipi dai tacchini infetti ad un veterinario, il quale ha accusato solamente una lieve sintomatologia respiratoria (Van Droogenbroeck *et al.*,

2009). Un ulteriore caso riportata la presenza di tre differenti *serovars* di *C. psittaci* in operatori di un incubatoio di tacchini e polli in Belgio (Dickx e Vanrompay, 2011).

### 2.4.3. Uomo, Clamidia e Columbiformi

Il colombo è la specie aviaria sinantropica per eccellenza ed è presente con colonie, anche considerevoli, in tutte le grandi città occidentali. In letteratura sono circa un centinaio i casi di ornitosi in cui gli Autori riportano relazioni tra l'infezione umana e il colombo (Haag-Wackernagel e Moch, 2004; Magnino *et al.*, 2009). Negli Stati Uniti sono segnalati tre casi di ornitosi in una famiglia Cambogiana a seguito di contatto con piccioni selvatici (Henry *et al.*, 1986). Data l'elevata diffusione di tale specie aviaria risulta piuttosto comune trovare un possibile o probabile contatto con tali uccelli anche se nella maggior parte dei casi non sono presenti informazioni sulla genotipizzazione del ceppo coinvolto che possano dimostrare con forza tali relazioni. Un classico esempio di questo può essere rappresentato da un *outbreak* in una clinica universitaria, dove studenti e professori della Facoltà di Medicina Veterinaria sono rimasti coinvolti. Tra le specie aviarie stabulate vi erano alcuni pappagalli e colombi che sono risultati positivi per *C. psittaci*, e quindi potenzialmente fonte dell'infezione. Uno studio più approfondito ha dimostrato però che il genotipo coinvolto era l'A, evidenziato nei pappagalli e non nei colombi (Heddema *et al.*, 2006b).

Uno studio recente riporta che il 53% di tutti i casi riportati di malattia nell'uomo sono stati correlati ad uno stretto contatto con piccioni di città o con i loro escreti. Circa il 27% dei casi sono stati correlati a motivi occupazionali, a polveri contaminate inalate, mentre pochi casi (15%) sembrano essere conseguenti alla manipolazione di piccioni malati o morti. L'abitudine di somministrare cibo ai piccioni sembra che sia all'origine dell'11% dei casi studiati (Magnino *et al.*, 2009).

Contatti transitori con piccioni ferali sono stati riportati in 43 casi di malattia nell'uomo, undici di questi erano bambini e sei pazienti immunodepressi (Wreghitt, 2003).

Nei casi correlati a contatti transitori, la modalità di infezione più probabile sembra essere riconducibile all'abitudine di consumare il pranzo in parchi frequentati da piccioni, a camminare all'interno uno stormo di piccioni, o infine a risiedere in un quartiere frequentato da piccioni. Sicuramente tali ipotesi, seppur plausibili, alla luce della numerosità di colombi di città e del loro, ampiamente dimostrato, stato di infezione per *C. psittaci* forse non hanno riscontro nell'epidemiologia di infezioni sostenute da *Chlamydia psittaci* nell'uomo.

La diffusione del colombo di città può anche spiegare il dato che solamente in una percentuale limitata dei casi, 5%, non risultano informazioni sull'eventuale contatto diretto con piccioni (Harkinezhad *et al.*, 2009b; Magnino *et al.*, 2009).

Infine, solamente in alcuni casi le *serovars* isolate dall'uomo, fanno presupporre il reale coinvolgimento di questa specie.

Sebbene la prevalenza di clamidia in piccioni ferali in Europa sia elevata, il rischio di contrarre l'ornitosi da questi uccelli risulta difficile da quantificare. L'importanza dei colombi come fonte zoonosica è poco compresa, e nonostante l'ampia distribuzione di *C. psittaci* in piccioni di città e la varietà di contatti possibili di questa specie con l'uomo, sono solo pochi i casi riportati in tutto il mondo in cui sia stata accertata la trasmissione. Per tale motivo il rischio di trasmissione all'uomo dai colombi di città sembra essere moderato (Zweifel *et al.*, 2009).

Una possibile motivazione potrebbe essere ascritta alla scarsa patogenicità dei ceppi di clamidia presenti nel colombo, o comunque meno patogeni dei ceppi solitamente dimostrati in pappagalli, anatre e tacchini.

I piccioni possono veicolare diversi genotipi di *C. psittaci*, tra cui il più comune risulta essere il B (Heddema *et al.*, 2006a), ulteriori genotipi sono l'E ed E/B, che sono comunemente considerati meno patogeni per l'uomo rispetto a quelli solitamente rinvenibili negli psittaciformi (Vanrompay *et al.*, 1994b; 1995). Anche i genotipi A, C e D sono stati dimostrati nei piccioni (Dickx *et al.*, 2010).

A dimostrazione del fatto che i genotipi prevalenti nel colombo possano causare forme cliniche di lieve entità nell'uomo una recente segnalazione riporta una lieve forma respiratoria causata da genotipo E/B, e trasmessa da un pappagallo cenerino (*Psittacus erithacus*) (Harkinezhad *et al.*, 2007). Questo potrebbe anche spiegare la bassa incidenza di casi di psittacosi correlati a colombi, in quanto causando forme cliniche lievi potrebbero essere sottovalutate e quindi sottodiagnosticate.

Quindi la genotipizzazione può risultare una metodica importante al fine di determinare la prevalenza dei vari genotipi che causano patologia nell'uomo e quindi correlare questi con la specie aviare serbatoio.

Altre ai colombi il rischio di infezione per l'uomo potrebbe essere anche rappresentato da specie aviari selvatiche che possono rappresentare un serbatoio naturale di clamidia (Holzinger-Umlauf *et al.*, 1997).

Quindi risulta difficile valutare il rischio di infezione trasmessa da piccioni ferali, soprattutto se contatti transitori rappresentano una possibile fonte di contagio (Magnino *et al.*, 2009).

Alcune categorie professionali possono presentare maggior rischio di contatto come per esempio i lavoratori esposti a polveri ed aerosol contaminate con clamidia, particolarmente presenti nei sottotetti, soffitte, e grondaie dove vi può essere accumulo di deiezioni di piccione. Per esempio in un locale chiuso, il solo battito delle ali della colonia può contribuire alla diffusione dell'aerosol contaminato e quindi costituire un rischio.

Anche l'usanza di somministrare alimento ai piccioni può esporre alla clamidia in quanto gli uccelli si aggregano e diffondono polveri contaminate con lo sbattimento delle ali. I contatti transitori con piccioni ferali che hanno successivamente dato origine alla malattia nell'uomo sono difficili da documentare ed identificare, ma potrebbero essere rilevanti, come dimostrato dall'occorrenza della malattia in persone solo temporaneamente esposte a uccelli infetti o aerosol contaminato. A questo proposito si può ricordare il caso di alcuni doganieri transitoriamente esposti a pappagalli importati e di alcuni Medici Veterinari in visita in impianto di trasformazione di pollame, oppure alcuni visitatori di mostre di volatili o di giardini zoologici (De Schrijver, 1995; Palmer *et al.*, 1981; Koene *et al.*, 2007; Belchior *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2008).

#### **2.4.4. La malattia nell'uomo**

L'infezione nell'uomo può avvenire per via aerogena attraverso l'inalazione di aerosol infetto, o manipolazione di piume, feci essiccate, tessuti-carni di animali infetti, o per usanze poco consuete di contatto tra bocca e becco con il proprio *pet bird*.

La trasmissione interumana è rara, può avvenire solo nelle forme polmonari più gravi mediante l'espettorato (Ito *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 1997). Il periodo di incubazione della clamidiosi è variabile tra un periodo compreso tra i 5-14 giorni. Sono segnalati anche periodi di incubazione fino a quattro settimane. La malattia può decorrere in forma inapparente, oppure assumere caratteri di patologia sistemica simil-influenzale di grado variabile con interessamento dell'apparato respiratorio, fino ad arrivare a grave polmonite atipica con tosse non produttiva, difficoltà respiratorie ed algia. Talvolta sono descritte complicanze neurologiche con meningite-encefalite, oltre che cardiovascolari, cutanee, renali, epatiche.

Le manifestazioni cliniche sono estremamente variabili, in alcuni individui l'infezione decorre in maniera asintomatica e può essere documentata mediante la ricerca di anticorpi specifici. Sintomi frequenti sono astenia, artromialgie, anoressia, nausea, vomito, dolori addominali, epistassi, fotofobia e cefalea.

In alcuni casi è stato osservato un esantema di tipo maculare (macchie di *Horden*) non pruriginoso, dovuto al danno endoteliale conseguente allo stato tossiemico tipico della malattia. La diagnosi clinica di psittacosi in medicina umana può rappresentare alcune difficoltà specie nelle forme simil-influenzali. Rappresenta un reperto diagnostico il prelievo di sangue in fase acuta, subito dopo la comparsa dei sintomi, e convalescente, effettuato a due settimane dal primo prelievo, con incremento del titolo anticorpale di almeno quattro volte. I trattamenti antibiotici a volte possono diminuire la risposta anticorpale, per cui un terzo siero ottenuto 4-6 settimane, può essere d'aiuto nel confermare la diagnosi.

Si definisce clamidiosi confermata se il paziente mostra malattia clinica compatibile con psittacosi con conferma laboratoristica. La diagnosi può essere confermata con l'isolamento da campioni clinici quali *sputum*, liquido pleurico, tessuti, sangue, o in alternativa attraverso la dimostrazione dell'aumento di almeno quattro volte il titolo anticorpale (IgG) verso *C. psittaci*, mediante fissazione del complemento o microimmunofluorescenza tra siero acuto e siero convalescente.

Viene definito, invece, caso probabile se il titolo anticorpale (IgM) è maggiore o uguale a 32 nel campione di siero dopo la comparsa dei sintomi oppure si rileva DNA di *C. psittaci* in campione respiratorio tramite PCR (Smith *et al.*, 2010).

E' stata ipotizzata inoltre la responsabilità di *Chlamydia* come potenziale oncogeno e anche nella genesi dei processi aterosclerotici delle coronarie (Crepaldi e Baritussio, 2002).

Osservazioni recenti, hanno correlato il ruolo di *Chlamydia psittaci* alla patogenesi dei linfomi della zona marginale degli annessi oculari di tipo MALT, con regressione della patologia dopo terapia con doxiciclina (Ferrerri *et al.*, 2006; Ferrerri *et al.*, 2009).

E' stato riportato il caso di una donna anziana con due linfomi metacroni degli annessi oculari associati ad infezione cronica da *C. psittaci*. La donna conviveva con un canarino da alcuni anni, ed in seguito a trattamento con doxiciclina si è ottenuta la remissione della malattia. Dalle analisi effettuate su feci ed organi (polmone, milza, fegato, intestino) del canarino si è dimostrata positività per *C. psittaci*. Si ipotizza che il linfoma possa dipendere da stimolazione antigenica cronica, e l'esposizione prolungata con il canarino infetto ha probabilmente causato continue reinfezioni (Ferrerri *et al.*, 2007).

L'incidenza della malattia risulta uguale nei due sessi, mentre per quanto riguarda l'età nell'adulto la malattia presenta spesso un marcato interessamento polmonare con febbre elevata, tosse da secca a produttiva con espettorato mucoide o sanguinolento, mentre nel bambino assume di solito un andamento simil-influenzale. Le manifestazioni più severe sono riportate tra i 35 e i 55

anni (Stewardson *et al.*, 2010). Le donne alcoliste sembrano essere più frequentemente infette degli uomini (Harkinezhad *et al.*, 2009b).

La malattia è occasionalmente fatale nei pazienti trattati adeguatamente e tempestivamente. Per il trattamento delle clamidiosi, sia in ambito umano che aviario, le tetracicline risultano essere gli antibiotici di prima scelta, anche se c'è da considerare la possibilità di ceppi di *C. psittaci* tetracicline-resistenti.

Nei casi di media gravità si consigliano trattamenti per almeno 10 giorni per via orale o endovenosa, mentre nei casi più gravi per almeno 10-14 giorni dopo l'abbattimento della temperatura. In caso di allergie verso le tetracicline o donne in gravidanza e bambini, i macrolidi ed eventualmente i chinoloni rappresentano una valida alternativa.

La reale incidenza della clamidiosi, in medicina umana, è sconosciuta poiché talvolta non si perviene ad una diagnosi definitiva ma si tratta il paziente sulla base della sintomatologia, classificando tali casi come polmoniti atipiche ad eziologia non identificata. A questo occorre aggiungere che la clamidiosi può essere sottostimata e sottodiagnosticata o addirittura non diagnosticata perché associata a scarsi segni clinici non specifici. Tale sottostima della prevalenza è probabilmente dovuta al fatto che solitamente sono messi in pratica i trattamenti antibiotici prima della diagnosi clinica completa. Da ricordare inoltre anche l'esistenza di ceppi di *C. pneumoniae* specifici dell'uomo e responsabili di sindromi respiratorie. In diagnosi differenziale con la clamidiosi vanno considerate *Coxiella burnetii*, *Histoplasma capsulatum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp., Influenza.

#### **2.4.5. Casi segnalati in letteratura**

Anche se sporadici, diversi casi di malattia nell'uomo sono stati segnalati in tutto il mondo, e strettamente correlati ad eventi specifici quali mostre o fiere di uccelli e macellazione di avicoli quali tacchini e anatre.

Casi di polmonite atipica da *C. psittaci* in seguito a contatto con anatre positive sono riportati in Germania ed in Ungheria (Petrovay e Balla, 2008). Le fonti di infezione erano rispettivamente due diversi impianti di trasformazione del pollame. In particolare gli operatori erano addetti all'unità di spiumatura e rimane da precisare che entrambi i pazienti erano in uno stato di compromissione del sistema immunitario, rispettivamente un anziano e una alcolista.

Anche in Australia sono stati dimostrati casi di ornitosi in un macello di anatre. I casi più gravi di polmonite si sono verificati nel personale impiegato nella fase di macellazione, probabilmente a causa di maggiore possibilità di contatto con aerosol, sangue e piume. Anche se solitamente gli

operatori addetti all'eviscerazione sono considerati quelli a più alto rischio, questi Autori hanno evidenziato altri siti, quali la fase di disossamento o sezionamento, dove mediante positività sierologiche riscontrate nei lavoratori hanno potuto dimostrare la positivizzazione del personale (Andrews *et al.*, 1981; Hedberg *et al.*, 1989; Tiong *et al.*, 2007).

I casi di polmonite negli addetti al macello possono presentarsi con una maggiore frequenza nei nuovi impiegati e nel reparto spiumamento, come dimostrato anche da Newman (1992) e Hinton (1993). In Germania casi di psittacosi nell'uomo si sono verificati durante un grave focolaio di clamidiosi che si è diffuso in circa 100 allevamenti di pollame misto (anatre, oche, polli). Ben 24 persone venute in contatto con questi animali hanno presentato sintomatologia simil-influenzale anche grave, con conseguente ospedalizzazione, ed il genotipo coinvolto risultava essere l'A (Gaede *et al.*, 2008). L'incidenza della clamidiosi è in seguito aumentata anche grazie l'importazione di uccelli esotici, infatti si sono verificati episodi di clamidiosi legati a *pet shop*, mostre e fiere di volatili ornamentali ed uccelli allevati.

Gli eventi di clamidiosi correlati a fiere o mostre di volatili ornamentali sono diversi, in tali casi le persone più frequentemente affette risultano essere i membri dello *staff* addetti alla gestione dei volatili, i giudici di gara ed alcuni visitatori (Belchior *et al.*, 2008; Lijima *et al.*, 2009; Koene *et al.*, 2007). In Giappone, si sono verificati 17 casi di psittacosi correlati ad un parco uccelli in cui sono rimasti coinvolti i visitatori ed alcuni membri dello *staff* (Matsui *et al.*, 2007).

Alte sieroprevalenze per *C. psittaci* sono state dimostrate in *keeper*, allevatori di pappagalli, Medici Veterinari, biologi e personale impiegato negli zoo (Dovc *et al.*, 2005; Raso *et al.*, 2009). Un caso fatale di psittacosi si è verificato in Slovacchia in una donna di 42 anni che lavorava presso un *pet shop*, il quadro clinico era rappresentato da polmonite interstiziale, i volatili con cui la donna aveva avuto precedenti contatti non avevano mai presentato nessuna sintomatologia (Kováčova *et al.*, 2007).

È stato dimostrato che individui in contatto con psittaciformi e piccioni sono più frequentemente infetti. In particolare, il contatto giornaliero con psittaciformi sembra essere pericoloso come quello settimanale, mentre il contatto settimanale con piccioni è meno pericoloso di quello giornaliero (Harkinezhad *et al.*, 2009b).

Casi sporadici di trasmissione all'uomo hanno interessato il pavone, il colino della Virginia, il fagiano (Strauss *et al.*, 1967; Erbeck e Nunn, 1999; Yang *et al.*, 2011).

In Italia Maffei *et al.*, nel 1987, riportano una percentuale di sieropositività del 35,7% in proprietari di pollame e colombi, a differenza del 7,3% in soggetti che presumibilmente non avevano avuto contatti con volatili. Anche Fenga *et al.*, nel 2007, in Sicilia, riportano una sieroprevalenza di *C. psittaci* del 14,9% (28 su 188) in lavoratori di diversi allevamenti di

volatili. In uno studio recente il 20% di uomini entrati in contatto solamente con canarini sono risultati positivi in PCR per *C. psittaci* (Harkinezhad *et al.*, 2009b).

#### 2.4.6. Casi umani denunciati negli anni

Nel 2002 nel *Report* della Commissione Europea sulle infezioni umane da *Chlamydia psittaci* vengono riportati i seguenti dati: dal 1988 al 1998, 813 casi riportati in USA al CDC di Atlanta di psittacosi da contatti con psittaciformi e non; in Germania, dove la psittacosi è soggetta a notifica, sono stati rispettivamente riportati 790 casi dal 1995 al 2000; in Italia 76 casi dal 1981 al 1985; in Svizzera, dal 1973 al 1977, 336 casi; in Inghilterra invece 587 dal 1977 al 1979, e più di 300 dal 1980 al 1983 ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scah/out73\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scah/out73_en.pdf)). Dati più recenti ed aggiornati che riassumono i casi registrati dal 1996 al 2007, in Europa e USA, sono riportati in tabella 8.

Country/territory	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Notifiable
Austria	1			1	2	3	0	3	6				
Argentina					38	1							
Australia	86	35	55	81	99	137	213	200	239	164	171	62	Yes
Belgium	9	7	8	12	13	10	23	39	12	7	2	3	Yes
Bosnia and Herzegovina	162						0	0	0				
Chile					2								
Croatia	7	4	0	5	8	3		5	4				
Czech Republic	3	5	6			0	3	0	0				
Denmark		57*		30	31	8	13	14	8	22	7	11	Yes
Finland	2	1	2	0	0	0							
F.Y.R. of Macedonia	0			14	0	0	5	0	0				
Germany	134	124	155	109	86	56	41	41	15	33	26	12	Yes
Hungary	4	3	4	1	5	1	6 (1 <sup>1</sup> )	85	7	140 (2 <sup>1</sup> )	29	28 (1 <sup>1</sup> )	Yes
Japan				23	18	35	54	44	40	34			Yes
New Caledonia						3	3						
Poland	2	2	0	2	0	5		2	2				
Slovakia	2	0	1	3	10	0	0	1	0		1		
Spain						5	4	0	1				
Sweden	25	66	30	29	24	12	13	12	7	5	2	9	
The Netherlands	56	28	26	25	36	23	17	27	33	49	59	27	Yes
UK/Great Britain	353	322	293	207	204	106	68	100	62	59			
UK/N. Ireland	52	37	0	0		44	16	15	13				
Ukraine	161	2	3	2	0	0	0						
USA	45	38	54	15	13		19	13	11				Yes

\*Number of reported cases from 1996 to 1998.  
<sup>1</sup>Number of reported casualties.

**Tabella 8.** Dati riassuntivi di casi umani rilevati dal 1996 al 2007 (Beeckman e Vanrompay, 2009).

Per quanto riguarda l'Italia invece i dati di prevalenza, disponibili dal 1999 al 2005, sono riassunti a livello nazionale dal Ministero della Salute e sono riferiti alla diagnosi di polmonite da psittacosi o di psittacosi con altre complicazioni specificate o non specificate (tabella 9).

**Tabella 9.** Dati ricavati dalle Schede di Dimissioni Ospedaliere del Ministero della Salute disponibili *on line* ([http://www.salute.gov.it/ricoveriOspedalieri/ric\\_informazioni/sceltadia.jsp](http://www.salute.gov.it/ricoveriOspedalieri/ric_informazioni/sceltadia.jsp))

Anno	Tipologia di ricovero	Polmonite da psittacosi Cod.0730	Psittacosi con altre complicazioni specificate Cod.0737	Psittacosi con complicazioni non specificate Cod. 0738	Psittacosi non specificata Cod. 0739	Psittacosi totali
1999	ospedaliero	16	-	1	21	38
	<i>Day hospital</i>	3	-	-	8	11
2000	ospedaliero	22	2	-	13	37
	<i>Day hospital</i>	1	-	-	9	10
2001	ospedaliero	9	-	-	4	13
	<i>Day hospital</i>	6	-	-	2	8
2002	ospedaliero	13	1	1	4	19
	<i>Day hospital</i>	5	-	-	3	8
2003	ospedaliero	19	-	-	4	23
	<i>Day hospital</i>	2	1	-	3	6
2004	ospedaliero	17	-	-	2	19
	<i>Day hospital</i>	3	-	-	4	7
2005	ospedaliero	8	-	1	1	10
	<i>Day hospital</i>	4	-	-	-	4

### 3. PATOGENESI

La clamidiosi aviare rappresenta una malattia zoonosica ad evoluzione acuta o cronica che interessa volatili di allevamento, molte specie di uccelli da voliera e selvatici di differente età.

I soggetti giovani sono generalmente più suscettibili alle infezioni da *C. psittaci*, e sono maggiormente esposti alla malattia in forma acuta rispetto agli adulti. Tra le specie più colpite ritroviamo gli psittaciformi e i columbiformi.

Generalizzando, sembra che tra i psittaciformi, quelli cosiddetti del Nuovo Mondo di origine americana siano più suscettibili delle specie provenienti invece dall'Africa, Australia e Asia (Gerlach, 1994). In realtà questa rappresenta solo una generalizzazione e lo stato dell'ospite risulta essere più importante nel manifestarsi della patologia di ogni specie-specificità.

L'infezione si stabilisce principalmente in seguito a penetrazione nell'ospite di *Chlamydia psittaci* per via respiratoria, anche se altre vie di ingresso sono rappresentate dall' ingestione. Nel

primo caso clamidia viene a contatto con le cellule epiteliali di polmone e sacchi aerei, con conseguente diffusione alle membrane sierose limitrofe. L'ingestione di corpi elementari, invece, risulta nell'infezione delle cellule epiteliali intestinali.

A questo proposito, nei tacchini, è stata descritta la patogenesi della clamidiosi mediante infezioni sperimentali per via aerogena. In tale specie dopo quattro ore dall'infezione si è dimostrata la diffusione del patogeno e la sua presenza in grandi quantità nei polmoni e sacchi aerei toracici. Tra le 24 e 48 ore è presente una fase di moltiplicazione in cui il patogeno risulta scarsamente presente a livello di sangue, rene, milza, fegato. Dopo 72 ore, le clamidie si localizzano in grandi quantità nei turbinati e a livello intestinale e nelle feci, mentre dopo 4 giorni sono presenti in numero elevato a livello cardiaco. In seguito alla replicazione nei diversi organi, vengono rilasciate nel circolo ematico e trattenute a livello della milza, fegato e reni, o eliminate nell'ambiente attraverso le secrezioni respiratorie (Page, 1959). Questo studio in realtà ha valutato la distribuzione quantitativa del patogeno nei tessuti.

In uno studio più approfondito di patogenesi dell'infezione di tre differenti *serovars* (A, B, D) di *C. psittaci* nei tacchini, si riporta come primo sito di replicazione il tratto respiratorio da uno a tre giorni post-inoculo. Dapprima infezione del tratto superiore e successivamente della parte inferiore dell'apparato respiratorio e macrofagi. Segue replicazione intensa nell'apparato respiratorio e allo stesso tempo la clamidia può essere dimostrata nel plasma e monociti indicando clamidiemia e localizzazione in uno o più organi parenchimatosi, nel pericardio, nella congiuntiva, midollo osseo, ed intestino con eliminazione fecale. È emerso inoltre che le *serovars* A, D e B sono dotate di una diversa patogenicità. La *serovar* A e D erano presenti negli stessi tessuti, ma per la *serovar* B non è stata dimostrata la presenza in proventricolo, duodeno, pancreas, ovaio, testicoli. L'intensità di replicazione si è dimostrata simile ma i ceppi di clamidia *serovar* B erano caratterizzati dalla comparsa nella maggior parte dei tessuti 1-6 giorni più tardi rispetto a D e la massima replicazione in questi tessuti si è dimostrata 3-4 giorni più tardi. La *serovar* B risulta avere un periodo di incubazione più lungo, e un periodo più breve in cui può essere osservata nei tessuti. Risulta essere meno patogena proprio per queste differenze patogenetiche e quindi un tropismo per i tessuti meno esteso rispetto alle altre *serovars*. Inoltre dai risultati sperimentali la A e la D sono risultate essere più patogene con lesioni più gravi e mortalità rispetto alla B (Vanrompay *et al.*, 1995).

Il periodo di incubazione della malattia può variare dai tre ai dieci giorni, ma anche mesi o anni, considerando l'elevata frequenza delle infezioni latenti. Il periodo di incubazione è difficile da determinare per la differenza di virulenza dei ceppi, l'ampia varietà di specie aviari ospiti e le

infezioni croniche intermittenti, il tipo di ceppo, numero di microrganismi inalati o ingeriti ed infine dall'età.

Sperimentalmente, i segni clinici si manifestano in 5-10 giorni in tacchinotti infettati con ceppi virulenti (Andersen e Vanrompay, 2003). Infezioni naturali in uccelli adulti esposti a basse dosi o a ceppi meno virulenti, possono avere un periodo più lungo di incubazione e i segni clinici non sono rilevabili fino a 2-8 settimane dopo l'esposizione. Nelle cocorite sono stati riportati periodi di incubazione più lunghi, fino a sette anni, mentre il periodo di incubazione per i piccioni è sconosciuto (Gerlach, 1994).

In un'altra infezione sperimentale, un diverso grado di patogenicità di due diversi ceppi all'interno di una singola *serovar*, la D, altamente patogena per il tacchino, è stata riportata. Anche se una probabile spiegazione del fatto che un ceppo ha evidenziato una minor patogenicità è stata una possibile attenuazione dello stesso in seguito ai numerosi passaggi in vitro (Vanrompay *et al.*, 1994b).

Quando la malattia decorre in forma acuta si ha eliminazione di clamidie con le secrezioni respiratorie e le deiezioni. Queste, una volta essicate, si disperdono nell'ambiente favorendo la diffusione del patogeno per via aerogena. Alla diffusione dell'agente patogeno tra i volatili concorrono i portatori asintomatici, compresi gli uccelli selvatici. Psittaciformi e columbiformi sono spesso asintomatici, o con infezione subclinica, ed eliminano periodicamente il microrganismo.

Il più importante fattore patogeno è una tossina, non ancora caratterizzata, che è strettamente legata alla membrana esterna dei corpi elementari (Gerlach, 1994). Recentemente è stato ipotizzato che le differenze in virulenza sono correlabili con il TTSS (*Type III Secretion System*) (Beckman e Vanrompay, 2010).

#### **4. SINTOMATOLOGIA**

Non ci sono segni patognomonicamente di clamidiosi aviaria e spesso è facilmente confusa con altre malattie batteriche comuni e infezioni virali (Flammer, 1997).

La clamidiosi è solitamente sistemica e occasionalmente fatale. I sintomi clinici variano per gravità e dipendono dalla specie di uccello, dall'età e dal sierotipo e genotipo di clamidia coinvolto, dalla virulenza del ceppo, dalla dose infettante, da fattori di *stress*, da trattamenti profilattici e terapeutici.

In linea generale i segni clinici tipici comuni dell'infezione con un ceppo altamente patogeno includono polmonite, enterite, segni respiratori quali tosse, starnuti, rantoli, dispnea, rinite,

tracheite, sinusite, scolo nasale e oculare muco-purulento, poliuria, apatia, anoressia, dimagrimento, ipertermia, letargia, diarrea con feci giallastre-verdastre gelatinose, diminuzione transitoria della deposizione. Mentre per quanto riguarda i ceppi a bassa virulenza, questi producono segni clinici simili ma meno gravi ed estesi. Le infezioni con ceppi a bassa virulenza tendono a produrre infezioni croniche caratterizzate da bassa mortalità (Gale *et al.*, 1960).

Le infezioni asintomatiche si possono presentare con entrambi i ceppi, sia ad alta che bassa patogenicità.

Nel piccione i segni clinici sono variabili, in fase acuta si possono osservare ipertermia, anoressia, astenia, diarrea e sintomi respiratori quali dispnea, rinite, scolo nasale sieroso, mucoso. Spesso è presente congiuntivite bilaterale con edema delle palpebre.

L'infezione acuta si può sviluppare quando sono presenti altre infezioni come salmonellosi e tricomoniasi che possono aggravare la sintomatologia. La morbilità è elevata e la mortalità ridotta. Nei piccioni con infezione cronica può presentarsi zoppia, torcicollo, opistotono, tremori, convulsioni (Wages, 1987).

In Canada, si riportano casi di clamidiosi in un allevamento di piccioni riproduttori con segni clinici di emaciazione, depressione, congiuntivite, *distress* respiratorio (Duizer *et al.*, 2010). Spesso però, sia i columbiformi che psittaciformi, in cui la malattia è endemica, sono asintomatici, l'infezione ha un decorso inapparente, seguita dall'instaurarsi dello stato di portatore, rappresentando eliminatori persistenti di *C. psittaci* con le feci e secrezioni respiratorie. La forma subclinica, inapparente, è quella più diffusa tra gli uccelli adulti. Gli animali possono eliminare il patogeno per diversi mesi, in maniera continua o intermittente, senza esibire segni clinici di malattia. L'eliminazione viene attivata da condizioni stressanti, quali il trasporto, stati di sovraffollamento, infezioni concomitanti, condizioni sanitarie inadeguate, cambi di alimentazione, carenze nutritive, stato di deposizione, che determinano una maggior suscettibilità all'infezione.

Negli uccelli da voliera, in particolare nei pappagalli, i sintomi clinici più frequenti sono rappresentati da anoressia, dimagrimento, arruffamento del piumaggio, diarrea con emissione di feci giallastre-verdastre, *distress* respiratorio, sinusite, congiuntivite, feci giallastre e occasionalmente disturbi del sistema nervoso centrale (Harrison, 1989).

Nei galliformi come il pollo, la maggior parte delle infezioni sono transitorie ed asintomatiche. Nei casi acuti gli animali presentano pericardite fibrinosa, epatomegalia e mortalità. Possono talvolta comparire sintomi nervosi, incoordinazione e cecità. Tuttavia sono stati segnalati in questa specie anche casi clinici caratterizzati da congiuntivite, rinite, pericardite, periepatite ed aerosacculite in Australia (Arzey *et al.*, 1990; Barr *et al.*, 1986).

Nelle ovaiole a fine carriera e nei tacchini più vecchi la malattia può decorrere in forma asintomatica, a meno che non intervengano fattori stressanti quali il trasporto in condizioni di sovraffollamento. Inoltre, si rileva mortalità più elevata nei tacchini giovani rispetto ai riproduttori (Calnek, 2001).

La congiuntivite sembra essere invece segno predominante negli anseriformi. In questi animali la malattia spesso è grave e fatale, nei giovani esordisce con tremori, andatura incerta, scolo sieroso-purulento nasale e congiuntivale, depressione. Caratteristica è la rinite e congiuntivite bilaterale sierosa o purulenta, crostosità a livello delle piume perioculari e nasali, cheratite e cecità. In seguito si possono presentare anoressia, diarrea, feci acquose e verdastre, emaciazione e atrofia muscolare, arresto della deposizione.

In generale la malattia si può manifestare in forma iperacuta-acuta, subacuta, cronica o inapparente (Gerlach, 1994). Il decorso clinico può essere iperacuto, frequente nei soggetti giovani con mortalità entro poche ore in assenza di sintomi. Acuto, frequente nei psittaciformi appartenenti al genere *Ara* ed *Amazona*, con segni clinici quali abbattimento, letargia, arruffamento del piumaggio, ipertermia, anoressia, *distress* respiratorio, scolo nasale e oculare, congiuntivite, dispnea, sinusite, gastroenterite, e diarrea giallo-verdastro, rapido dimagrimento, disidratazione, tremori sintomi nervosi e morte entro 8-14 giorni. Questa tipologia di decorso rappresenta la forma tipica di uccelli giovani esposti a ceppi virulenti. Nel caso di decorso subacuto-cronico, tipico di tutte le specie aviari con la medesima sintomatologia e occasionalmente con sviluppo di segni del sistema nervoso centrale, è frequente negli ondulati e calopsite con dispnea, scolo nasale, congiuntivite, dimagrimento, e disturbi della riproduzione. Determinate sindromi sembrano essere comuni tra certi gruppi di uccelli (Flammer, 1997).

## **5. LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE**

In linea generale le lesioni osservate sono compatibili con altre patologie aviarie di origine batterica e virale. In tutte le specie di volatili si osservano lesioni simili ma variabili con diversi livelli di gravità a seconda della specie, del ceppo e del sierotipo coinvolto. Tutti i ceppi producono lesioni caratteristiche di malattia sistemica ma non patognomoniche ed i soggetti eliminatori possono presentare nessuna lesione.

### **5.1. Lesioni macroscopiche**

Solitamente le forme più gravi si riscontrano negli animali giovani.

In generale, lesioni acute sono caratterizzate da epatomegalia, aerosacculite, periepatite e pericardite fibrinosa, broncopolmonite, enterite e nefrosi. Alcuni ceppi tendono a dare una grave aerosacculite e polmonite, altri meno con maggior coinvolgimento cardiaco. A questo proposito, Beasley *et al.*, nel 1961, riportano sperimentalmente in tacchini il rilievo di pericardite fibrinosa con ispessimento dell'organo, congestione, con vere e proprie placche di fibrina sulla superficie cardiaca. Il coinvolgimento del pericardio sembra essere causato dal sierotipo D, a differenza di A che è più frequentemente associato a lesioni respiratorie (Vanrompay *et al.*, 1992; Andersen, 2005).

Spesso, possono essere osservati opacamento dei sacchi aerei, epatomegalia e splenomegalia anche se non patognomonic.

Nei tessuti ed organi colpiti si osservano congestione, iperplasia, emorragie, ed essudati fibrinosi. La necrosi miliare di organi parenchimatosi è comune, probabilmente dovuto all'effetto delle tossine di *Chlamydia*.

La splenomegalia non sempre compare, e per questo motivo è frequentemente discussa come rilievo comune in corso di clamidiosi. Il rilievo di aerosacculite fibrinosa è invece una lesione più frequente e indicativa di clamidiosi negli psittaciformi e piccioni.

La forma acuta e subacuta del piccione sono caratterizzate da congestione e flogosi della mucosa nasale, congestione ed edema polmonare, raramente associati a focolai di polmonite, essudato siero fibrinoso sulla sierosa peritoneale e occasionalmente in pericardio. Si rileva epatomegalia e decolorazione epatica con focolai di necrosi e consistenza ridotta dell'organo. Splenomegalia e iperplasia splenica accentuata soprattutto negli adulti, milza di consistenza molle e di colorito più scuro. Iperemia della mucosa intestinale ed enterite catarrale. Sempre in queste specie, nei casi meno gravi le lesioni interessano solo il fegato e i sacchi aerei, mentre più frequentemente possono manifestare congiuntivite e cheratocongiuntivite, a volte anche edema delle palpebre, rinite. In piccioni adulti, in Grecia, si segnala l'implicazione di *Chlamydia spp.* come agente in grado di indurre *ectropion* bilaterale della palpebra inferiore (Bougiouklis *et al.*, 2000).

Occasionalmente, in alcune specie come i psittaciformi, può colpire l'apparato riproduttore. Nei maschi sessualmente attivi può causare orchite ed epididimite e conseguente infertilità, mentre l'ooforite è rara (Gerlach, 1994).

Nei tacchini sono state invece riportate in infezioni sperimentali mortalità nei maschi adulti in seguito a rottura dei vasi testicolari e conseguente emorragia (Beasley *et al.*, 1961).

Lesioni da subacute a croniche sono caratterizzate da anemia causata da panmielopatia nel midollo osseo e deficienza di eterofili e macrofagi nei tessuti (Gerlach, 1994). Le lesioni

croniche sono caratterizzate da proliferazione di tessuto connettivo nel fegato e rene, con anche necrosi pancreatiche.

Il fegato degli uccelli colpiti da clamidiosi può essere di dimensione normale, o aumentato di volume in diverso grado, con arrotondamento dei margini. Anche il colore può essere normale, uniforme da rosso-marrone, diffusamente giallo-marrone fino a marrone oliva scuro, o giallo chiaro, o arancio-marroncino, a seconda del grado di congestione, stasi biliare, lipidosi, e degenerazione epatocellulare della necrosi. A volte, l'architettura lobulare è accentuata da una distribuzione zonale di congestione all'interno dei lobuli epatici. In molti casi ci possono essere foci grossolanamente distinguibili fino a foci larghi di forma irregolare di necrosi coagulativa, spesso di colorito giallo chiaro marroncino in contrasto rispetto al colore più scuro dell'organo.

La milza di soggetti morti in corso di clamidiosi può rientrare nei limiti della norma per dimensioni, ma spesso è aumentata di volume da un grado da moderato a marcato. La milza aumentata di volume può essere di consistenza aumentata ma anche ridotta. Il colore rosso scuro fino a rosso porpora identifica la congestione splenica, mentre la splenomegalia con istiocitosi e plasmocitosi può essere di colorito grigio fino a giallastro-marroncino chiaro (Graham, 1993).

Nell'aerosacculite fibrinosa tutti i sacchi aerei possono essere coinvolti.

La cheratocongiuntivite è frequente nei parrocchetti australiani, *Neophema*, piccioni, anatre, fringuelli europei (Gerlach, 1994).

In pappagalli cronicamente infetti si possono evidenziare anche alterazione del colore delle piume, in seguito all'alterazione del metabolismo epatico (Billington, 2005).

## **5.2. Lesioni microscopiche**

Le lesioni microscopiche non sono specifiche eccetto che per la presenza dei corpi elementari che sono patognomonici. Altro rilievo istopatologico di importanza è l'istiocitosi con iperplasia degli istiociti (Graham, 1989).

Tipico delle forme acute è la proliferazione intrasinusoidale delle cellule stellate del Kupffer a livello epatico. La proliferazione di monociti e attivazione del sistema reticoloistocitario si può rilevare in organi parenchimatosi, specialmente nella milza, fegato e rene. Nei casi cronici sono comuni granulomi con cellule epitelioidi a livello epatico e polmoniti con proliferazione di cellule epiteliali nei capillari aerei. Le cellule possono essere rigonfie e vacuolate e si può rilevare la migrazione di linfociti nei tessuti coinvolti. Le lesioni al sistema nervoso centrale consistono in meningite non purulenta. Infezioni batteriche, virali, micotiche secondarie possono nascondere o alterare le lesioni da clamidia (Gerlach, 1994).

Nel fegato l'iperplasia delle cellule del Kupffer, spesso accompagnata da locale o diffusa infiltrazione mononucleare, è di comune riscontro in corso di clamidiosi subacuta-cronica di grado da lieve a moderato. Stasi biliare intraepatocellulare da lieve a marcata e accumulo di emosiderina sono frequenti come conseguenza della epatite. Foci multipli di necrosi coagulativa epatica sono stati descritti come lesioni predominanti nelle forme acute e fatali. Iperplasia dei dotti biliari da moderata a marcata in episodi subacuti o ricorrenti possono essere presenti per un periodo di molti mesi o anni. Iperplasia e ispessimento degli istiociti nelle guaine perivascolari delle arteriole è comune nella milza di pappagalli con segni clinici di clamidiosi. Il grado di splenomegalia è quantitativamente proporzionale alla quantità di istiociti presenti. Deplezione di linfociti dalla polpa bianca è comune, la diminuzione di linfociti è assoluta e accompagnata da plasmocitosi assoluta. Nei sacchi aerei le infezioni acute sono caratterizzate da essudato fibrinoso che contiene pochi eterofili e macrofagi che possono veicolare la clamidia. Nelle aerosacculiti subacute l'essudato contiene tipicamente molti macrofagi reattivi, vacuolati, che possono veicolare la clamidia; pochi eterofili possono essere presenti. Le aerosacculiti croniche possono essere considerate infiammazioni diffuse granulomatose con istiocitosi dello stroma e con la presenza di macrofagi nell'essudato restante. Fibrosi dello stroma e neovascolarizzazione può essere osservata (Graham, 1989).

Beasley *et al.*, nel 1961 descrivono le lesioni istologiche indotte da *C. psittaci* in tacchini infettati sperimentalmente per via tracheale. Lesioni a carattere proliferativo e necrotizzante ad eccezione della necrosi focale del fegato che sembra prevalere nel parrocchetto e nel topo, con danni in generale agli organi più frequenti e più gravi nei giovani, come la polmonite epitelioidica, rispetto agli adulti, oltre a miocardite, necrosi splenica ed enterite catarrale.

## 6. DIAGNOSI

### 6.1. DIAGNOSI CLINICA

Il solo esame anatomico-patologico e la sintomatologia clinica non sono sufficienti per emettere diagnosi di clamidiosi aviare. A volte la diagnosi può essere difficile, specialmente in assenza di segni clinici e per la presenza di infezioni persistenti.

Negli uccelli proprio per questo motivo, poiché ci possono essere portatori asintomatici e i segni clinici non sono sempre evidenti, Smith *et al.*, 2010, riportano le definizioni di caso confermato, probabile e sospetto di clamidiosi aviare, come supporto al clinico nell'interpretare i risultati dei test diagnostici.

Si parla di caso confermato di clamidiosi aviare sulla base di uno dei seguenti criteri: isolamento di *Chlamydia psittaci* da tampone clinico; identificazione di clamidie mediante Immunofluorescenza da organi o tessuti; incremento del titolo sierico di quattro o più volte tra due campioni di siero (acuto e convalescente) prelevati a due settimane di distanza processati nello stesso laboratorio; identificazione di Chlamydiaceae mediante colorazione di Giménez o Macchiavello da impronte o tessuti, quali congiuntiva, fegato, milza o secrezioni respiratorie. Mentre di caso probabile se la malattia è compatibile e se viene supportata una delle seguenti condizioni: singolo elevato titolo anticorpale in un campione prelevato dopo la comparsa dei segni clinici; rilevazione dell'antigene mediante ELISA, PCR, o Immunofluorescenza, da deiezioni, cloaca, congiuntiva, secrezioni del tratto respiratorio.

Infine, di caso sospetto se si verifica una delle seguenti condizioni: malattia compatibile non confermata dal laboratorio ma epidemiologicamente correlata ad un caso confermato nell'uomo o volatile; assenza di sintomi clinici, e un singolo aumento del titolo anticorpale o rilievo dell'antigene di *Chlamydia*; malattia clinica compatibile con positività a procedure non standardizzate, o a nuovi *kit* in allestimento; malattia clinica compatibile, che risponde alla terapia appropriata.

Nei *pet birds* con una singola metodica non è possibile effettuare una diagnosi, i risultati dei vari test di laboratorio vanno sempre interpretati considerando l'anamnesi, segni di malattia, esami collaterali quali ematologici (leucocitosi), biochimici (controllo di enzimi epatici) e radiografici.

## 6.2. METODOLOGIE DIAGNOSTICHE DELLA CLAMIDIOSI

Esistono due tipi di approccio principali alla diagnosi della clamidiosi aviaria, il primo consiste nella rilevazione diretta dell'agente in tessuti, tamponi, organi (PCR, isolamento e identificazione, metodi di colorazione). Il secondo comprende i controlli (diagnosi indiretta) sierologici da campioni di sangue per rilevare la presenza di anticorpi anti-clamidia. Una singola metodologia diagnostica non è sufficiente e adeguata per emettere diagnosi di clamidiosi, ma è raccomandata una combinazione di più metodiche diagnostiche disponibili (isolamento, rilievo di antigeni e anticorpi), specialmente quando è esaminato un singolo volatile.

Diversi metodi diagnostici, colturali e non colturali, sono stati utilizzati per diagnosticare le infezioni da clamidia nei volatili. Ogni tecnica ha un suo ruolo importante nella diagnosi e caratteristiche diverse in termini di specificità, sensibilità, costi, rapidità, a seconda anche della tipologia di campione disponibile.

Tra le metodiche disponibili più comunemente utilizzate ritroviamo la Fissazione Del Complemento, Microimmunofluorescenza, Immunofluorescenza, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), agglutinazione dei corpi elementari, agglutinazione al lattice, isolamento in colture cellulari o uova embrionate, PCR (*Nested, Real Time, RFLP*).

Tecniche sierologiche oramai in disuso sono state descritte da Grimes nel 1989, quali agglutinazione rapida su piastra o su vetrino, agglutinazione capillare, inibizione della fissazione del complemento indiretta, emoagglutinazione passiva, immunodiffusione, AGID (Page, 1974), immunocromatografia. Test immunocromatografici, pur non richiedendo il microrganismo vitale, sono stati valutati per rilevare *Chlamydia psittaci* negli uccelli, ma con aumento di percentuale di falsi positivi e negativi, considerati quindi poco sensibili e specifici.

L'approccio diagnostico prevede l'applicazione di diverse tecniche per l'individuazione degli antigeni direttamente su campioni di tessuti o da tamponi, quali l'isolamento, l'immunofluorescenza diretta, ELISA, la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), colorazioni, o per l'identificazione degli anticorpi sierici specifici per clamidia quali, Fissazione Del Complemento, ELISA, agglutinazione dei corpi elementari, agglutinazione al lattice (Andersen e Vanrompay, 2003). Non essendo più disponibili in commercio gli anticorpi monoclonali sierotipo-specifici, metodiche diagnostiche biomolecolari innovative e rapide si sono sviluppate di recente, quali *microarray* (Sachse *et al.*, 2005) e MLVA (Laroucau *et al.*, 2008), che permettono di tipizzare i ceppi di clamidia.

Queste tecnologie sono nate dal fatto che altri test non permettevano l'identificazione di tutti i genotipi e oramai ulteriori informazioni aggiuntive sull'agente eziologico come il sierotipo, il

genotipo, e fattori di virulenza rispetto alla mera identificazione di specie sono sempre più richieste. Questi dati aggiuntivi risultano importanti in quanto non tutti i genotipi presentano lo stesso rischio zoonotico, oltre che per studi epidemiologici. Gli Autori propongono i *microarray* come nuovo strumento diagnostico rapido per la diagnostica delle clamidiosi (Sachse *et al.*, 2005).

### 6.3. ISOLAMENTO

Poichè *C. psittaci* è un batterio intracellulare obbligato, richiede metodiche di isolamento in colture cellulari o in uova embrionate. In linea generale le clamidie possono essere isolate nei sacchi vitellini di uova embrionate di pollo o in colture cellulari di mammifero.

Storicamente, il primo metodo colturale per le clamidie è stato sviluppato nel 1935, quando Burnet e Rountree sono riusciti a far crescere l'agente della psittacosi nella membrana corioallantoidea di embrione di pollo (Burnet e Rountree, 1935). Più tardi, nel 1940, Rake *et al.*, hanno scoperto che LGV poteva moltiplicare nelle cellule del sacco vitellino di embrioni di pollo (Rake *et al.*, 1940). Successivamente fu dimostrato che tutte le clamidie potevano crescere in queste cellule (Stamp *et al.*, 1950; Tang *et al.*, 1957).

Queste due metodiche sono considerate *gold standard*, di elezione, per il rilievo dell'antigene per la diagnosi diretta di clamidiosi (Andersen, 2008).

L'isolamento dimostra la vitalità di clamidia e quindi l'infezione in corso, e permette la crescita di diversi ceppi consentendo possibili caratterizzazioni biomolecolari successive per poter identificare la fonte di infezione e per studi epidemiologici.

Queste metodiche richiedono quindi che la vitalità delle clamidie sia preservata e che i campioni siano prelevati sterilmente con un adatto terreno di trasporto e in opportune condizioni di temperatura. Solitamente viene utilizzato SPG *medium* addizionato di siero fetale bovino, antibiotici, antimicotici, in quanto vi potrebbero essere, a seconda del campione, contaminazioni batteriche che potrebbero inficiare l'isolamento (Spencer, 1983). Vengono comunemente aggiunti antibiotici che non inibiscono la replicazione di clamidia come streptomina (200µg/ml), gentamicina (50µg/ml), vancomicina (75µg/ml) e nistatina (25 unità/ml).

Risultati negativi infatti si possono ottenere se il microrganismo non è più vitale, ma anche i trattamenti antibiotici possono interferire con l'isolamento.

I campioni che si possono analizzare con questa metodica possono essere provenienti sia da animali in vita come campioni di deiezioni o tamponi di coana, congiuntiva, cloaca, faringe, trachea, sia da organi di necropsia come fegato o milza, o altri tessuti. L'appropriatezza del

campione per queste metodiche è importante, ad esempio tamponi cloacali sono da preferire a matrici come le deiezioni, in quanto queste devono seguire dei passaggi di decontaminazione e centrifugazione per trattare la tipologia di campione (Gerlach, 1994).

I campionamenti di animali in vita vanno ripetuti per aumentare la probabilità di rilevare soggetti eliminatori intermittenti (Andersen, 1996).

Per l'isolamento di clamidia possono essere utilizzate le uova embrionate SPF di pollo (biblio), e sono impiegati metodi standard di inoculazione e incubazione.

Le uova embrionate vanno inoculate con 0,2-0,5 ml di campione a 6-7 giorni di incubazione nel sacco vitellino, non devono essere ruotate e riposte in un incubatore umidificato a 37°C. La replicazione di clamidia provoca, di solito, la morte degli embrioni in 5-12 giorni e si possono osservare emorragie embrionali, congestione vascolare della membrana del sacco vitellino, e alcuni casi di mortalità. Se non vi è mortalità è bene effettuare due o tre passaggi ciechi prima di definire il campione negativo. Occorre poi confermare il sospetto diagnostico mediante l'utilizzo di tecniche quali Gimenez o PCR.

Successivamente, l'avvento delle colture cellulari si è dimostrato un metodo alternativo all'isolamento in uova embrionate più indaginoso. Le linee cellulari più comunemente utilizzate per isolare la clamidia sono BMG (*Buffalo Green Monkey*), ma anche McCoy, HeLa, Vero, L-929 sono spesso utilizzate. Uno studio recente ha dimostrato che per *C. psittaci* le BMG sono le più sensibili, mentre le Vero e L-929 soddisfacenti (Vanrompay *et al.*, 1992).

Alcuni ceppi possono crescere rapidamente altri invece sono più difficoltosi e possono richiedere più passaggi e tempi più lunghi. Ad esempio, *C. suis* e *C. pecorum* si dimostrano più problematiche per la crescita in queste linee cellulari e Schiller *et al.*, nel 2004, riportano che per queste clamidie sono più appropriate le CaCo (*human colonic adenocarcinoma cells*).

Le linee cellulari vengono inoculate, incubate a 37°C per due-tre giorni e successivamente fissate in metanolo. La presenza di clamidia e delle caratteristiche inclusioni intracitoplasmatiche nelle colture cellulari può essere confermata da tecniche di immunofluorescenza diretta, mediante l'aggiunta nel monostrato infetto di siero anti-clamidia coniugato con fluoresceina, ma anche da metodi di colorazione come Giemsa o Gimenez. Le inclusioni di clamidia appaiono di colore verde chiaro fluorescente alla luce ultravioletta.

Entrambe le metodiche di isolamento sono molto sensibili e richiedono personale e laboratori specializzati, con elevato standard di sicurezza livello 3.

Presentano però dei limiti, in quanto sono tecniche molto lunghe, indaginose, soprattutto per quanto riguarda le uova embrionate, rischiose per la sicurezza degli operatori in quanto si manipolano microrganismi vivi con possibili pericoli zoonosici, e con costi elevati. D'altro canto,

sicuramente l'isolamento in colture cellulari rispetto alle uova embrionate si presenta più breve, meno costoso, con la possibilità di applicarlo a più campioni contemporaneamente. Anche se tale metodica non è applicabile a tutti i ceppi, esistendo diverse linee cellulari alcuni ceppi potrebbero non crescere. Falsi positivi sono comunque improbabili (Fudge,1997).

#### **6.4. DIAGNOSI SIEROLOGICA**

La sola sierologia è utile per studi sieroepidemiologici piuttosto che diagnostici, non è di ausilio e non è sufficiente per la diagnosi di clamidiosi in campo aviario per l'elevata sieroprevalenza e diffusione in tutte le specie di uccelli e per la persistenza fino a molti mesi degli anticorpi. Deve essere sempre abbinata a tecniche dirette per rilevare l'infezione da clamidia.

Un esame sierologico positivo indica che il soggetto si è infettato (è venuto in contatto con clamidia) ma non indica una infezione in corso (in atto), per la cui diagnosi è necessario mettere in evidenza l'incremento del titolo anticorpale.

Falsi negativi si possono verificare in uccelli con infezione acuta, prelevati prima della sierconversione che quindi non hanno ancora prodotto anticorpi, o sottoposti a trattamento antibiotico. I trattamenti antibiotici possono infatti ritardare o diminuire la risposta anticorpale. Le IgG possono persistere anche dopo un trattamento efficace. Le tecniche sierologiche in uso che permettono di identificare gli anticorpi sierici specifici per la clamidiosi sono, FDC, agglutinazione dei corpi elementari, agglutinazione al lattice, ELISA. Tra i test sierologici utilizzati su larga scala ritroviamo la FDC, che tende ad essere sostituita da test ELISA rapidi commerciali.

Originariamente descritta da Bedson, 1935, la fissazione del complemento è tra le metodiche più comunemente utilizzate per rilevare gli anticorpi (Anticorpi diretti contro l'LPS). La porzione immunodominante dell'antigene, che contiene carboidrati, stimola la formazione di anticorpi fissanti il complemento. Rappresenta una metodica poco sensibile, ma di facile esecuzione ed è per questo motivo che è la più utilizzata su larga scala come indicatore di avvenuta infezione in un gruppo di uccelli. Permette la rilevazione di anticorpi 7-10 giorni dopo l'infezione. I trattamenti antibiotici, come precedentemente accennato, possono però ritardare o impedire il rialzo anticorpale. E' in grado di rilevare IgG e non IgM, la concentrazione di IgG tende ad aumentare più tardi nel corso dell'infezione e a persistere per mesi o anni (Grimes 1993). In alcune specie di pappagalli di piccola taglia quali, ondulati, inseparabili, parrocchetti, giovani cenerini, può risultare falsamente negativa. Normalmente titoli elevati, maggiori di 1:64 o più

alti, sono indicativi di una infezione recente o intercorrente, anche se la soglia di positività per FDC riportata nel Manuale OIE è pari a 1:32. Solo un aumento del livello anticorpale di quattro volte tra due prelievi di siero viene considerato diagnostico ed indicativo di una infezione recente o della malattia in corso. Questo fattore comporta un ulteriore limite della metodica in quanto si ha un allungamento dei tempi di risposta laboratoristici. Alti titoli possono persistere anche dopo che il trattamento antibiotico è terminato e questo può complicare l'interpretazione dei risultati. La FDC si è rilevata efficace nel tacchino (Hall *et al.*, 1974), negli uccelli selvatici (Grimes e Page, 1978) e nei pappagalli (Grimes, 1985), e può essere utilizzata per esaminare sieri di piccione come raccomandato da Page (1975).

Rileva solo anticorpi capaci di fissare il complemento e diretti verso un antigene di gruppo specifico, mentre altre metodiche sierologiche sono in grado di rilevare tutte le IgG capaci di legare l'antigene (Salinas, 1993). Poiché gli uccelli producono principalmente anticorpi non fissanti il complemento, è stata messa a punto la fissazione del complemento modificata. La FDC modificata si ottiene aggiungendo siero fresco di pollo al complemento, ottenendo un aumento della sensibilità della tecnica (Grimes e Page 1978; Manuale O.I.E.) in modo tale da poter usare questa metodica per testare sieri di specie aviari i cui anticorpi non fissano normalmente il complemento di cavia. Il complemento di cavia è risultato incompatibile con il siero di molte specie aviarie (Grimes, 1984), i piccioni però fissano il complemento di cavia a differenza di tacchini e certe specie di pappagalli.

La FDC modificata è più sensibile (Grimes e Page 1978; Salinas e Caro 1993). Inoltre è più sensibile dei metodi di agglutinazione, quali Agglutinazione al lattice (Grimes *et al.*, 1993) metodica in grado di rilevare IgG ma anche IgM. Poco utilizzata, anche se semplice, rapida e specifica, è poco sensibile rispetto alla FDC, si possono presentare falsi negativi, con variazione di soglia di positività in base alle specie.

L'agglutinazione dei corpi elementari (Grimes, 1994), invece, mette in evidenza le IgM, quindi infezioni recenti o correnti. Titoli maggiori di 1:10 in ondulati e calopsitte e inseparabili, e maggiori di 1:20 in volatili di taglia grande si riscontrano di frequente in infezioni recenti. Metodica considerata sensibile solo in certi pappagalli, mentre nei piccioni non è considerata tale e la FDC è raccomandata (Phalen *et al.*, 1999).

Nel piccione, ELISA, Immunofluorescenza indiretta, microimmunofluorescenza, sono usate meno frequentemente. In queste specie, Milon (1983) e Trap (1896) hanno comparato l'Immunofluorescenza indiretta e la FDC, dimostrando che la prima è più sensibile. Eidebenz (1990) ha dimostrato che l'ELISA competitiva (sarebbe elisa blocking antibodies) è più sensibile e specifica di FDC.

Salinas (1993) ha comparato cinque metodiche sierologiche nel siero di piccione. In particolare, mantenendo immunofluorescenza indiretta come metodo di riferimento, ELISA e MIF sono risultati più sensibili di FDC, e la metodica ELISA meno specifica delle altre.

Infine, Ceglie *et al.*, nel 2007, hanno riportato una buona concordanza tra FDC e microimmunofluorescenza, con riscontro di maggiori campioni positivi con quest'ultima metodica.

## **6.5. COLORAZIONI**

### **6.5.1. Esame microscopico**

Le clamidie (CE) possono essere evidenziate con vari metodi di colorazione quali il metodo Castaneda in blu ed in rosso con il metodo Macchiavello, oltre che con colorazione di *Giménez*, *Giemsa*, Castaneda (Macchiavello, 1937; *Giménez*, 1964; Quinn *et al.*, 1994). La colorazione può essere effettuata su vetrino per impressione d'organo da fegato, milza, rene, polmone, pericardio, o in strisci di essudati o deiezioni. Le colorazioni più comunemente utilizzate sono *Giemsa* e *Giménez*. Quest'ultima insieme alla *Giménez* modificata (Andersen e Tappe 1989) viene utilizzata di routine in molti laboratori per individuare le inclusioni di clamidia in vetrini per impronta di sacco vitellino. Nonostante siano tecniche molto rapide e poco costose, presentano dei limiti in termini di bassa sensibilità e specificità, utili nel caso di grave infezione o nel picco d'infezione di clamidia, da utilizzare in uccelli che mostrano sintomatologia clinica ma non come metodiche di *screening* (Arizmendi e Grimes, 1995). I corpi elementari molto piccoli, 0,3 µm, perdono le caratteristiche morfologiche, il che li rende molto difficili da evidenziare quando presenti in basso numero.

### **6.5.2. Colorazioni istochimiche**

Le clamidie possono essere evidenziate negli strisci e nelle sezioni in paraffina di tessuti utilizzando le colorazioni di *Gimenez*, *Gimenez* modificata, *Zielh-Neelsen* modificata, *Giemsa* dopo fissazione in Bouin o Carnoy (Stamp *et al.*, 1950), in cui è possibile evidenziare eterofili, molti linfociti e plasmacellule, e occasionalmente macrofagi-like contenenti corpi elementari intracitoplasmatici (Gerlach, 1994). Risultano quindi poco specifiche e possibili *cross* reazioni con altri batteri Gram negativi si possono verificare.

### 6.5.3. Colorazioni immunoistochimiche

Le colorazioni immunoistochimiche rappresentano un metodo utilizzato per il rilievo di clamidie in preparati citologici o istologici. La colorazione può essere effettuata mediante immunofluorescenza o con immunoperossidasi (Andersen e Tappe 1989), attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici diretti contro l'antigene della clamidia, MOMP o LPS. Alcuni anticorpi monoclonali non sono in grado di individuare le clamidie fissate in formalina, inoltre alcuni anticorpi monoclonali specifici per l'antigene LPS e anche sieri policlonali sono in grado di reagire con alcuni ceppi di batteri Gram negativi. Risulta comunque più sensibile e specifica della istochimica ma richiede buona esperienza nell'interpretazione dei risultati.

## 6.6. METODI IMMUNOENZIMATICI

I test immunoenzimatici possono rilevare antigene o anticorpi, e non necessitano della presenza del microrganismo vitale nel campione. Sono basati sia sulla rilevazione diretta dei CE di clamidia nel campione clinico per mezzo di anticorpi marcati con fluorocromo, anticorpi monoclonali clamidia-specifici o su cattura e rilevazione dell'antigene di clamidia per mezzo di anticorpi coniugati ad enzimi.

Tra le metodiche immunoenzimatiche comunemente utilizzate ritroviamo l'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) che può essere utilizzata per ricerca di anticorpi nei confronti di *C. psittaci*, rilevando anticorpi di classe IgG, IgM, genere-specifici, specie-specifici, tipo-specifici (Fudge, 1991).

Esistono kit commerciali rapidi basati su metodiche ELISA per rilevare *C. trachomatis* nell'uomo, questi test rilevano anche *C. psittaci*, in quanto reagiscono con l'antigene lipopolisaccaridico LPS o di gruppo, dove gli anticorpi sono coniugati con un enzima in modo tale da evidenziare in caso di positività un cambiamento di colore (reazione colorimetrica) dopo aggiunta di un cromogeno.

I vantaggi sono rappresentati dal fatto che è una metodica automatizzabile, rapida, sicura in quanto il campione è inattivato, non richiede microrganismi vivi, la lettura è oggettiva e non necessita di alti livelli di esperienza. Inoltre è possibile analizzare un numero elevato di campioni, ed ha basso costo. Presenta però dei limiti, l'LPS delle clamidie condivide epitopi con l'LPS di altri batteri Gram negativi, portando a falsi positivi per *cross* reazioni con questi batteri.

Inoltre, permettono solo l'identificazione del genere *Chlamydia* senza identificazione di specie poiché l'LPS è presente in tutte le clamidie.

E' inoltre poco sensibile, un centinaio di microrganismi sono necessari per rilevare la positività. La sensibilità dell'ELISA si può esprimere in meno di 2,5 ng (600 corpi elementari) (Gerlach, 1994). Elevate concentrazioni di *Staphylococcus aureus*, più di 10 o maggiori di  $1,5 \times 10^9$  ml/sospensione possono causare falsi positivi (Gerlach, 1994). Anche *Actinobacillus salpingitidis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus hyicus* sono riportati come causa di falsi positivi. Falsi negativi si possono ottenere se l'antigene è insufficiente o se l'eliminazione è intermittente (Gerlach, 1994).

Il risultato va sempre interpretato alla luce dei segni clinici, infatti solo una forte reazione positiva associata a segni clinici può essere considerata significativa.

Rispetto ad altre metodiche l'ELISA è molto sensibile ma meno specifica di immunofluorescenza indiretta e di microimmunofluorescenza.

Recentemente sono stati sviluppati *kit* ELISA su supporto solido con ottenimento dei risultati in circa 30 minuti, utilizzati per pappagalli, polli e tacchini, che rilevano IgG verso LPS con lettura del test visiva per confronto di intensità di colore.

Diversi *kit* sono stati testati per rilevare la clamidia negli uccelli, ma nessuno è stato validato per *C. psittaci*. Recentemente sono stati sviluppati *kit* sperimentali più specifici basati su antigeni ricombinanti o altamente purificati, quali ELISA indiretta basata su LPS, Elisa competitiva basata sull'LPS, Elisa ricombinante basata su MOMP (Vanrompay *et al.*, 2000; Verminnen *et al.*, 2006). Quest'ultima si è rivelata sensibile e specifica e applicata in casi di psittacosi umana.

Gerlach, (1994) ha comparato quattro diversi test commerciali di rilevazione dell'antigene valutandone la specificità e sensibilità. La specificità in questi tipi di test è influenzata dal fatto che *cross* reazioni con altri batteri sono causa di falsi positivi, mentre la sensibilità è influenzata dal numero di corpi elementari di clamidia presenti. Nei differenti test valutati dall'Autore si tratta di almeno 70, 130, 600, 4800 CE/ml di campione.

## **6.7. IMMUNOFLUORESCENZA E MICROIMMUNOFLUORESCENZA**

L' immunofluorescenza può essere indiretta o diretta, rilevando antigene o anticorpi di classe IgG, IgM, genere specifici-specie specifici, tipo-specifici. La immunofluorescenza diretta è il metodo di elezione per mettere in evidenza gli inclusi di clamidia (Andersen e Tappe 1989). Questa metodica viene solitamente utilizzata per evidenziare cellule infette in seguito ad isolamento in colture cellulari. Rappresenta una tecnica semplice ma poco utilizzata, soprattutto

nei pappagalli, ha una bassa sensibilità in presenza di pochi microrganismi, non è automatizzabile, richiede laboratori specializzati e la lettura dell'esame è soggettiva.

Falsi positivi si possono riscontrare per legami anticorpali non specifici, *cross* reazioni con altri microrganismi, o per inesperienza nella lettura dell'esame.

Falsi negativi invece possono essere dovuti all'eliminazione intermittente, trattamenti antibiotici, o inesperienza dell'operatore.

La microimmunofluorescenza è stata utilizzata inizialmente per la tipizzazione dei sierotipi aviari con anticorpi monoclonali *serovar* specifici (Andersen, 1991; Vanrompay *et al.*, 1993).

Viene anche utilizzata in medicina umana per sierotipizzare le specie di clamidia, in particolare per *C. trachomatis*. Anche se uno studio recente ha dimostrato la debolezza di questo test per diagnosticare la psittacosi nell'uomo (Verminnen *et al.*, 2008).

Utilizza antigeni delle diverse specie di clamidia disposti su vetrino come *microdots* (allestita con i corpi elementari purificati delle clamidie) e rileva anticorpi di classe IgG, IgM, IgA, genere specifici-specie specifici, tipo-specifici. Permette di rilevare contemporaneamente sieropositività verso diverse specie di clamidia. Presenta dei limiti in quanto metodica laboriosa, soggettiva e non automatizzabile e possibili *cross* reazioni con altre clamidie. Prove di comparazione di tecniche effettuate da Salina *et al.* nel 1993, su sieri di piccione, hanno dimostrato che immunofluorescenza e microimmunofluorescenza sono più specifiche della fissazione del complemento ed ELISA.

L'immunofluorescenza indiretta, ELISA e microimmunofluorescenza, sono più sensibili e specifiche rispetto alla FDC.

## **6.8. DIAGNOSI BIOMOLECOLARE**

I metodi molecolari rappresentano una valida alternativa all'isolamento. Viste le difficoltà associate a queste tecniche, negli ultimi anni si sono sviluppate altre metodiche di rilevazione diretta di DNA. Le possibilità di diagnostica per clamidia sono notevolmente migliorate con l'introduzione delle metodiche biomolecolari, in particolare con la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), che permette l'identificazione diretta da campioni clinici e di ridurre i tempi di diagnosi. La principale caratteristica di questa metodica è l'elevata sensibilità. Le diverse tecniche di PCR sono state comparate in molti studi con altri metodi diagnostici e al momento è la più sensibile e specifica. Questa metodica è comunemente utilizzata nella diagnosi di clamidiosi aviare, sia ante-mortem, che post mortem, ma anche da colture cellulari o uova embrionate. Si possono analizzare tamponi clinici da cloaca, coana, congiuntiva oppure deiezioni

come *pool* di almeno 3 giorni, meglio se 5-7 giorni, poiché l'eliminazione di clamidia è intermittente e questo permette di individuare il soggetto portatore. Diverse metodiche e protocolli sono riportati in letteratura.

Alcuni comprendono tutte le specie di clamidia, ad esempio utilizzando come target la regione genica RNA ribosomiale 16S-23S rRNA, altre hanno come *target* il gene *ompA* per l'amplificazione (Hewinson, 1997; Everett, 1999; Geens *et al.*, 2005b). Quest'ultimo gene, che codifica per la MOMP, ha 4 *Variable Domains* (VDI-IV) e 5 regioni conservate. Mentre i determinanti antigenici specie specifici e gene specifici sono codificati dalle regioni conservate, i segmenti *serovar* specifici sono posizionati principalmente nella VDII e VIDIV. Questa sua struttura lo rende ideale come *target* per PCR diagnostiche (Sachse *et al.*, 2005). Altri *target* genomici riportati sono rappresentati da *ompB*, 16S RNA, *pmp gene family*.

Hartley *et al.*, 2001, proposero un protocollo di PCR con *target* il gene *ompB* che ha permesso di identificare molte delle specie di clamidia.

La PCR è una metodica di prima scelta per la sua rapidità, sensibilità, specificità, rapporto costo-beneficio, e facilità poichè che richiede un campionamento semplice, minimo, e identifica anche piccole quantità di clamidia. La tecnica di PCR classica può essere utilizzata come *screening*, però non differenzia tra microrganismo vivo e morto, quindi un risultato positivo va interpretato alla luce dei segni clinici o di altri strumenti diagnostici. Anche PCR di tipo nested (Sachse e Hotzel, 2003) e PCR *Real Time* sono state messe a punto. La nested per esempio permette di differenziare *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* (Messmer *et al.*, 1997). Il vantaggio della *Real Time* è rappresentato dal fatto che è una tecnica quantitativa, più rapida e specifica, e permette il rilievo e quantificazione dei diversi genotipi senza necessitare di RFLP e sequenziamento e delle attività post-amplificazione (Geens *et al.*, 2005b; Pantchev *et al.*, 2009; Pantchev *et al.*, 2010).

Protocolli di *Real Time* PCR hanno come bersaglio sia sequenze genomiche conservate delle *Chlamydiaceae* (Everett *et al.*, 1999, DeGraves *et al.*, 2003; Ehricht *et al.*, 2006) sia sequenze genomiche specie-specifiche e genotipo specifiche di *C. psittaci* (Geens *et al.*, 2005b; Pantchev *et al.*, 2009; Pantchev *et al.*, 2010).

Okuda *et al.*, 2010, hanno recentemente sviluppato una metodica di *PCR Real Time* basata su *SYBR Green* da feci, e sembra che questa metodica sia più sensibile e non sia influenzata da inibitori presenti nelle feci a differenza della PCR classica. Inoltre è *one step* per cui non sono necessarie le procedure di manipolazione del campione dopo la reazione di PCR, come l'elettroforesi, riducendo il rischio delle possibili contaminazioni da amplificato e quindi i falsi positivi.

Oltre alla sierotipizzazione, una procedura di genotipizzazione di *C. psittaci* consistente in analisi di restrizione enzimatica dell'amplificato di PCR (RFLP-PCR), è stata introdotta per tipizzare i ceppi di *C. psittaci*, mostrando alta concordanza con la sierotipizzazione, anche se occasionalmente i risultati non sono stati corrispondenti (Sayada, 1995). Questa metodica può essere applicata direttamente a campioni clinici. D'altro canto rispetto ad altri metodi di genotipizzazione la RFLP-PCR non è altamente sensibile se non è presente una quantità sufficiente di DNA da amplificare nel campione di partenza. A volte è necessaria una seconda digestione enzimatica con MboII, in seguito alla prima con AluI. Inoltre, tale metodica non è stata in grado di riconoscere il nuovo genotipo E/B o altri ceppi di *C. psittaci* atipici (Geens *et al.*, 2005a; 2005b).

Questo nuovo genotipo è stato recentemente descritto da Geens *et al.*, (2005a) grazie al sequenziamento dell'*ompA*. Analisi di sequenza dell'*ompA* sono state suggerite particolarmente nei casi dove la sierotipizzazione e la RFLP PCR non sono in grado di fornire risultati conclusivi. Le metodiche sierologiche, RFLP e *Real Time*, non sono in grado di discriminare tra tutti i genotipi e di identificare nuovi genotipi.

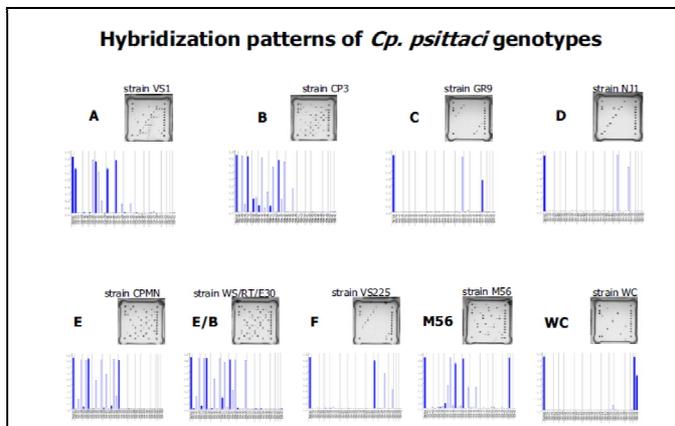
Recentemente, in Germania, Sachse *et al.*, nel 2005, hanno sviluppato una tecnologia innovativa biomolecolare basata su DNA *microarray* utilizzando il sistema *Array Tube* della Alere™ per l'identificazione e la differenziazione in genotipi dei ceppi isolati di clamidia (figura 5-6), e potenzialmente applicabile direttamente a campioni clinici (Borel *et al.*, 2008; Sachse *et al.*, 2009a; 2009b). In particolare sono presenti 28 sonde specie specifiche, 3 sonde genere, 5 sonde di specie vicine al genere *Chlamydia* (*Simkania negevensis*, *Waddlia chondrophila*) e sono compresi i 9 genotipi di *C. psittaci* più i nuovi ceppi. Diversi *pattern* ibridazione specie-specifici sono letti da un software permettendo l'identificazione dei diversi genotipi, fornendo informazioni aggiuntive rispetto alla PCR classica.

Esistono due tipi di DNA *microarray*, uno che ha come target il gene 23S rRNA della famiglia *Chlamydiaceae* e permette l'identificazione di specie (Sachse *et al.*, 2005). Mentre l'altro è stato specificatamente sviluppato per la genotipizzazione di *C. psittaci* basata sulla sequenza dell'*ompA* (Sachse *et al.*, 2008) in particolare mediante ibridazione con 35 sonde, derivate dai domini variabili II e IV del gene *ompA*, in grado di discriminare tra sette genotipi aviari (A, B, C, D, E, F, E/B) e due non aviari (WC e M56).

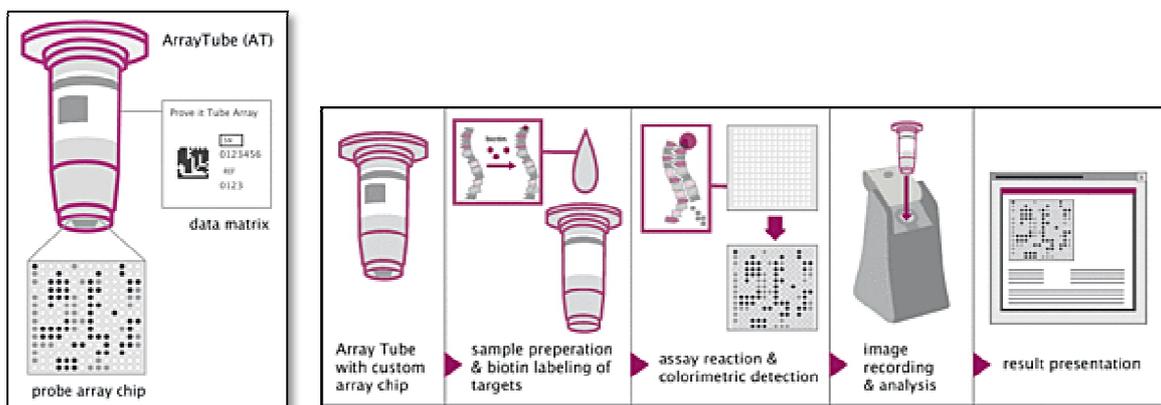
Uno studio di validazione ha recentemente comparato diverse metodiche, riportando che la sensibilità di *Real Time* PCR e *microarray* si è dimostrata equivalente. Questi ultimi rappresentano una metodica più rapida e hanno una maggiore specificità. La loro specificità, che permette il rilievo di un singolo polimorfismo nucleotidico, è dovuto all'approccio che consiste

nell'uso di 35 sonde oligonucleotidiche di ibridizzazione derivate dai domini variabili 2 e 4 del gene *ompA*.

Inoltre sono in grado di evidenziare anche infezioni miste (Borel *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Pattern di ibridizzazione dei nove genotipi di *C. psittaci*, spot diversi in base al tipo di ibridazione con le sonde (Sachse *et al.*, 2008).



**Figura 6.** <http://alere-technologies.com/en/products/lab-solutions/platform-components/array-tube-at.html>

Sistema denominato *Array Tube* (AT), per analizzare DNA *arrays* ad alta e bassa densità. Gli AT sono costituiti da dei *chips* delle dimensioni di circa 3mm X 3 mm (area attiva 2,4 mm X 2,4 mm), sui quali sono depositate o sintetizzate *in situ* le sonde di DNA, collocati sul fondo di una provetta di 1,5 ml. Diversamente da altri sistemi *microarray*, le fasi di ibridazione e rilevazione del segnale sono facili da realizzare senza l'impiego di strumentazione particolare come camere di ibridazione. Il segnale di ibridazione è prodotto da un sistema di catalisi enzimatica non fluorescente ed è sufficiente un lettore a luce trasmessa per monitorare la formazione degli ibridi attraverso la misura cinetica della precipitazione per ogni punto, grazie ad una CCD (*Charged Coupled Device*) camera integrata.

Oltre alla classificazione di *C. psittaci* basata sulla sequenza del gene *ompA*, un nuovo approccio basato su MLVA (*Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) è stato recentemente applicato da Laroucau *et al.*, 2008, che hanno sviluppato una tecnica in grado di tipizzare ulteriormente gli isolati di *C. psittaci*. MLVA è una tecnica di tipizzazione molecolare basata sull'amplificazione dei VNTR (Vergnaud e Pourcel 2009), sequenze polimorfiche di DNA ripetute in tandem all'interno del genoma di *C. psittaci*, che possono essere utilizzate come *marker* per la discriminazione di genotipi differenti. I VNTR sono già stati utilizzati in passato

per tipizzare molti patogeni tra i quali possiamo ricordare *Mycobacterium tuberculosis* (Le Fleche *et al.*, 2002), *Bacillus anthracis* (Le Fleche *et al.*, 2001), *Yersinia pestis* (Pourcel *et al.*, 2004).

Nell'analisi MLVA un numero selezionato e caratterizzato, in termini di mutazioni, di loci vengono amplificati con PCR in modo tale da misurare la lunghezza di ciascun *locus*. Dalle dimensioni di ciascun *locus* si può dedurre il numero di ripetizioni.

Per quanto riguarda la caratterizzazione di *C. psittaci*, sono stati individuati otto VNTR polimorfici sul ceppo aviario di riferimento 6BC (ChlaPsi\_280, ChlaPsi\_480, ChlaPsi\_605, ChlaPsi\_810, ChlaPsi\_222, ChlaPsi\_281, ChlaPsi\_929 e ChlaPsi\_1778) che permettono di discriminare 20 genotipi. Il DNA dei campioni in esame viene sottoposto ad uno *screening* iniziale attraverso una *Real Time* PCR disegnata sul 23S rRNA e successivamente a *Real Time* PCR specie-specifiche per la discriminazione tra *C. psittaci*, *C. abortus* e *C. pecorum* (Pantchev *et al.*, 2009). Le sequenze dei *primer* e delle sonde per queste tre specie sono state disegnate su regioni del gene *ompA*. I campioni che risultano positivi per *C. psittaci* sono ulteriormente tipizzati in una *multiplex* PCR utilizzando otto coppie di *primer*, ciascuna corrispondente ad uno dei VNTR prescelti per l'analisi in MLVA. I prodotti di amplificazione sono separati per elettroforesi su gel d'agarosio e la dimensione di ciascun frammento permette di dedurre il numero di unità ripetute del singolo *locus*. Il bandeggio ottenuto viene confrontato con i *pattern* dei ceppi rappresentativi per *C. psittaci* tipizzati presso il laboratorio francese e dalla combinazione degli otto VNTR si ottiene un profilo di MLVA ascrivibile ad un genotipo. Tuttavia, per mettere in correlazione il *pattern* identificato con uno dei *serovar* di norma classificati con anticorpi monoclonali, è necessario effettuare un'ulteriore analisi PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) su una regione altamente conservata del gene *ompA*, seguita da digestione enzimatica con AluI e MboII (Vanrompay *et al.*, 1997). Il profilo di restrizione viene confrontato con i *pattern* di riferimento in modo da completare l'analisi di genotipizzazione. In alcuni casi, non è stato possibile ottenere una correlazione chiara tra il profilo MLVA e il sierotipo, come nel caso del genotipo E/B recentemente caratterizzato che presenta lo stesso *pattern* MLVA del genotipo C.

Analisi comparative tra MLVA, sierotipizzazione e *ompA* indicano che MLVA è in grado di discriminare 20 *patterns*.

Molti dei ceppi di genotipo A hanno mostrato un *pattern* 12, mentre molti dei ceppi di genotipo B ed E hanno mostrato un *pattern* 7. Finora gli isolati di piccione hanno mostrato quattro differenti *pattern* 1,7, 12, 19.

MLVA può essere utilizzata come metodo molto sensibile di tipizzazione per evidenziare le diversità molecolari tra i ceppi di *C. psittaci* di diverse specie ospiti e origine geografica per futuri studi epidemiologici, oltre che essere eseguibile direttamente da DNA estratto di campione clinico.

## 7. CONTROLLO DELLA MALATTIA

La clamidiosi è riconosciuta come una patologia che rappresenta un problema di sanità pubblica. Il controllo della psittacosi nell' uomo dipende infatti dal controllo della malattia nelle specie aviari, e la terapia antibiotica è attualmente l'unico metodo di controllo efficace delle infezioni da clamidia sia in medicina umana che veterinaria.

Smith *et al.*, 2010, riportano le linee guida da seguire per il trattamento della clamidiosi in *pet birds* o in uccelli che sono stati esposti all'infezione. I programmi terapeutici prevedono il trattamento antibiotico degli uccelli infetti mediante l'utilizzo delle tetracicline come farmaci di prima scelta, in particolare clortetraciclina, doxiciclina, sebbene anche chinoloni (enrofloxacin) e macrolidi (azitromicina) possano essere utilizzati. Per i *pet birds*, 45 giorni di trattamento sono spesso raccomandati, tranne nelle cocorite dove trenta giorni sono sufficienti, da somministrare nell' alimento, nell' acqua di bevanda, o per via intramuscolare.

Per quanto riguarda le misure di immunoprofilassi, non esistono al momento vaccini commerciali disponibili per la clamidiosi aviare in nessuna specie, anche se attualmente la ricerca sta sviluppando tali presidi. A questo proposito nei tacchini, Page nel 1975, mediante un vaccino consistente in una sospensione inattivata di *C. psittaci*, ha ottenuto successi nell' indurre una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata con protezione del 90% degli animali. (Ulteriori sviluppi di questo vaccino non sono poi proseguiti poiché per ottenere migliori risultati nella protezione erano necessarie due dosi di vaccino a otto settimane di distanza.)

Sempre nei tacchini, anche un vaccino sperimentale a DNA plasmidico esprimente la MOMP di *C. psittaci serovar A* ha dato buoni risultati nel generare una risposta umorale e cellulo-mediata dimostrando un significativo livello di protezione (Vanrompay *et al.*, 1999).

Più recentemente, Harkinezhad *et al.* (2009a) in *Melopsittacus undulatus* hanno dimostrato che un vaccino sperimentale a DNA plasmidico esprimente la MOMP di *C. psittaci* genotipo A, è stato in grado di ridurre i segni clinici, le lesioni macroscopiche e l' escrezione della clamidia.

In seguito al verificarsi di episodi di malattia, sia nell'uomo che negli animali, legati ad importazioni incontrollate di volatili, molti paesi hanno adottato delle misure di controllo relative

all'importazione e alla commercializzazione di uccelli per limitare la diffusione della clamidiosi (Satalowich *et al.*, 1993).

I requisiti per le importazioni di uccelli in Unione Europea (UE) sono delineati dalle Direttive 90/539/CEE (relativa alle norme di polizia sanitaria per gli scambi intracomunitari e le importazioni in provenienza dai paesi terzi di pollame e uova da cova) e 2000/666/CE. Pollame e uccelli possono essere importati in UE solo da paesi membri OIE e accompagnati da un certificato sanitario, ed in particolare i psittaciformi devono essere identificati individualmente con anello nella zampa o *microchip*. La Decisione 2000/666/CE della Commissione (CEC, 2000) è relativa invece alle norme di importazione di uccelli diversi dal pollame, e riporta nell'articolo 5 che questi animali devono essere sottoposti ad un periodo di quarantena di almeno trenta giorni in adeguate strutture. Se durante tale periodo di quarantena è sospettato o confermato che psittaciformi siano infetti da *C. psittaci*, tutti gli uccelli di quella spedizione devono essere trattati con metodo approvato dalle Autorità competenti e la quarantena deve essere prolungata per almeno due mesi successivi all'ultimo caso registrato.

All'interno dell' UE gli uccelli possono essere movimentati tra gli Stati membri senza bisogno della quarantena. Tuttavia, pollame, uova da cova e psittaciformi devono essere sempre accompagnati da un certificato sanitario e quest'ultimi identificati individualmente.

In USA, in aggiunta al certificato, nel periodo di quarantena di trenta giorni i psittaciformi devono essere trattati con alimento medicato contenente >1% di clortetraciclina (quantità sufficiente a mantenere la concentrazione nel sangue superiore a 1µg/ml) (Flammer, 1989). Il trattamento deve essere poi proseguito per almeno 15 giorni per un totale di 45 giorni. Un periodo di trenta giorni è considerato sufficiente per le cocorite, mentre per il pollame sono necessarie almeno due settimane con sospensione del trattamento due giorni prima della macellazione (Grimes e Wyrick, 1991).

Nel Manuale OIE 2010, si riporta che le Autorità Veterinarie di paesi esenti da clamidia devono proibire l'importazione e il transito attraverso i loro territori di Psittacidi provenienti da paesi in cui la malattia è presente. Inoltre, è previsto che le Autorità veterinarie dei paesi che importano questi uccelli, richiedano un certificato internazionale che attesti che gli animali non avevano segni di clamidiosi il giorno della spedizione, che sono stati sottoposti a supervisione veterinaria 45 giorni prima della spedizione ed infine che siano stati trattati per la clamidiosi utilizzando clortetraciclina.

Dal punto di vista legislativo in Italia secondo il Decreto Ministeriale del 15 dicembre del 1990, sistema informativo delle malattie infettive e diffuse, l'ornitosi è classificata tra le malattie della classe quinta, che comprende le malattie infettive e diffuse notificate all'unità sanitaria

locale non comprese nelle prime quattro classi precedenti, comprendente le zoonosi indicate dal Regolamento di Polizia Veterinaria di cui al decreto del Presidente della Repubblica 8 febbraio 1954, n. 320. Come modalità di notifica le unità sanitarie locali devono comunicare annualmente il riepilogo di tali malattie alla Regione e questa al Ministero per le vie ordinarie. Ove tali malattie assumano le caratteristiche di focolaio epidemico, verranno segnalate con le modalità previste per la classe quarta. Secondo il Regolamento di Polizia Veterinaria è riportata all'articolo 5 e prevede l'obbligo della segnalazione reciproca tra servizio veterinario e servizio igiene pubblica delle Aziende Sanitarie Locali in seguito ad insorgenza di casi di malattia negli animali e nell'uomo. Inoltre, è considerata una zoonosi occupazionale (malattia professionale), per la quale è obbligatoria la denuncia, come da pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale del 19 marzo 2010, lista I (malattie la cui origine lavorativa è di alta probabilità) gruppo 3 (malattie da agenti biologici esclusi i tumori in quanto riportati nel gruppo 6) in quanto riscontrata in determinate categorie professionali (personale di grandi allevamenti avicoli, impiegati allo zoo e in *pet shop*, veterinari, laboratoristi e allevatori).

In ambito europeo, la Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici (Gazzetta ufficiale n. L 325 del 12/12/2003) ha incluso le clamidiosi animali sotto la denominazione di "psittacosi e relativi agenti zoonotici" nell'Allegato I, parte B, tra le zoonosi e gli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica del territorio di ciascun Stato Membro. Mentre la Direttiva 2007/318/CE prevede il campionamento per clamidia dei volatili importati da paesi terzi, solo in seguito a sospetto clinico.

Infine, secondo la classificazione degli agenti biologici del bioterrorismo proposta nel 1999 dal CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*) degli Stati Uniti, *C. psittaci* appartiene alla categoria B che comprende microrganismi che possono essere disseminati in modo moderatamente facile, provocano morbilità moderata e mortalità bassa e richiedono specifiche capacità per la diagnosi di laboratorio e per il controllo dell'infezione.

Sebbene la trasmissione di malattia all'uomo risulta essere piuttosto rara, particolari condizioni dello stato immunitario e scorrette attività di gestione degli animali possono aumentare il rischio di trasmissione del patogeno. Smith *et al.*, 2010, raccomandano delle misure generali di prevenzione e comportamenti da adottare sia nei *pet birds* che nell'uomo, per impedire o ridurre il rischio del diffondersi della malattia all'uomo.

Tra queste, possiamo ricordare soprattutto se si rientra nelle categorie di personale a rischio, di adottare comuni norme di igiene e precauzioni nelle operazioni di pulizia e disinfezione delle voliere o nella manipolazione di uccelli potenzialmente infetti e materiale contaminato,

indossando dispositivi di protezione quali guanti, cuffie, occhiali e mascherine per ridurre l'aerosol e l'inalazione delle polveri. Queste ultime sono raccomandate anche a livello industriale negli impianti di trasformazione del pollame. Precauzioni devono essere anche intraprese durante l'esame anatomico-patologico di soggetti infetti o potenzialmente infetti. Le carcasse devono essere inumidite con disinfettanti ai fini di impedire l'aerosolizzazione.

Tra le misure consigliate da adottare negli animali ricordiamo quelle di mantenere in quarantena i nuovi acquisti o i soggetti potenzialmente esposti a clamidia, fino al controllo sanitario, non sottovalutando l'eventuale presenza di sintomatologia respiratoria; evitare allevamenti multispecie e di acquistare o vendere uccelli con segni compatibili alla clamidiosi.

Infine, sarebbe opportuno mantenere tracciabilità per almeno un anno delle transazioni legate alla vendita e acquisto degli uccelli in modo tale da permettere l'eventuale identificazione della fonte di infezione e delle persone potenzialmente esposte.

# **PARTE SPERIMENTALE**

## 1. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare la prevalenza di *Chlamydia spp.* in popolazioni di specie aviarie con caratteristiche sinantropiche quali il colombo di città (*Columba livia var. domestica*) nell'areale veneziano. Contestualmente all'obiettivo principale ci siamo proposti di perseguire ulteriori obiettivi, con il fine di caratterizzare in modo più approfondito la presenza di clamidie in una popolazione di colombi urbani.

Il ruolo zoonosico di *C. psittaci* è ampiamente dimostrato, anche se risulta difficile correlare l'infezione in animali sinantropi con un reale rischio per l'uomo. Tale affermazione trova conferma nel fatto che la sola identificazione di specie, all'interno del genere *Chlamydia*, alle volte non è sufficiente a determinare strette connessioni epidemiologiche, e spesso sono richieste informazioni aggiuntive che possono caratterizzare ulteriormente questo patogeno, quali per esempio il tipo di *serovar* e *genovar*. Le nuove tecnologie ci permettono di identificare all'interno della specie *C. psittaci* il sierotipo e genotipo determinando in tal modo una migliore e più specifica identificazione del patogeno. Alcune tecniche biomolecolari (RFLP-PCR o sequenziamento del gene *ompA*) di recente introduzione presentano il vantaggio di non richiedere l'isolamento del ceppo da tipizzare. Altre metodologie, quali DNA *microarray* ed MLVA (*Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) possono permettere una ulteriore caratterizzazione molecolare dei ceppi coinvolti.

Sulla base delle suddette affermazioni ci siamo proposti di studiare, contestualmente all'obiettivo principale, ulteriori caratteristiche di *C. psittaci* con il fine di valutare i genotipi presenti nella nostra popolazione di colombi di città.

Per perseguire tale obiettivo abbiamo deciso di isolare il microrganismo e di applicare in seguito queste recenti tecniche di tipizzazione dei ceppi. Tale approccio metodologico ha richiesto una selezione dei campioni al fine di contenere i costi operativi, quindi in una prima fase si è deciso di eseguire l'isolamento solo su organi risultati positivi mediante PCR, strutturando contestualmente un sistema che permettesse di identificare alcune specifiche caratteristiche anatomo-patologiche utili a selezionare gli animali infetti all'interno della popolazione oggetto dello studio.

Purtroppo la maggior parte delle specie aviari rappresentano un serbatoio per alcune specie del genere *Chlamydia* e nella maggior parte di queste non è possibile avanzare un forte sospetto della presenza di tale agente patogeno attraverso un esame clinico od anatomo-patologico, a causa delle scarse correlazioni tra la sintomatologia e le eventuali lesioni anatomo-patologiche con lo stato di animale infetto.

Questa carenza pregiudica notevolmente l'esame autoptico quale strumento di *screening* preliminare, volto alla selezione dei campioni potenzialmente infetti.

A causa di ciò ed al fine di focalizzare la nostra attenzione solamente su organi con elevata probabilità di infezione abbiamo deciso di valutare eventuali correlazioni tra stato funzionale dei soggetti e le lesioni anatomico-patologiche con lo stato di infezione da *Chlamydia*.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1. Fase iniziale dello studio**

Dato che sia i segni clinici che le lesioni anatomico-patologiche non permettono di avanzare un corretto sospetto e considerato lo stato di portatore asintomatico tipico delle specie aviarie, e nel nostro caso dei colombi, abbiamo ritenuto opportuno nella prima fase dello studio redarre e strutturare un protocollo di prelievo, valutando lo stato sanitario generale dei soggetti.

Il protocollo ha previsto dapprima la compilazione di schede di rilevamento per singolo soggetto in cui venivano raccolti una serie di parametri e dati prefissati, utili durante l'esecuzione degli esami autoptici. La scelta dei parametri da studiare è stata effettuata con il fine di focalizzare la nostra attenzione solamente a quei soggetti presentanti determinate lesioni correlabili alla positività per clamidia.

La scheda di segnalamento e rilievo autoptico ha previsto dapprima una valutazione dello stato sanitario generale dei soggetti. In particolare, il segnalamento ha riguardato la valutazione dell'età dell'animale differenziando lo stesso come adulto o giovane; lo sviluppo delle masse muscolari, l'armoniosità della carcassa, lo stato del piumaggio, la presenza di ectoparassiti ed endoparassiti, e soprattutto il rilievo di lesioni anatomico-patologiche a carico principalmente di fegato, milza, apparato respiratorio e gastroenterico. Tali informazioni sono state raccolte secondo una scala di *grading* che variava da A a D, in cui con il livello A si intendeva la forma fisiologica o l'assenza di parassiti e con livello D una evidente alterazione patologica o una grave infestazione parassitaria.

Per la definizione di animale adulto, giovane, e del sesso, ci si basava sullo sviluppo delle gonadi e sul colore della livrea, dato che in queste specie dopo la prima muta si ha un vistoso cambiamento della stessa.

Per lo stato di nutrizione invece ci si basava sullo sviluppo delle masse muscolari e dei depositi adiposi.

Per le dimensioni della milza sono state considerate le seguenti misure: 0,5-1 cm per il livello A; 1-1,5 cm per il livello B; 1,5-2 cm per il livello C; mentre > di 2 cm per il livello D.

Una volta effettuato l'esame anatomo-patologico e compilata la scheda di rilevamento per singolo soggetto venivano effettuati i prelievi d'organo in singolo, al fine di sottoporli agli esami successivi.

Ogni soggetto veniva opportunamente identificato e numerato in modo tale da avere la corrispondenza del soggetto con gli esami inviati presso altri laboratori e con i dati rilevati durante l'esame autoptico.

Da ogni soggetto è stato comunque preventivamente prelevato un campione ematico in doppia aliquota per effettuare uno *screening* sierologico con ricerca anticorpale per *Chlamydia psittaci* mediante Fissazione Del Complemento, secondo protocollo del Manuale OIE (Andersen, 2008), utilizzando un antigene commerciale.

In particolare, nelle carcasse sottoposte all'esame autoptico è stata rilevata per singolo soggetto l'eventuale presenza di ectoparassiti, lo stato di nutrizione, ed è stata posta particolare attenzione agli organi *target* del patogeno, quali fegato e milza, al fine di evidenziare alterazioni degli stessi o eventuali lesioni anatomo-patologiche correlabili a clamidiosi aviare.

Inoltre, sulle carcasse e sugli organi a disposizione sono state valutate le endoparassitosi ed annotate con sistema di *grading* da A a D.

Al fine di dimostrare la presenza di *Chlamydia* spp. nei soggetti analizzati è stato deciso di effettuare un'analisi preliminare di *screening*, mediante metodiche di biologia molecolare, direttamente da questi organi bersaglio.

Gli organi risultati positivi per *Chlamydia* in RFLP-PCR classica sono stati processati con metodiche di isolamento tradizionale in uova embrionate di pollo SPF ed in colture cellulari LLC-MK2, al fine di isolare il ceppo su cui effettuare ulteriori accertamenti diagnostici e metodiche innovative di caratterizzazione quali *microarray* ed MLVA. I campioni diagnostici sono stati correttamente identificati e prelevati in sterilità.

## **2.2. Seconda fase dello studio**

In seguito, sono state apportate una serie di modifiche, al fine sia di aumentare le percentuali di isolamento sia di arrivare a valutare un metodo che potesse permettere di effettuare uno *screening* di animali potenzialmente positivi. Per aumentare le percentuali di isolamento in particolare sono state variate le condizioni di conservazione e stoccaggio dei campioni prelevati a -80 °C, e con l'aggiunta in rapporto di 1:10 di SPG, terreno di trasporto a base di saccarosio,

fosfato di potassio, acido glutammico, con un pH finale di 7,4. La scelta del terreno e della temperatura è stata valutata al fine di migliorare la sensibilità diagnostica.

Inoltre, è stata selezionata la milza rispetto al fegato come organo per l'isolamento poiché risultava essere meno tossica per le colture cellulari ed uova embrionate.

A tal fine sia il fegato che la milza, sono stati prelevati in doppia aliquota, di cui una destinata alla valutazione preliminare (*screening*) mediante metodiche biomolecolari (PCR) ed un'altra congelata a -80°C con opportuno terreno di trasporto antibiotato per l'eventuale successivo isolamento colturale. Tutti i campioni diagnostici sono stati sempre opportunamente identificati e prelevati in sterilità.

Dato che dai dati ottenuti durante la prima fase di prelievi abbiamo dimostrato una evidente correlazione tra età dei soggetti, sesso femminile ed epatomegalia, abbiamo deciso al fine di contenere il numero di campioni da analizzare, di selezionare sulla base di questi risultati animali di sesso femminile, adulti e con epatomegalia.

La seconda serie di campionamenti e prelievi d'organo è stata effettuata su un campione di 100 colombi, provenienti dalle medesime aree, suddivisi in gruppi di 20. Le modalità operative e le metodiche di laboratorio sono state le stesse ma i colombi sono stati scelti sulla base della epatomegalia selezionando soggetti classificati pari od oltre il livello C della scala di *grading* da noi applicata.

Seppur indaginoso tale approccio metodologico era finalizzato al contenere il numero di isolamenti successivi con un notevole risparmio di risorse, cercando di focalizzare l'attenzione solamente sui campioni molto probabilmente positivi.

### **2.3. Scelta degli animali per lo studio**

Il gruppo di animali oggetto d'indagine e di campionamento è stato rappresentato da specie aviarie sinantropiche, ovvero colombi di città (*Columba livia var. domestica*, Gmelin 1789), provenienti da differenti aree della città storica di Venezia e Mestre, in collaborazione con il Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Locale 12 Veneziana, nell'ambito di un piano di controllo sanitario nel periodo dal 2007 al 2010. I prelievi sono stati eseguiti inizialmente su 439 colombi.

## 2.4. Area di studio e distribuzione geografica dei siti di cattura

Gli animali sono stati catturati casualmente in diverse zone della città storica di Venezia e in poche zone nella provincia di Mestre (figura 7).



**Figura 7.** Siti di provenienza dei colombi urbani. In particolare riportiamo le zone del centro storico di Venezia.

Legenda.

- a: Calle larga dell' Ascension
- b: Giardini Papadopoli
- c: Campo Santa Maria Formosa
- d: Campo San Trovaso
- e: Campo Santi Giovanni e Paolo di Castello
- f: Fondamenta Cannaregio
- g: Piazza San Marco
- h: Dorsoduro
- i: Campo San Pietro
- l: Salizada San Pantalon
- m: Riva Di Biasio
- n: Campo San Lorenzo
- o: Campo Della Fava

## 2.5. Esame autoptico delle carcasse

Dopo opportuno posizionamento e preparazione delle carcasse, si è proceduto dapprima all'esame esterno, volto ad evidenziare la eventuale presenza di ectoparassiti e successivamente all'esame interno. Prima di procedere a tale esame le carcasse sono state inumidite con disinfettante per impedire i rischi legati alla potenziale aerosolizzazione.

L'esame autoptico procedeva focalizzando l'attenzione nell'esame della cavità toraco-addominale, in particolare all'apparato digerente, respiratorio, e agli organi *target* quali milza e fegato.

Prima di procedere all'esame autoptico vero e proprio, dapprima veniva effettuato in sterilità il prelievo in doppia aliquota degli organi interessati nello studio, fegato e milza, per evitare eventuali contaminazioni degli stessi, previa compilazione della scheda di rilevamento (tabella 10). La milza fisiologicamente nel colombo è situata tra stomaco muscolare e ghiandolare. In questa specie ha una tipica forma allungata e viene messa in evidenza ruotando di 180° lo stomaco ghiandolare. Il fegato invece rappresenta un organo molto voluminoso costituito da due lobi di colorito cioccolato scuro e situato nella porzione ventrale della cavità celomatica al di sopra degli altri visceri e al di sotto del cuore. In condizioni fisiologiche il suo margine caudale supera leggermente il margine caudale del petto (figura 8).

**Figura 8.** Milza e fegato fisiologici nel colombo di città.



**Tabella 10.** Scheda rilevamento colombi.

**SCHEDA SEGNALAMENTO E RILIEVO AUTOPTICO PRELIEVO DEL .../.../ 200... N. ACC.....**

**A: buono–normale–assenza di parassiti–fisiologico**

**B: medio–modicamente aumentato di volume–modica infestazione–congestione**

**C: insufficiente–aumentato di volume–media infestazione–media alterazione**

**D: scarso–notevolmente aumentato di volume–grave infestazione–grave alterazione**

**G/A: giovane o adulto (figura 9a-b).**

N. PROGR. ANIMALE	STATO DI NUTRIZIONE A-B-C-D	ETA' (G /A)	ECTOPARASSITI A-B-C-D	ENDOPARASSITI A-B-C-D	MILZA A-B-C-D	FEGATO A-B-C-D	INTESTINO A-B-C-D	APPARATO RESPIRATORIO A-B-C-D
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								



**Figura 9 a-b.** Soggetti maschio e femmina adulti.

## **2.6. Fissazione del complemento (FDC)**

Per la ricerca di anticorpi anti-*Chlamydia*, tutti i sieri raccolti sono stati analizzati con metodica di fissazione del complemento (FDC) secondo la procedura diagnostica descritta nel Manuale OIE (Andersen, 2008). Allo scopo è stato utilizzato un antigene commerciale per *Chlamydia psittaci* (Siemens Healthcare Diagnostic Products®) con *cut-off* di 1:10.

Questo test è applicato allo scopo di evidenziare anticorpi verso *Chlamydia psittaci*. Nella reazione di fissazione del complemento viene evidenziata una reazione antigene-anticorpo sfruttando la capacità litica del complemento, ponendo a contatto antigene ed eventualmente anticorpi presenti nel siero e complemento, e successiva aggiunta del sistema rilevatore o sistema emolitico (complesso antigene-anticorpo costituito da eritrociti di montone ed emolisina).

I sieri sono stati precedentemente diluiti (1:10 con una soluzione tampone) ed inattivati (per 30 minuti a  $58\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Il principio dell'analisi prevede che in assenza di anticorpi si avrà emolisi, campione negativo, in quanto il complemento rimasto libero si lega al sistema rilevatore lisando i globuli rossi. Mentre in presenza di anticorpi, e quindi campione positivo si avrà la fissazione del complemento in percentuale variabile con sedimentazione dei globuli rossi.

La metodica consiste in una prova di *screening* che consente di identificare i campioni positivi e successivamente, dai sieri positivi si procede alla titolazione per valutare la massima diluizione del siero in grado di fissare il complemento, considerando positivi titoli a partire da 1:10.

Una volta preparate le piastre da microtitolazione, in cui ogni pozzetto corrisponde ad un siero, e preparate altrettante piastre per la prova di anticomplementarietà dei sieri, vengono aggiunti 25  $\mu\text{l}$  di siero (precedentemente diluito e inattivato) in entrambe le piastre, e 25  $\mu\text{l}$  di antigene (diluito con soluzione tampone) e 25  $\mu\text{l}$  di complemento (diluito a 2U con soluzione tampone) in ogni pozzetto, riportando in uno schema la distribuzione dei sieri nei pozzetti, in modo tale che ogni siero sia sempre individuabile. Nella piastra anticomplementarietà si distribuiscono invece 25  $\mu\text{l}$  di soluzione tampone e 25  $\mu\text{l}$  di complemento di cavia (corrispondente a 2U) in ciascun pozzetto. In seguito le piastre vengono agitate con agitatore, chiuse con coperchio ed incubate a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti. Nel frattempo viene preparato il sistema emolitico mescolando volumi uguali di globuli rossi di montone al 2% ed emolisina a 2U) sensibilizzato in bagnomaria a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per 15'. Vengono poi aggiunti 25  $\mu\text{l}$  di sistema emolitico in ciascun pozzetto, e le piastre una volta agitate e chiuse con un coperchio vengono incubate a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti e centrifugate per 2-3 minuti a 2000 rpm.

La presenza di fissazione e di emolisi viene evidenziata utilizzando uno sfondo bianco o uno specchio per la lettura della FDC. Quando si ha emolisi il surnatante si presenta limpido e di colore rosso chiaro; quando si ha fissazione si osserva sul fondo del pozzetto un bottone di colore rosso determinato dalla sedimentazione degli eritrociti integri ed il surnatante è incolore (assenza di emolisi = 100% di fissazione) o parzialmente colorato (emolisi parziale = 25-50-75% di fissazione). Il risultato della prova si considera valido quando nel relativo pozzetto della prova di anticomplementarità si ha emolisi, perché in assenza di antigene il complemento, rimasto libero, si va a legare al sistema emolitico e provoca la lisi dei globuli rossi.

Se non c'è anticomplementarità si procede alla lettura della prova di FDC, l'assenza di anticorpi provoca emolisi, mentre la presenza di anticorpi provoca la fissazione del complemento con conseguente sedimentazione dei globuli rossi.

I sieri che sono risultati positivi alla prova di *screening* con qualsiasi grado di fissazione devono essere titolati in modo da poter valutare la massima diluizione del siero in grado di fissare il complemento.

Il titolo è dato dalla più alta diluizione del siero in cui si ha fissazione pari o superiore al 50%. Il siero viene considerato positivo quando il titolo è superiore a 1:10. Viene considerato invece negativo quando il titolo è inferiore a 1:10.

## **2.7. RFLP-PCR**

Il protocollo prevede una PCR classica con restrizione enzimatica successiva all'amplificazione ed ha come bersaglio il gene codificante la subunità 16S dell'RNA ribosomale e consente di distinguere tra alcune specie di clamidia, *C. abortus*, *C. suis*, *C. pecorum* e *C. psittaci* (Vicari *et al.*, 2004). Il protocollo seguito per la metodica di RFLP-PCR è stato estratto da Vicari *et al.*, 2004.

Per la reazione di PCR è stato utilizzato un termociclatore "GeneAmp PCR System 9700" alle seguenti condizioni (tabella 11).

**Tabella 11. Condizioni di PCR.**

<b>Condizioni PCR</b>	Denaturazione pre-PCR	95 °C per 15 minuti	
	Denaturazione	95 °C per 30 secondi	20 cicli
	<i>Annealing</i>	65 <sup>(1)</sup> ÷ 55 °C per 30 secondi	
	Estensione	72 °C per 30 secondi	
	Denaturazione	95 °C per 30 secondi	25 cicli
	<i>Annealing</i>	55 °C per 30 secondi	
	Estensione	72 °C per 30 secondi	
	Estensione <i>post-PCR</i>	72 °C per 5 minuti	

<sup>(1)</sup> La temperatura di *annealing* comincia a 65°C (al ciclo 1) e decresce di 0,5°C ad ogni ciclo fino a raggiungere i 55°C (al ciclo 20).

Al termine della reazione le provette sono state portate alla temperatura di 4°C fino allo spegnimento dello strumento. È seguita la preparazione del gel per elettroforesi. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 1,5% in TBE (89 mM Tris; 89 mM acido borico; 20 mM EDTA, pH 8.0) delle dimensioni di 100X80 mm contenente etidio bromuro (0,5 µg/ml). La corsa elettroforetica è stata effettuata in tampone TBE 1X alla tensione di 100 V per 30 minuti. Al termine della separazione elettroforetica il gel è stato posto sul transilluminatore a raggi UV per acquisire l'immagine con il sistema di fotodocumentazione. In seguito è stata effettuata la fase di restrizione enzimatica con enzimi di restrizione (MseI) del prodotto amplificato positivo.

La miscela è stata preparata e aliquotata (5 µl) in provette da PCR da 200 µl. Ad ognuna di queste provette sono stati aggiunti 5 µl di prodotto di amplificazione di ogni campione risultato positivo. Il tutto è stato incubato a 65°C per 1 ora. I prodotti ottenuti dalla digestione degli amplificati sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide 7% in TBE (89 mM Tris; 89 mM acido borico; 20 mM EDTA, pH 8.0) delle dimensioni di 100X80 mm alla tensione di 200 V per 45 minuti. È stato utilizzato lo *standard* di pesi molecolari Marker V (Roche Diagnostics).

E' stato considerato positivo per il *target* ricercato, il campione che presentava l'amplificato corrispondente a 270 bp, e se dopo digestione il profilo elettroforetico era conforme a quanto riportato nella tabella di identificazione successiva (tabella 12).

<i>Chlamydia</i>	dimensioni amplificato digerito con Mse I in bp
<i>C. abortus</i>	159, 81, 29
<i>C. psittaci</i>	159, 110
<i>C. pecorum</i>	88, 81, 70, 29

**Tabella 12.** Dimensioni amplificato digerito con MseI.

Una successiva identificazione all'interno del gruppo è possibile con ulteriori analisi di restrizione sui prodotti di amplificazione.

### **2.7.a. REAL TIME PCR**

Lo schema del protocollo seguito per alcune conferme diagnostiche mediante *Real time PCR* è stato estratto da Pantchev *et al.*, 2009.

### **2.8. DNA MICROARRAY**

Come descritto precedentemente, questa metodica consente sia l'identificazione di specie che la genotipizzazione di *C. psittaci*. I campioni oggetto dello studio sono stati analizzati presso il Friedrich-Loeffler-Institut di Jena, laboratorio di referenza nazionale per le clamidiosi in Germania, in quanto tale tecnologia basata su DNA *microarray* utilizzando il sistema *Array Tube*<sup>TM</sup> è stata messa a punto dal Dr. Sachse e collaboratori (Sachse *et al.*, 2005).

### **2.9. MLVA (*Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis*)**

Come descritto precedentemente, rappresenta una tecnica di tipizzazione molecolare basata su amplificazione dei VNTR, sequenze polimorfiche di DNA, ripetute in tandem che possono essere utilizzate come *marker* per la discriminazione di genotipi differenti da isolati di *C. psittaci*. L'analisi MLVA è stata eseguita sui campioni positivi per *C. psittaci*, analizzati presso l'AFSSA (*Bacterial Zoonoses Unit, French Food Safety Agency*), secondo protocollo di Laroucau *et al.*, 2008.

## **2.10. Isolamento di *Chlamydia* spp. in uova embrionate di pollo SPF (*Specific Pathogen Free*) (Andersen, 2008).**

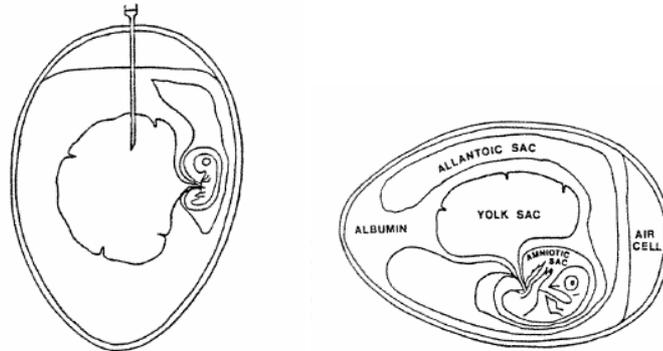
Ai fini dell'isolamento sono state utilizzate uova embrionate di pollo SPF a sette giorni di incubazione. Il materiale in esame viene omogenato in SPG ed inoculato nel sacco vitellino. L'embrione, in caso di campione positivo, viene generalmente a morte entro 5-12 giorni, ma in presenza di uno scarso titolo infettante o di ceppi a bassa patogenicità, può anche sopravvivere. Quindi si rende necessaria l'esecuzione di almeno tre passaggi ciechi. La presenza di *Chlamydia* è evidenziabile sulla membrana vitellina degli embrioni venuti a morte a partire dal quinto giorno dopo l'inoculazione.

Le uova embrionate di pollo vengono incubate in termostato fino al 7° giorno a  $37\pm 2^\circ\text{C}$ . Al 7° giorno di incubazione si procede alla speratura per verificare la sua vitalità; se l'embrione risulta vitale presenta dei movimenti ed il sistema venoso è molto evidente; altrimenti viene considerato non vitale ed eliminato per la prova di isolamento. Mediante l'illuminazione fornita dalla lampada, con una matita viene segnato il contorno della camera d'aria dell'uovo e con una X la posizione dell'embrione al momento della speratura. Successivamente le uova vengono contrassegnate a matita e numerate con l'identificazione del campione, della diluizione (almeno 2-4 per diluizione 1:2, 1:10, 1:100), e dei controlli negativi (almeno 2). In seguito, si procede alla disinfezione della parte apicale del guscio delle uova e del punzone per l'inoculo, con alcool etilico al 70% e con soluzione a base di iodio. Mantenendo le uova in posizione verticale con la camera d'aria rivolta verso l'alto, si esegue un piccolo foro nella parte centrale della camera d'aria sulla superficie del guscio precedentemente identificata. Mediante siringhe sterili da 1 ml e aghi da 0,7 x 30 mm si prelevano 0,2 ml di campione e si inoculano lentamente evitando la formazione di bolle d'aria (figura 10).

### **2.10.1. Preparazione dell'inoculo per isolamento in uova embrionate e in colture cellulari**

I campioni d'organo (fegato o milza) risultati positivi allo *screening* con metodica PCR e conservati mediante congelamento in terreno specifico di trasporto SPG, venivano scongelati, omogenati in un mortaio sterile con quarzo sterile e centrifugati per 10 minuti a 3000 rpm. Successivamente veniva raccolto il surnatante ed incubato per 2 ore a temperatura di  $37^\circ\text{C}$ . Il campione veniva diluito 1:2, 1:10, 1:100, con SPG e la parte non inoculata veniva conservata e congelata a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.10.2. Modalità di inoculo del campione



**Figura 10.** Modalità di inoculo e struttura di un uovo embrionato (Hawkes, 1979).

Il campione va inoculato lentamente nel sacco vitellino tenendo la siringa in posizione verticale inserendo l'ago dall'alto verso il basso per quasi tutta la sua lunghezza. Nelle uova utilizzate come controlli negativi vengono inoculati 0,2 ml di SPG antibiotato. Il foro della camera d'aria viene chiuso con colla. A questo punto le uova vengono incubate in termostato per 14 giorni a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  (figura 10).

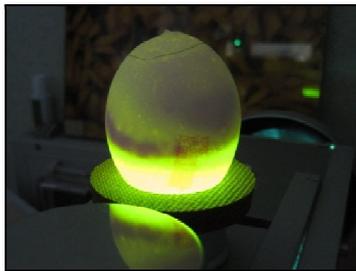
### 2.10.3. Controllo della vitalità delle uova

La vitalità delle uova viene controllata mediante speratura con lampada dopo 72 ore dall'inoculo e successivamente a cadenza giornaliera (figura 11-12). Le mortalità degli embrioni entro 3 giorni dalla data di inoculo sono da attribuire a *shock*-tossico, o a danni causati dall'ago durante l'inoculo e per tale motivo non vengono considerati per la prova. Invece, da ogni embrione venuto a morte nei giorni successivi al terzo post inoculo fino alla fine della prova (14 giorni post-inoculo) viene prelevato il sacco vitellino.

Nel caso in cui l'embrione sia risultato ancora vitale alla speratura del 14° giorno post-inoculo, il prelievo viene eseguito dopo aver mantenuto le uova a  $+4^{\circ}\text{C}$  per almeno 4 ore.



**Figura 11.** Esempio di speratura ed evidenza del sistema venoso di un embrione vitale.



**Figura 12.** Esempio di embrione non vitale.

#### **2.10.4. Estrazione degli embrioni dalle uova e prelievo del sacco vitellino**

Le uova vengono trasferite all'interno di una cappa biologica e dopo aver disinfettato il guscio con alcool etilico al 70% e con soluzione iodio-iodurata si apre il guscio all'altezza della camera d'aria con forbici sterili, seguendo la linea della camera d'aria precedentemente delineata con la matita. Si rimuove il guscio, si taglia la membrana testacea e si trasferisce il contenuto in una piastra Petri sterile. A questo punto viene prelevato il sacco vitellino e posto in un'altra piastra Petri. Parte di quest'organo viene utilizzata per eseguire impronte su vetrino al fine di effettuare la colorazione di Gimenez. Le restanti porzioni di sacchi vitellini del medesimo inoculo, vengono raccolte in *pool* (per ogni diluizione) in provette tipo *Falcon* sterili opportunamente identificate dopo aver proceduto ad omogeneizzazione con quarzo sterile e terreno SPG in un mortaio sterile (1 ml di terreno SPG per ogni sacco vitellino). Le provette vengono centrifugate a 1500 rpm per 20 minuti a 4 °C. Il primo strato viene rimosso in quanto è costituito dal tuorlo residuo del sacco vitellino. L'ultimo strato è invece costituito dalla polvere di quarzo depositata, mentre lo strato di nostro interesse è rappresentato da quello intermedio costituito dalla sospensione di clamidie. Da questa fase intermedia viene eseguito un esame batteriologico di base in Agar sangue per valutare eventuali contaminazioni durante la fase di prelievo o di inoculo.



### **2.10.5. Colorazione di Gimenez delle impronte di sacco vitellino**

I vetrini vengono essiccati e fissati alla fiamma Bunsen. Viene preparata la soluzione di fucsina a partire da quella commerciale di Carbolfucsina con tampone fosfato pH 7,5 (1:5) e filtrata con carta bibula. I vetrini vengono immersi per 5 minuti con questa prima soluzione colorante. Successivamente questi vengono lavati con acqua corrente, decolorati con soluzione di acido acetico all'1% per 3-5 secondi e risciacquati nuovamente con acqua corrente. Si procede poi alla colorazione con verde malachite per 20 secondi, in seguito i vetrini vengono lavati con acqua corrente ed immersi nuovamente in verde malachite per 20 secondi. Infine si procede quindi al risciacquo con acqua corrente. I vetrini vengono asciugati delicatamente con carta bibula ed osservati al microscopio con obiettivo ad immersione (1000x).

I corpi elementari (CE) delle clamidie risultano di forma arrotondata puntiforme e di colore fucsia con le cellule di fondo colorate di verde-blu. A seconda della numerosità dei corpi elementari (CE) evidenziati si riportano i risultati con una scala di +:

+ pochissimi CE

++ pochi CE

+++ abbondanti CE sia all'interno che all'esterno delle cellule

++++ numerosi CE.

### **2.11. Isolamento di *Chlamydia* spp. in linee cellulari continue LLC-MK2 (*Lewis Lung Carcinoma-Monkey Kidney*) (Andersen, 2008).**

#### *Infezione delle linee cellulari*

Ai fini dell'isolamento si utilizzano Bijoux con linee cellulari LLC-MK2 con volume finale di 2 ml adese ad un dischetto.

Il campione in esame viene diluito in terreno MEM, vengono preparate 2 Bijoux opportunamente identificate per ogni diluizione del campione (1:5 e 1:25).

Il terreno MEM viene eliminato dalle Bijoux contenenti le linee cellulari e si procede all'inoculo del campione in esame, contestualmente a due controlli negativi inoculati solo con 1 ml di terreno MEM (T3) e ad un controllo positivo di *C. psittaci*.

Le Bijoux vengono centrifugate per 90 minuti a 33°C a 3000 rpm, ed incubate a 37°C. Il giorno seguente all'inoculo viene cambiato il terreno MEM nelle Bijoux e le stesse vengono ricentrifugate nella modalità sopra descritta.

I campioni vengono centrifugati nei due giorni successivi e nuovamente il giorno prima dell'esecuzione dell'immunofluorescenza diretta.

## **2.12. Immunofluorescenza diretta**

L'immunofluorescenza diretta viene eseguita 3 giorni dopo l'infezione delle colture cellulari da una diluizione per Bijoux, in modo tale da conservare l'altra per eventuale reinfezione delle linee cellulari o per la conservazione del ceppo. Si aspira il terreno dalle Bijoux con pipette sterili e si aggiunge 1 ml di metanolo a temperatura ambiente e si lascia agire per 5 minuti al fine di permettere la fissazione delle cellule sul dischetto. Mediante l'ausilio di una pinzetta ed ago vengono prelevati uno alla volta i dischetti con le cellule fissate, e successivamente asciugati. Questi vengono appoggiati in delle piastre da 24 pozzetti, precedentemente identificate, con il monostrato cellulare fissato verso l'alto. A questo punto la piastra viene chiusa e si procede ad aggiungere sopra ogni dischetto in maniera uniforme di qualche goccia di anticorpo monoclonale anti-clamidia marcato con fluoresceina, contro tutti i sierotipi di *C. psittaci* e *C. trachomatis* (*Merifluor<sup>®</sup> Chlamydia, Meridian, Diagnostic, Inc*). In seguito la piastra viene messa in camera umida al buio per 30 minuti alla temperatura di 37°C. Il coniugato in eccesso viene eliminato e si procede al risciacquo con 200 µl di PBS 1x per 2 volte. Si preleva il dischetto con il monostrato cellulare rivolto verso il basso e lo si monta su vetrino portaoggetti al di sopra di una goccia di glicerina. I vetrini vengono tamponati dall'eccesso di glicerina e mantenuti al buio fino all'osservazione al microscopio a fluorescenza a 40-50 x.

Il tappeto cellulare appare di colorito rosso, come il controllo negativo, mentre le inclusioni da clamidia qualora presenti sono di colorito verde fluorescente, come il controllo positivo.

In seguito ai risultati dell'immunofluorescenza, se il campione risulta negativo nei primi passaggi, quindi in assenza di fluorescenza o con una fluorescenza aspecifica, si procedeva ad effettuare ulteriori diluizioni del campione 1:10, 1:100 al fine di confermare la negatività o di permettere la replicazione di clamidia. Se il campione risulta fortemente positivo, si procede al congelamento del ceppo. Se invece il campione risulta debolmente positivo, si procede ad effettuare ulteriori diluizioni, in modo da ottenere una buona percentuale di infezione del monostrato cellulare e permettere il congelamento del ceppo.

## **2.13. Congelamento dei ceppi**

Se il campione risulta fortemente positivo si procede alla conservazione dello stesso. La Bijoux viene posta in Vortex per circa un minuto, addizionata al 50% con siero fetale bovino (SBF), e aliquotata in provette Nalgene e stoccata in ceppoteca a -80°C.

### 3. RISULTATI

La popolazione di colombi urbani esaminata era costituita dal 53% di animali adulti, di cui il 55% rappresentata da maschi ed il rimanente 45% da femmine. Gli animali giovani hanno rappresentato il 47% del totale con una sottoripartizione del 54% di femmine e 46% di maschi.

Lo stato di nutrizione è risultato essere generalmente buono con una maggiore concentrazione di animali in ottimo stato di nutrizione nella categoria adulti, mentre di contro nella categoria giovani abbiamo potuto notare la presenza di diversi soggetti in scadenti condizioni di nutrizione. In tali soggetti è stato possibile evidenziare gravi forme di infestazione a livello intestinale. Nella categoria adulti abbiamo riscontrato l'84% degli animali in buono stato di nutrizione, di cui un 12% con uno stato di nutrizione discreto ed infine solamente il 4% con un insufficiente stato di nutrizione.

D'altro canto, nella categoria giovani, il 30% di questi si presentavano in buone condizioni di nutrizione, il 58% in discrete condizioni di nutrizione, l'8% in insufficiente condizione di nutrizione ed infine un 4% in scarse condizioni di nutrizione.

Nei soggetti analizzati le parassitosi intestinali hanno rappresentato un rilievo piuttosto comune. Ascaridi, cestodi e coccidi sono stati i parassiti maggiormente riscontrati. Tali riscontri sono risultati essere maggiormente frequenti nei soggetti giovani, dove la maggior parte degli animali presentava positività per almeno uno di questa classe di parassiti (figura 13). Negli adulti la presenza di parassiti è stata nettamente inferiore.

Di particolare interesse, il rilievo dell'assenza di lesioni macroscopiche relative a tricomoniasi in tutti i soggetti analizzati, evento piuttosto frequente nei colombi allevati.

Dai dati raccolti possiamo affermare che nella popolazione di colombi di città da noi esaminati non sono state rilevate alterazioni dell'apparato respiratorio degne di nota. Infatti, in nessuna delle schede di rilevamento dati sono state riportate lesioni di tipo infiammatorio a carico sia delle vie respiratorie superiori che dei sacchi aerei e dei polmoni. Ad eccezione di un singolo soggetto che presentava alterazioni a livello dei sacchi aerei ascrivibili dal punto di vista anatomico-patologico a lesioni da *Aspergillus spp.*. Tale sospetto è stato confermato mediante esami diagnostici aggiuntivi.

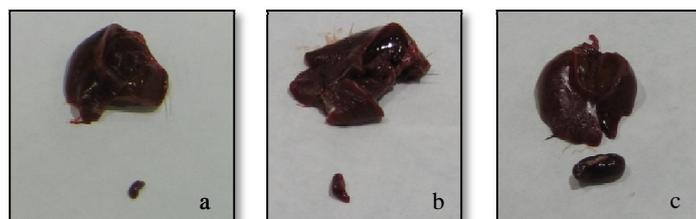
Anche l'apparato gastroenterico rappresentava nella nostra *check-list* un parametro della nostra attenzione. I dati da noi ottenuti mostrano però che all'interno del gruppo di animali oggetto di studio non sono state evidenziate variazioni macroscopiche evidenti e correlabili con *Chlamydia spp.* Infatti, nella quasi totalità dei giovani ed in una gran parte di adulti, a livello del tratto prossimale abbiamo potuto riscontrare una lieve enterite di tipo catarrale che appariva essere in

stretta correlazione con la presenza di parassiti, e per tale motivo tale reperto non è stato messo in relazione con il patogeno oggetto di tale tesi.

Per quanto riguarda invece gli altri due organi *target*, quali fegato e milza, abbiamo potuto notare come anche all'interno di un singolo gruppo di animali erano presenti evidenti variazioni del volume di tali organi (figura 14a-b-c). Tale particolarità ha permesso anche una notevole semplificazione nel rilevamento della scala di *grading*. Inoltre, in tutti gli animali sottoposti ad analisi, abbiamo potuto riscontrare che le uniche lesioni a carico di fegato e milza risultavano essere ascrivibili solamente ad un aumento delle dimensioni dell'organo. È opportuno riportare che in pochi rari casi sia il fegato che la milza presentavano piccole aree di aspetto necrotico.



**Figura 13.** Grave infestazione da cestodi.



**Figura 14a-b-c.** Esempi di diversi livelli di *grading* in fegato e milza.

I risultati sierologici per *Chlamydia psittaci* hanno mostrato una positività del 34.4% sulla popolazione studiata, tale positività risulta essere variabile in funzione dell'età, infatti l'80% degli animali positivi risulta appartenere alla categoria adulti (tabella 14). Abbiamo inoltre riscontrato che il 51% dei soggetti adulti possiede anticorpi rilevabili mediante Fissazione Del Complemento (FDC), contro un 14% riscontrato negli animali giovani (tabella 15).

**Tabella 14.** Positività anticorpali rilevate mediante FDC. Nella tabella sono compresi anche soggetti NI (dove non era indicata l'età).

<b>Risultato FDC</b>	<b>Adulti (%)</b>	<b>Giovani (%)</b>	<b>Totale complessivo</b>
<b>Negativi</b>	108 (40.3)	157 (58.6%)	268 (65.7%)
<b>Positivi</b>	112 ( <b>80%</b> )	26 (18.6%)	140 ( <b>34.4%</b> )
<b>Totale complessivo</b>	220 (53%)	183 (44.8)	408 (100%)

**Tabella 15.** Positività anticorpali all'interno degli animali adulti e giovani. Nella tabella sono compresi anche soggetti NI (dove non era indicata l'età).

<b>Risultato FDC</b>	<b>Positivi</b>	<b>Totale</b>	<b>%</b>
<b>Adulti (%)</b>	112	220	<b>51%</b>
<b>Giovani (%)</b>	26	183	<b>14%</b>
<b>Totale</b>	138	403	

I dati risultanti dalle schede di rilevamento sono stati inseriti in tabelle Excel ed una volta ottenuti i risultati dei differenti esami diagnostici richiesti si è iniziata una valutazione dei risultati preliminari, al fine di correlare ed evidenziare eventuali alterazioni anatomo-patologiche soprattutto a carico di fegato e milza con l'agente patogeno *Chlamydia psittaci*. L'analisi di tali risultati era volta a valutare ed eventualmente modificare il protocollo operativo di prelievo dei campioni in queste specie animali.

Sul totale di 439 colombi analizzati nella prima fase abbiamo rilevato una prevalenza del 12.5% di animali positivi per *Chlamydia spp.* (tabella 16).

Età/Sesso	Fegato	PCR <i>Chlamydia</i>		Totale complessivo	Prevalenza (%)
		Negativo	Positivo		
AF	A	55	9	64	14,1
	B	19	2	21	9,5
	C	12	2	14	14,3
	D	2	3	5	60
<b>AF Totale</b>		88	16	104	<b>15,4</b>
AM	A	55	5	60	8,3
	B	33	5	38	13,2
	C	21	1	22	4,5
	D	4	2	6	33,3
<b>AM Totale</b>		113	13	126	<b>10,3</b>
GF	A	48	4	52	7,7
	B	21	3	24	12,5
	C	8	2	10	20
	D	1	1	2	50
<b>GF Totale</b>		78	10	88	<b>11,4</b>
GM	A	35	4	39	10,3
	B	26		26	0
	C	9		9	0
<b>GM Totale</b>		71	4	75	<b>5,3</b>
NI			2	2	-
<b>Totale complessivo</b>		385	55	439	<b>12,5</b>

**Tabella 16.** Legenda. A: Adulto; G: Giovane; AF: Adulto Femmina; AM: Adulto Maschio; GF: Giovane Femmina; GM: Giovane Maschio; NI: Non Indicato.

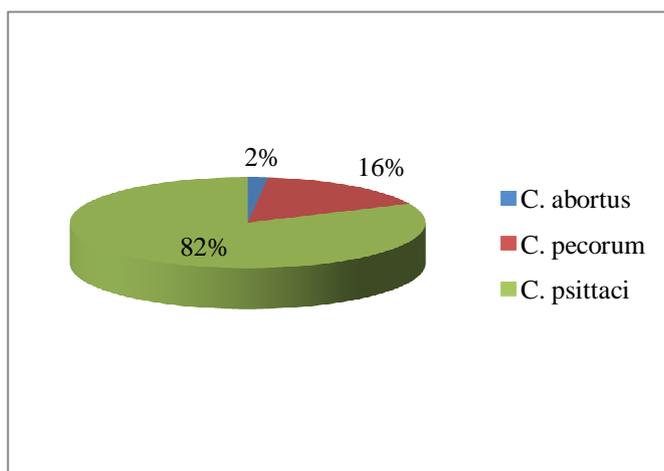
Livelli di *grading* epatomegalia. A: condizioni fisiologiche; B: leggermente aumentato di volume; C: aumentato di volume; D: notevolmente aumentato di volume.

Dei 55 animali positivi per *Chlamydia spp.*, 45 sono risultati positivi a *Chlamydia psittaci* (prevalenza del 10%), mentre 9 animali sono risultati essere positivi a *Chlamydia pecorum* (prevalenza del 2%) identificata mediante la metodica RFLP-PCR, ed infine un campione è risultato essere positivo a *Chlamydia abortus* (grafico 1). Dai risultati ottenuti dall'esame di *screening* mediante PCR sulla popolazione di colombi oggetto dello studio abbiamo potuto rilevare che le tre specie di *Chlamydia* dimostrate non sono mai state evidenziate in associazione in nessuno dei soggetti analizzati.

In tutti i soggetti risultati positivi per *Chlamydia pecorum* o *Chlamydia abortus* non è stata rilevata positività a livello sierologico per *Chlamydia psittaci*. Tale dato riveste maggiore importanza se valutato congiuntamente al fatto che ben il 90% dei soggetti positivi a queste due specie di *Chlamydia* erano adulti.

Nei soggetti positivi per *C. psittaci* mediante ricerca antigene, i titoli anticorpali sono risultati essere positivi nel 37% degli animali testati, tale dato percentuale aumenta notevolmente se vengono valutati solamente i soggetti adulti, infatti il 59% degli adulti positivi per *C. psittaci* in PCR ha manifestato titoli anticorpali rilevati mediante FDC. Non è stata evidenziata nessuna correlazione tra positività anticorpale, positività a *C. psittaci* ed alterazioni degli organi *target*.

**Grafico 1.** Differenziazione mediante metodica RFLP-PCR delle specie di *Chlamydia* identificate nella popolazione di colombi studiata.



Dato che il nostro obiettivo era quello di valutare la prevalenza di *Chlamydia psittaci*, nella popolazione veneziana di colombi di città, abbiamo deciso di analizzare in maniera leggermente più dettagliata i dati riferendoci a tutte le positività riscontrate per il genere *Chlamydia*. La prevalenza totale, riferita alle positività di Genere, presentava fluttuazioni a seconda dell'età o del sesso degli animali come evidenziato nella tabella w. In particolare la prevalenza riscontrata nella totalità degli adulti è stata del 13.4% contro una prevalenza di 11.4% riscontrata nei soggetti giovani (tabella 17).

**Tabella 17.** Risultati della PCR per *Chlamydia spp.*, in relazione allo stato funzionale del fegato e all'età.

<i>Chlamydia spp.</i>	Adulto		Giovane	
	% Negativi	% Positivi	% Negativi	% Positivi
Fegato A	87,9	12	86,5	13,4
Fegato B	86,6	13,3	94,4	5,5
Fegato C	91,6	8,3	89,4	10,5
Fegato D	54,5	45,4	50	50
Totale complessivo	86,5	<b>13,4</b>	88,5	<b>11,4</b>

Inoltre abbiamo potuto notare come la prevalenza dei soggetti di sesso femminile era del 16% mentre quella riscontrata nei soggetti di sesso maschile si attestava all'11%. All'interno della categoria "femmine" abbiamo riscontrato un prevalenza del 15,4% nei soggetti adulti contro l'11,4% dei soggetti giovani. Di contro nella categoria "maschi" abbiamo rilevato una prevalenza negli adulti e nei giovani rispettivamente del 10,3% e del 5,3% (tabella 16).

Dalla comparazione tra le positività dimostrate in PCR in soggetti presentanti epatomegalia o splenomegalia, si può notare che la presenza della epatomegalia sembrerebbe essere maggiormente correlata alla presenza di *Chlamydia*, mentre la splenomegalia anche di grado elevatissimo non sembra, almeno per il colombo, essere correlata alla presenza di *Chlamydia*. Dall'analisi dei dati si può notare come in tutti i gruppi di colombi sia adulti che giovani, sia maschi che femmine un incremento di volume del fegato da noi classificato come D, denota i più alti livelli di prevalenza all'interno del gruppo. In particolare abbiamo una prevalenza del 60% in femmine adulte con fegato notevolmente aumentato di volume, mentre sempre in femmine adulte ma con un volume epatico considerato nella norma la prevalenza è solamente del 15,6% (tabella 18). Stessa tendenza è evidenziabile anche nel gruppo dei soggetti adulti di sesso maschile dove è possibile riscontrare prevalenze di 33,3% relative ai soggetti con epatomegalia di grado elevato mentre nei soggetti con fegato in condizioni fisiologiche la prevalenza è solamente del 8,3%. Nei soggetti di sesso femminile in età giovanile il dato sembra confermarsi, infatti possiamo notare una prevalenza rispettivamente del 50% e del 7,9% in animali con notevole epatomegalia e non. Nessun soggetto appartenente alle categorie maschi-giovani ha mostrato notevole epatomegalia.

**Tabella 18.** Risultati della PCR per *Chlamydia spp.*, in relazione allo stato funzionale del fegato, al sesso e all'età.

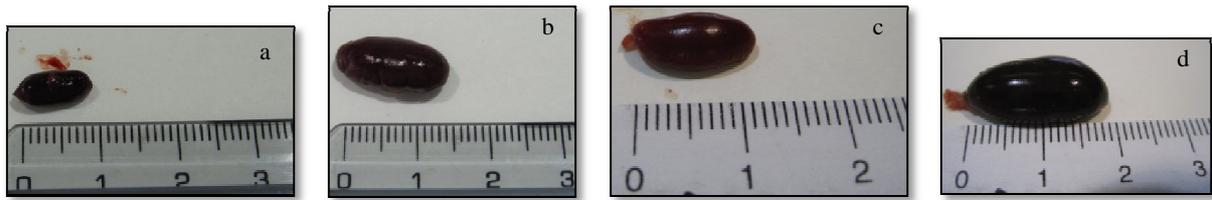
Categoria	Femmina Adulta	Femmina Adulta	Femmina Giovane	Femmina Giovane
<i>Chlamydia spp.</i>	%Negativi	%Positivi	%Negativi	%Positivi
Fegato A	84,4	<b>15,6</b>	92,1	7,9
Fegato B	90,5	9,5	87,5	12,5
Fegato C	85,7	14,3	80	20
Fegato D	40	<b>60</b>	50	<b>50</b>
Totale complessivo	83,6	16,4	88,5	<b>11,5</b>

L'altro organo considerato *target*, ovvero la milza, non ha presentato correlazioni così evidenti come nel caso del fegato. La prevalenza di positività per clamidia in soggetti di tutte le categorie con splenomegalia di grado elevata è risultata essere del 17,1% a fronte di una prevalenza del 13,3% ritrovata in animali con milza considerata nella norma. Risulta interessante notare come nei soggetti giovani con splenomegalia considerata di livello D, in totale 17 animali, non è mai stata riscontrata positività per clamidia. Negli adulti, invece, il 29% degli animali classificati con splenomegalia di livello D sono risultati positivi per clamidia. Tale dato risulta interessante se valutato congiuntamente alla percentuale di rilevamenti di tipo D riferiti alla milza che sono risultati essere il 9,3% sul totale degli animali, con una maggiore positività negli animali adulti in cui il dato percentuale si attesta al 10% contro il dato dei giovani che era del 8%.

Il dato che è apparso essere più interessante è la maggiore prevalenza di positività in PCR nel gruppo di femmine adulte (15,4%) (tabella 16) che unitamente alla epatomegalia ci permette di focalizzare la nostra attenzione negli animali adulti preferibilmente di sesso femminile, con apparato riproduttore maturo e con epatomegalia. Naturalmente, nel caso in cui dovessimo applicare tali evidenze in gruppi di animali al tavolo necroscopico abbiamo deciso che in assenza di femmine adulte con epatomegalia l'attenzione potesse essere anche focalizzata verso altre categorie di animali presenti nel gruppo, basandoci però principalmente su animali adulti che manifestano epatomegalia di grado elevato, eventualmente associata a splenomegalia di grado elevato (figura 15-16a-b-c-d).



**Figura 15.** Epato-splenomegalia.



**Figura 16 a-b-c-d.** Livelli di splenomegalia rilevati.

A seguito dei risultati prodotti dalla prima serie di campionamenti, abbiamo voluto applicare tale schema di selezione su di una seconda serie di campionamenti. Quindi 100 colombi pervenuti in gruppi da 20, presso la sezione Diagnostica di Padova sono stati selezionati secondo i criteri selettivi precedentemente riportati (adulti/elevata epatomegalia/preferibilmente femmine/eventuale associazione con splenomegalia elevata). Sul totale di 100 animali conferiti, solamente 10 presentavano i requisiti richiesti. La ricerca mediante PCR da organi quali milza e fegato ha permesso di dimostrare 5 animali positivi con una prevalenza all'interno del gruppo selezionato del 50%. Risulta interessante riportare che di questi soggetti positivi, 2 hanno mostrato positività in entrambi gli organi testati, altri due hanno mostrato una positività solamente nella milza ed infine un soggetto ha mostrato positività su fegato.

Durante la prima fase di studio 55 animali sono risultati positivi allo *screening* per *Chlamydia spp.* Questi campioni secondo il protocollo operativo della prima fase sono stati posti in isolamento sia in uova embrionate che in colture cellulari. Occorre però precisare che tali campioni, nella prima fase, venivano prelevati durante l'esame necroscopico direttamente come *pool* di fegato e milza e conservati senza terreno di trasporto ad una temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$ . Con questo schema operativo solamente 5 campioni su 36 (13,9%) sono risultati positivi all'isolamento, di cui 4 identificati come *C. psittaci* di cui uno denominato "ceppo atipico" ed infine un successivo come *C. abortus* (tabella 19). Le due metodiche tradizionali di isolamento utilizzate (uova embrionate o colture cellulari) hanno per lo più evidenziato i medesimi risultati ad eccezione della *C. abortus* che è cresciuta solamente in uova embrionate. I dati qui riportati dimostrano che con lo schema operativo da noi applicato durante la prima fase di prelievi abbiamo ottenuto una bassa percentuale di isolati. Dato questo non tutti i campioni risultati positivi in PCR sono stati messi in isolamento.

Colombo urbano	Prima fase- <i>pool</i> di organi	
	Uova embrionate	LLC-MK2
	1 positivi <i>C. abortus</i>	
	3 positivi <i>C. psittaci</i>	3 positivi <i>C. psittaci</i>
	1 ceppo atipico di <i>C. psittaci</i>	1 ceppo atipico di <i>C. psittaci</i>

**Tabella 19.** Risultati dell'isolamento in uova embrionate e colture cellulari.

In seguito tali isolati sono stati sottoposti a caratterizzazione biomolecolari mediante tecnologia *microarray* ed MLVA. I risultati ottenuti attraverso le due tecniche sono riassunti nella tabella 12. In particolare MLVA ha permesso di identificare tutte le *C. psittaci* come genotipo 7, con 3 differenti *serovars* E, B ed E/B, il ceppo atipico pur identificato come genotipo 7 non è stato classificato come *serovar*. La *C. abortus* è stata associata invece al genotipo 2.

La metodica *microarray* ha invece classificato le *C. psittaci* come genotipo B, mentre con il ceppo definito atipico i risultati prodotti non sono stato soddisfacenti. Sia il ceppo considerato atipico che l'isolato di *C. abortus* sono stati confermati mediante metodica Array Tube™ DNA *microarray* di specie, confermando per il primo l'appartenenza alla specie *C. psittaci* e per il secondo alla *C. abortus* (tabella 20).

Colombo urbano	<i>Microarray</i>			
Milza fegato	RFLP-PCR	MLVA	Di specie	genotipo
	<i>C. psittaci</i>	<i>genotipo 7-E</i>		B
	<i>C. psittaci</i>	<i>genotipo 7-E/B</i>		B
	<i>C. psittaci</i>	<i>genotipo 7-B</i>		B
	<i>C. abortus</i>	<i>genotipo 2</i>	<i>C. abortus</i>	/
<i>C. psittaci</i>	<i>genotipo 7-?</i>	<i>C. psittaci</i>	neg	

**Tabella 20.** Genotipi e *pattern* MLVA.

La seconda fase del campionamento ha previsto alcune variazioni riguardanti il prelievo e lo stoccaggio degli organi da sottoporre in seguito ad isolamento in colture cellulari e uova embrionate. In particolare la selezione dei soggetti, secondo lo schema (adulti/elevata epatomegalia/preferibilmente femmine/eventuale associazione con splenomegalia elevata) ha permesso di contenere il numero di organi da conservare per un eventuale isolamento.

Contestualmente ed in conseguenza di questa evidenza abbiamo deciso di collezionare gli organi separatamente, non più in *pool*, ed inoltre si è proceduto a conservarli in terreno di trasporto specifico (SPG) ad una temperatura di -80°C. Nella seconda fase 5 soggetti su 10 sono risultati positivi. Da questi animali sono risultati positive, 5 porzioni di organo, in particolare 4 milze ed 1 fegato, che sono state poste in isolamento. Di tali campioni ben 4 hanno mostrato positività in entrambe le metodiche di isolamento utilizzate, sia uova embrionate (figura 17a-b-c; figura 18a-b) che colture cellulari (figura 19a-b) (tabella 21).

Colombo urbano	Seconda fase	
	Uova embrionate	LLC-MK2
	1 positivo <i>C. psittaci</i>	1 positivo <i>C. psittaci</i>
	2 positivi <i>C. pecorum</i>	2 positivi <i>C. pecorum</i>
	1 positivo <i>Chlamydiaceae</i>	1 positivo <i>Chlamydiaceae</i>

**Tabella 21.** Risultati isolamento in colture cellulari ed uova embrionate della seconda fase.

Allo *screening* iniziale in RFLP-PCR sono state riscontrate 3 positività per *C. psittaci* (tabella 22 riferimento 1, 2, 5) di cui una considerata debole, inoltre sono state riscontrate 2 positività per *C. pecorum* (tabella 22 riferimento 3,4). L'isolamento eseguito su tali campioni ha permesso di ottenere 4 isolati, poiché il campione 5 è risultato essere negativo all'isolamento. Gli isolati ottenuti sono stati successivamente analizzati. In particolare il campione 1 considerato allo *screening* iniziale come *C. psittaci* (debole), non ha ottenuto conferme riguardo la sua appartenenza alla specie *C. psittaci* infatti sia alla RFLP che alla *Real time* PCR per *C. psittaci* non è stato possibile identificarlo come *C. psittaci* (tabella 23), mentre sia la *Real Time* PCR *Chlamydiaceae* che l'Array Tube hanno mostrato positività al genere *Chlamydia* (tabella 23). L'isolato ottenuto dal campione n.2, mediante tutte le metodiche utilizzate, è stato confermato come *C. psittaci* ed inoltre appartenente al genotipo E (figura 20; tabella 23).

Gli isolati risultanti dai campione n.3 e n.4, che erano stati identificati allo *screening* iniziale (RFLP) a *C. pecorum* sono stati confermati appartenere al genere *Chlamydia* ma purtroppo non si è potuto procedere all'identificazione di specie in quanto presentanti un *pattern* non chiaro, il sequenziamento del gene *ompA* e del 16S rRNA hanno permesso di evidenziare omologie con *C. psittaci* anche se il grado di omologia risulta essere basso.

**Tabella 22.** Comparazione tra i risultati di *screening* (RFLP-PCR) e quelli ottenuti in seguito all'isolamento del ceppo, compresa la caratterizzazione molecolare.

colombo	F	M	Sesso età	PCR milza	PCR fegato	RFLP	Organo di isolamento
1	C	C	FA	Pos	Neg	<i>C. psittaci</i>	Milza
2	C	C-D	FA	Pos	Pos	<i>C. psittaci</i>	Milza
3	C	B	MA	Neg	Pos	<i>C. pecorum</i>	Fegato
4	C	D	MA	Pos	Pos	<i>C. pecorum</i>	Milza
5	C	C	MA	Pos	Neg	<i>C. psittaci</i>	Milza

Legenda. F: fegato; M: milza; FA: femmina adulta; MA: maschio adulto; P: positivo; N: negativo; B, C, D: diversi livelli di *grading*.

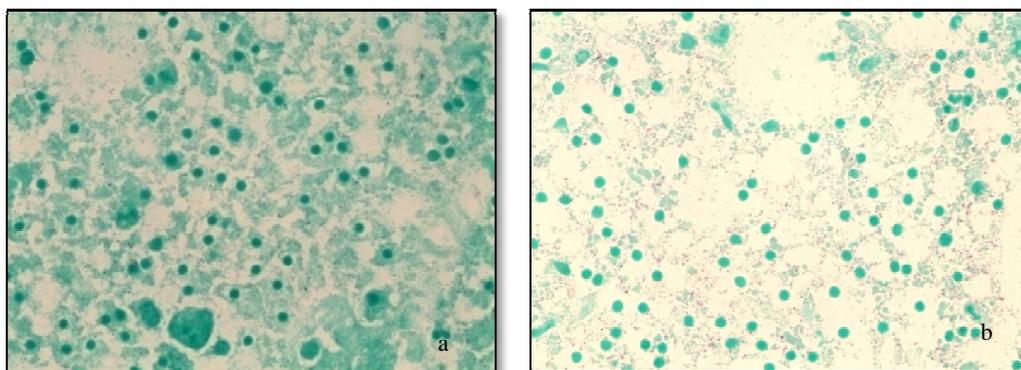
colombo	AT genotipo	<i>ompA</i>	SEQ. 16 S rRNA	identificazione ceppo
1	/	/	/	Ceppo atipico
2	E	/	/	E
3	<i>Chlamydophila spp.</i> ora <i>Chlamydia spp.</i>	83% di omologia con <i>Chlamydophila sp.</i> 08 1274 Flock 22	92% di omologia con <i>C. psittaci</i> Daruma e S26/3 <i>C. abortus</i>	/
4	Pattern non chiaro	74% di omologia con <i>C. psittaci</i> Ceppo CPX0308		<i>Chlamydiaceae</i>
5*	/	/	/	/

**Tabella 23.**

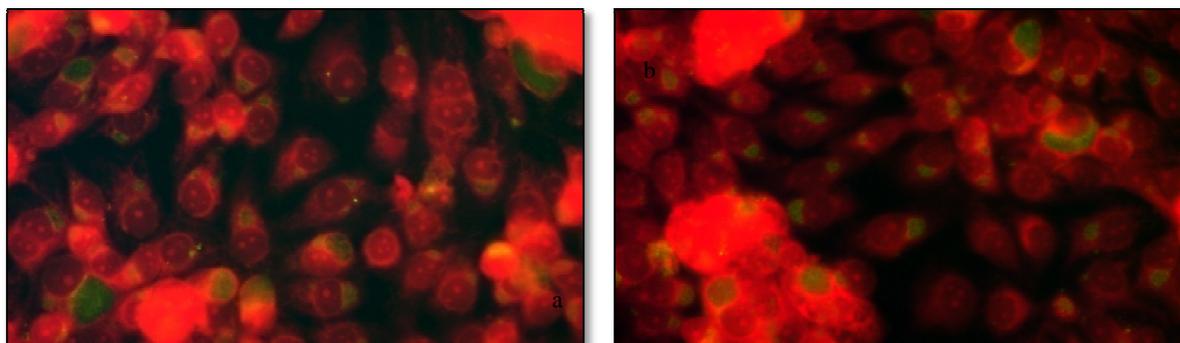
\* Positivo allo *screening* iniziale in PCR ma negativo in isolamento sia in uova embrionate che in colture cellulari.



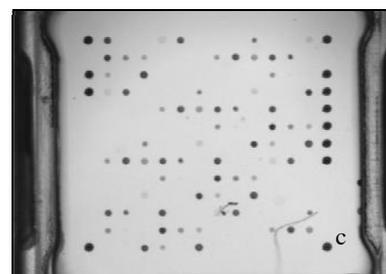
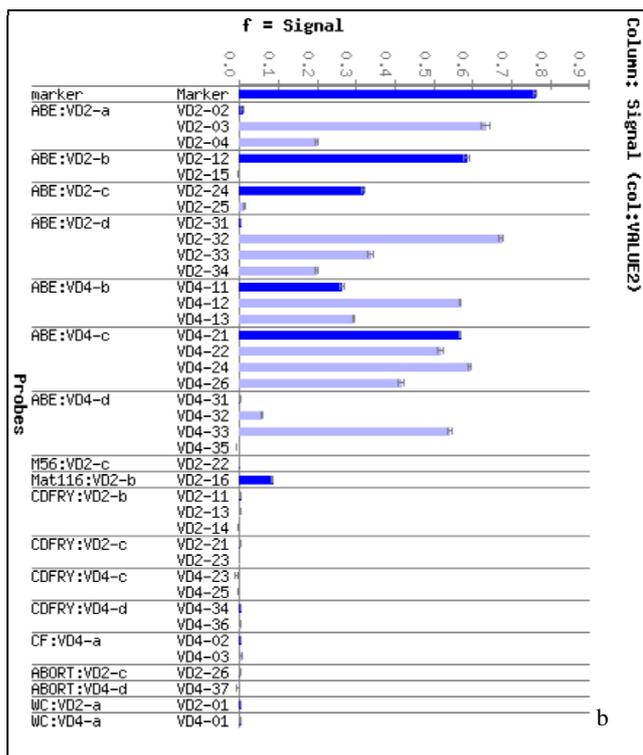
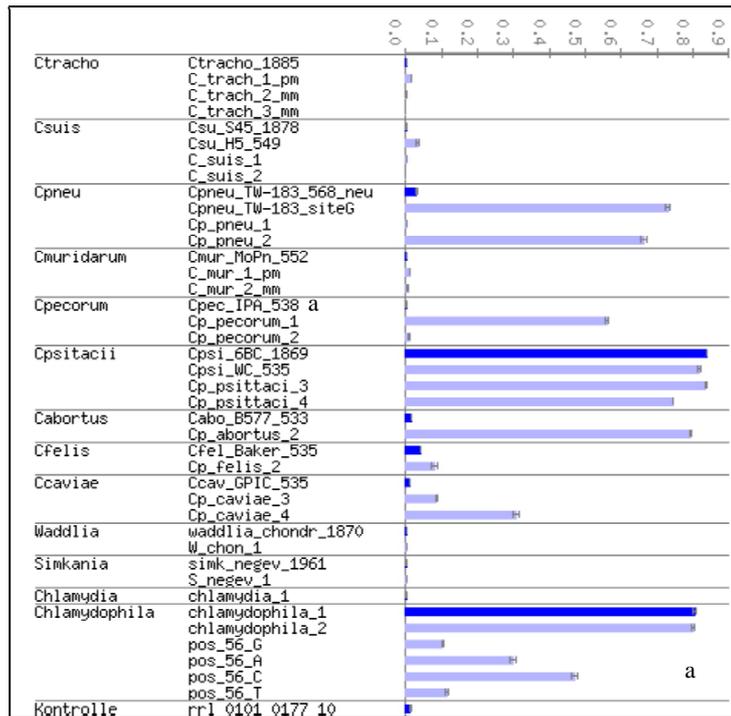
**Figura 17 a-b-c.** Immagini relative alle lesioni emorragiche dell'embrione e nel sacco vitellino.



**Figura 18 a-b.** Colorazioni di Gimenez positive da impronta di sacco vitellino.



**Figura 19 a-b.** Immagini relative a campioni positivi per *C. psittaci* in immunofluorescenza diretta in seguito ad isolamento in colture cellulari.



**Figura 20 a-b-c.** Esempio di grafici ottenuti dopo analisi con *Array Tube* per genotipizzazione di *C. psittaci*. In particolare è raffigurato il genotipo B (foto elaborate presso il Friedrich-Loeffler-Institut di Jena).

# DISCUSSIONE

Alla famiglia delle *Chlamydiaceae* appartengono diverse specie, alcune di queste rappresentano importanti agenti patogeni degli animali, mentre altre specie appartenenti al genere *Chlamydia* possono infettare anche l'uomo. In particolare la *C. psittaci* è, tra la specie di clamidia, quella che ricopre il ruolo da protagonista in campo aviario, anche in considerazione del fatto che riveste un importante ruolo di agente zoonosico.

La presente tesi ha avuto come obiettivo lo studio della prevalenza di *Chlamydiaceae* ed in particolare di *C. psittaci* nella popolazione di colombi di città dell'areale veneziano. Contestualmente a tale obiettivo si è cercato di studiare mediante l'utilizzo di metodiche innovative la presenza di determinati genotipi di *C. psittaci* e delle eventuali altre specie di clamidia presenti in tali popolazioni di colombi urbani.

Negli uccelli il sospetto d'infezione da clamidia può essere avanzato in seguito ad una corretta anamnesi clinica e sintomatologica, anche se una serie di potenziali cofattori d'infezione tra cui agenti virali e non, e altre cause non infettive possono alterare il corretto iter diagnostico. Inoltre, una diagnosi clinica definitiva richiede analisi laboratoristiche di conferma. In tali specifici casi trattandosi di patogeni intracellulari obbligati, il metodo di elezione per la diagnosi è considerato senza dubbio l'isolamento, in passato condotto principalmente su uova embrionate di pollo e negli ultimi tempi in linee cellulari continue. Inoltre esiste anche la possibilità di verificare la variazione del titolo anticorpale nel medesimo soggetto eseguendo due differenti prelievi uno nella fase sintomatica ed un successivo nella fase convalescente. Anche se l'isolamento rappresenta una metodica datata, indagativa e con tempi di risposta più lunghi, è considerato il *gold standard* tra le metodiche di ricerca dell'antigene, poiché rappresenta l'unica via possibile per rinvenire il patogeno vivo esprimendo tutte le sue peculiarità fenotipiche e genotipiche, necessarie ad una sua corretta e completa caratterizzazione biochimica e molecolare (Sachse *et al.*, 2008). Infatti, l'isolamento ricopre un ruolo fondamentale qualora si voglia caratterizzare lo stipite isolato per conoscerne il sierotipo, genotipo, o sottotipo nel caso della tipizzazione dei ceppi. Negli ultimi anni tale metodica è stata gradualmente soppiantata da metodiche biomolecolari che permettono un più rapido e sicuro raggiungimento della diagnosi con notevole contenimento dei costi. Purtroppo tale approccio diagnostico non permette l'ulteriore ed approfondito studio del patogeno determinando la perdita di alcuni dati alle volte molto importanti per lo studio epidemiologico dell'agente patogeno.

Recentemente infatti laboratori specializzati hanno segnalato la presenza di ceppi di clamidie considerati “nuovi” e che quindi necessitano di approfondimenti (Geens *et al.*, 2005; Sachse *et al.*, 2008; Laroucau *et al.*, 2009b; Vicari N. *et al.*, 2009).

Sulla base di ciò ed al fine di cercare di capire il reale ruolo del colombo di città nella trasmissione e mantenimento di clamidie potenzialmente patogene per l'uomo abbiamo deciso focalizzare la nostra attenzione, oltre che ad un mero dato di prevalenza, anche alle specie di clamidie e gli eventuali genotipi di queste, presenti in queste popolazioni di uccelli urbani.

Per far ciò, la prima fase dello studio è stata focalizzata sullo studio di prevalenza. Quest'ultimo ha previsto l'analisi di 439 colombi che sono stati sottoposti ad esame mediante PCR, inoltre utilizzando gli organi, precedentemente conservati, ed appartenenti agli animali risultati positivi allo *screening* mediante biologia molecolare abbiamo cercato di isolare i ceppi coinvolti al fine di permetterne uno studio più approfondito. A fine di contenere i costi operativi della metodica di isolamento e per cercare di evidenziare una correlazione tra caratteristiche anatomopatologiche e presenza del patogeno, abbiamo inoltre utilizzato una scheda rilevamento dati focalizzata su determinati e specifici organi.

L'analisi dei nostri risultati permette di affermare che nelle popolazioni di colombi di città a Venezia la *Chlamydia psittaci* è presente con una prevalenza del 10%.

Inoltre dai nostri risultati è possibile evidenziare una prevalenza di *Chlamydia* spp., di circa il 12%. La numerosità campionaria considerata e la prevalenza ottenuta ci consentono di stimare una accuratezza del 3%; ciò significa che considerando un livello di confidenza del 95% la stima della prevalenza rientra nell'intervallo 9%-15%. Tali dati sono in linea con i dati precedentemente pubblicati su differenti popolazioni di colombi urbani (Magnino *et al.*, 2009).

La conoscenza della prevalenza sia per *Chlamydia* spp., che per *Chlamydia psittaci* in una popolazione di colombi urbani, sicuramente non riveste nessun nuovo e rilevante dato, se non una ulteriore conferma della presenza di tale patogeno nei colombi urbani. Tale dato però deve essere contestualizzato, infatti come ampiamente riportato nella parte introduttiva di tale tesi, nella maggior parte dei casi di psittacosi, le persone coinvolte avevano avuto contatti con specie aviari differenti dal colombo di città quali ad esempio pappagalli, uccelli ornamentali, anatre, tacchini e recentemente pollo (Laroucau *et al.*, 2009a; 2009b), mentre sono rare le segnalazioni di clamidiosi umana in cui la specie colombo è stata dimostrata come reale portatore (Magnino *et al.*, 2009; Haag-Wackernagel e Moch, 2004). Tale apparente discrepanza potrebbe trovare una spiegazione nel fatto che all'interno della specie *C. psittaci* sono stati dimostrati differenti genotipi (A, B, C, D, E/B, F) e che questi genotipi sono a loro volta maggiormente frequenti in alcune determinate specie aviari. Quindi si potrebbe ipotizzare che i genotipi prevalenti nella

specie colombo siano genotipi raramente coinvolti in episodi di psittacosi. Purtroppo in medicina umana la genotipizzazione dei ceppi di clamidia coinvolti in casi clinici non è una pratica diffusa, ed a causa di ciò ad oggi non abbiamo un dato epidemiologico che fotografa tale particolare situazione. A tale proposito risulta essere importante riportare un caso clinico di psittacosi accaduto nel 2004 in un ospedale universitario veterinario, dove alcune persone hanno manifestato importanti sintomi clinici correlati con infezione da clamidia mentre, altri pur non presentando una forma clinica manifesta hanno presentato positività in PCR per *C. psittaci*. In totale il 34% dell'organico di tale ospedale veterinario inclusi gli studenti, sono risultati essere infetti da *C. psittaci*. Lo studio epidemiologico effettuato al fine di identificare la fonte di contagio ha dimostrato che 6 pappagalli ed un colombo risultavano essere positivi a *C. psittaci*. Dato che la genotipizzazione effettuata, sui campioni di origine umana, aveva dimostrato che il genotipo A era il responsabile di tale *outbreak*, si è proceduto all'identificazione del genotipo nei campioni di origine animale dimostrando la presenza del genotipo B nel colombo mentre il genotipo A nei pappagalli, che sono stati quindi considerati la fonte del contagio (Heddema *et al.*, 2006b). Solo attraverso la conoscenza del genotipo si è potuto identificare in tale specifico caso la fonte di contagio, permettendo quindi di escludere il ruolo del piccione, positivo per clamidia, come fonte dell'infezione. Naturalmente in assenza di tali dati il suddetto *outbreak* sarebbe stato con molta probabilità ascritto al contatto con pappagalli e colombi. Infatti tali Autori concludono dicendo che anche se il genotipo maggiormente coinvolto in casi di infezione da *C. psittaci* in uomo non è attualmente conosciuto risulta importante ai fini sia epidemiologici che di mera gestione dei futuri casi conoscere tale dato.

In un ulteriore articolo i medesimi Autori riportano che il 50% dei ceppi *C. psittaci* coinvolti in forme cliniche risultavano appartenere al genotipo A, seguito dal genotipo B con il 30% ed il genotipo C 10%, anche se, occorre riportare che tali dati sono stati ottenuti da una quantità limitata di casi, in totale 10.

Infine, rimane da segnalare un caso singolo di lieve sintomatologia respiratoria accusata da responsabile di un centro di riproduzione di pappagalli in cui la tipizzazione eseguita sia sugli animali che sul paziente ha dato esito di genotipo E/B (Harkinezhad *et al.*, 2007).

In considerazione di tali evidenze la genotipizzazione dei ceppi di *Chlamydia psittaci* circolanti nella popolazione di colombi veneziana potrebbe contribuire alla valutazione del rischio zoonosico riferito a clamidia svolto da tali animali. Per ottenere tale dato abbiamo deciso di isolare i ceppi coinvolti per poi genotipizzarli utilizzando tecniche innovative quali *microarray* e l'MLVA.

Al fine di contenere il numero di isolamenti abbiamo deciso di effettuare l'isolamento solo sui prelievi risultati positivi allo *screening* in PCR per clamidia. Quindi gli organi quali la milza ed il fegato, sono stati stoccati a -20°C in attesa dei risultati dello *screening*. Dai nostri risultati si evince che tale tipologia di approccio risulta essere poco vincente, infatti i campioni processati secondo il protocollo della prima fase, in totale 36, hanno permesso di ottenere solamente 5 isolati di cui 4 appartenenti a *Chlamydia psittaci* di cui uno denominato "ceppo atipico" ed infine un ulteriore isolato identificato come *C. abortus*. Le scarse performance delle metodiche di isolamento sono da attribuire a nostro parere alle non appropriate condizioni di prelievo e conservazione dei campioni da esaminare, infatti la conservazioni di porzioni organiche di fegato e milza nella medesima provetta ed ad una temperatura di -20°C non sono risultate essere idonee. Per tale motivo si è deciso di variare lo schema di prelievo e di conservazione degli organi, tale nuovo protocollo (fase 2) ha previsto sicuramente una maggior attenzione nella manipolazione del campione cercando di evitare eventuali contaminazioni con germi aspecifici ed inoltre una conservazione a temperature inferiori con terreno di trasporto specifico per clamidie. Tale tipologia di approccio necessita sicuramente di maggiori risorse sia in termini di operatori che di tempo, quindi al fine di contenere i costi abbiamo sentito ancor di più la necessità di selezionare i campioni di organi provenienti da animali potenzialmente positivi. Infatti solamente attraverso una selezione dei colombi potenziali positivi, potevano essere applicate modalità di prelievo e conservazione del campione anche piuttosto complesse volte a migliorare le *performance* di tutto il processo metodologico.

Quindi anche se in bibliografia non sono riportati segni clinici ed anatomopatologici che permettono di effettuare uno *screening* dei soggetti possibilmente positivi, abbiamo cercato di soddisfare tale richiesta attraverso lo studio attento dei parametri funzionali valutati durante la prima fase dei campionamenti.

Dai risultati da noi riportati si evince che la positività per clamidia sembra essere correlata allo stato funzionale dei soggetti. Infatti dai dati riportati si nota come negli animali adulti e quindi in fase riproduttiva, ed in particolare nelle femmine, una maggiore presenza di soggetti positivi. Tale evidenza trova conferma in dati precedentemente pubblicati che manifestano un incremento di positività per clamidia durante il periodo riproduttivo (Heddema *et al.*, 2006a), e successivamente correlato allo *stress* da riproduzione (Vàzquez *et al.*, 2010).

Inoltre, sembrerebbe anche che la positività per *Chlamydia spp.* sia maggiormente correlata all'aumento e all'alterazione del fegato, rispetto ad altri organi quali per esempio la milza, in cui variazioni anche notevoli non sono direttamente correlabili con le positività per clamidia. Tale evidenza potrebbe essere correlata alle caratteristiche proprie della milza, organo che risulta

essere coinvolto in diversi e differenti processi infettivi, tra cui possiamo ricordare alcune emoparassitosi, che alterano gravemente l'aspetto di quest'organo.

Basandoci su tali considerazioni, i criteri di selezione da noi considerati utili ci permetterebbero in sede necroscopica di selezionare i soggetti da analizzare per la ricerca mediante isolamento di *Chlamydia spp.* Tale tipologia di approccio selettivo al tavolo autoptico potrebbe essere applicata in tutti quei casi dove occorra valutare la presenza o meno di *Chlamydia spp.*, in colombi urbani e non, focalizzando l'attenzione solamente nei soggetti che manifestano una maggiore probabilità di essere infetti, permettendo così di utilizzare metodiche indaginose e quindi costose, quali l'isolamento in uova, direttamente su organi provenienti da animali selezionati.

Dato che la positività per clamidia era principalmente localizzata in animali adulti, di sesso femminile con epatomegalia e che tale categoria di animali risultava essere piuttosto contenuta abbiamo deciso di estendere leggermente i criteri selettivi. A tal fine abbiamo utilizzato come parametri selettivi allargati i seguenti criteri: soggetti adulti preferibilmente femmine, con epatomegalia anche di grado moderato ma in tal caso associata a splenomegalia. Tale approccio selettivo, effettuato basandoci solamente su parametri valutabili in sede necroscopica e facilmente oggettivabili, ha permesso di selezionare nella seconda fase di prelievi da un gruppo di 100 animali conferiti, solamente 10 animali permettendo in tal modo di porre particolare attenzione nel prelievo e stoccaggio dei campioni da utilizzare per l'isolamento. Inoltre tale approccio ha permesso di contenere il numero di PCR di *screening* effettuate dato che il campione di animali selezionati era uguale a 10. A conferma dell'esattezza della nostra ipotesi e del nostro *modus operandi*, la prevalenza nei soggetti selezionati è stata del 50%. Dimostrando che almeno nel colombo è possibile avanzare un forte sospetto di clamidiosi anche in sede necroscopica, permettendo in tal modo un notevole contenimento dei costi nel caso in cui si voglia effettuare uno *screening* volto a valutare la presenza di clamidia in tali specie.

Inoltre, dai risultati da noi prodotti si rileva che, prelevando fegato e milza in sterilità, e stoccandoli separatamente in un mezzo di trasporto appropriato (SPG) alla temperatura di -80°C, si ha un netto miglioramento dei risultati della prova di isolamento. Infatti i nostri risultati dimostrano che nella seconda fase, su cinque organi posti in coltura abbiamo ottenuto 4 isolati, con un *rate* di isolamento dell'80% sicuramente superiore a quello ottenuto nella prima fase che risultava essere solamente del 13.8%.

I ceppi isolati in questa seconda *trance* di prelievi sono risultati essere una *C. psittaci* appartenente al genotipo E, un ulteriore ceppo di *C. psittaci* verosimilmente da considerarsi un nuovo ceppo di *C. psittaci* e segnalato di recente in alcuni Paesi europei come Francia e Germania (Laroucau *et al.*, 2009a; 2009b), ed inoltre due ceppi da noi denominati *C. pecorum*

poiché mostranti un *pattern* in RFLP sovrapponibile a questa specie, ma non confermati attraverso le altre metodiche utilizzate. Per quanto riguarda il nuovo ceppo *C. psittaci* l'identificazione è stata possibile attraverso l'utilizzo della tecnologia *Microarray* ed il sequenziamento completo del gene *ompA*, che hanno permesso di correlarlo con quelli già dimostrati in Europa (Laroucau *et al.*, 2009a).

Inoltre a nostro parere è opportuno spendere alcune parole a riguardo dei ceppi da noi denominati come *C. pecorum*. Tale scelta è dovuta ad una semplificazione discorsiva in quanto ci ha permesso di riportare con rapidità ed in maniera univoca il ceppo coinvolto, la denominazione di *C. pecorum* è nata dalla completa sovrapposizione del *pattern* dimostrato in RFLP dal controllo per tale specie di clamidia con quello da noi riscontrato nella popolazione di colombi studiata. Però come riportato nei risultati le altre metodiche di identificazione applicate a tali campioni hanno mostrato risultati piuttosto differenti. In particolare si può notare come per tali ceppi isolati l'esecuzione di una *Real Time PCR* di genere risultasse essere positiva confermando l'appartenenza di tali ceppi alla famiglia *Chlamydiaceae*, mentre l'ArrayTube™ permetteva in un caso di classificarlo come *Chlamydia spp.*, mentre per un successivo isolato il *pattern* prodotto in *microarray* non era conclusivo. Per tale ragione si è deciso di procedere con metodiche aggiuntive quali il sequenziamento del 16S rRNA ed il sequenziamento dell'*ompA*. I risultati ottenuti si sono rilevati piuttosto interessanti, poiché ci hanno permesso di confermare l'appartenenza di tali ceppi a *Chlamydia spp.*, escludendo nel contempo una concreta appartenenza alla specie *C. pecorum*. Inoltre i sequenziamenti hanno permesso di mettere alla luce omologie con alcuni particolari ceppi di *C. psittaci* anche se tali omologie non sono da considerarsi conclusive in quanto intorno al 92%. Tali risultati ancora non conclusivi ci permettono di ipotizzare la presenza di un nuovo ceppo. Quindi ulteriori studi sono necessari per confermare tale ipotesi. Potrebbe trattarsi di un ceppo di interesse veterinario in quanto almeno nella popolazione da noi studiata ha presentato una prevalenza del 2%. Inoltre risulta interessante notare che nessuno degli animali mostranti positività in PCR per *C. pecorum*, ha mostrato sierconversione rilevabile mediante fissazione del complemento. Tale dato può essere spiegato attraverso una totale assenza di conversione nei confronti di questa specifica clamidia oppure che l'antigene utilizzato nella nostra metodica è altamente specifico per le *C. psittaci* ad oggi riconosciute e quindi tali ceppi non ancora classificati e correttamente identificati non determinano *cross*-reattività.

Come già ricordato in precedenza, la mera identificazione del patogeno non sempre è sufficiente a soddisfare le richieste del clinico, che sempre più spesso è interessato al sierotipo o genotipo, per cui tecnologie di recente introduzione, come DNA *microarray* e l'MLVA hanno attirato il

nostro interesse, al fine di valutare una loro possibile attività nella diagnosi delle clamidiosi, ampliando la quantità e la tipologia di informazioni sulle clamidie isolate. Per tale motivo abbiamo ritenuto utile sottoporre i ceppi isolati durante tale studio a queste nuove metodiche.

Apparentemente nei risultati da noi prodotti vi sono alcune discordanze tra esiti delle differenti metodiche che, in parte, derivano dalla non sovrapponibile classificazione dei genotipi tra i 2 metodi considerati (MLVA ed ArrayTube™).

Tale discrepanza peraltro già descritta in letteratura (Laroucau *et al.*, 2008), può derivare dalle diverse modalità di classificazione, peculiari di ciascun metodo, 20 profili per l'MLVA contro 28 possibili esiti per il *microarray*, che naturalmente influiscono sul potere discriminatorio del metodo stesso. Inoltre esiti discordanti possono essere frutto di possibili co-infezioni, abbastanza frequenti in natura e dipendenti dalla tipologia del campione, ma anche dalle peculiarità di ciascun metodo, in modo particolare riguardo al potere discriminatorio del metodo stesso. Dall'esperienza acquisita e dai risultati ottenuti possiamo dire che l'MLVA può essere considerata uno strumento utile soprattutto nella tipizzazione di *C. psittaci*, in quanto non richiede passaggi di isolamento in coltura e può essere condotta direttamente sul DNA estratto. Nonostante questo, occorre evidenziare che è una tecnica piuttosto lunga e laboriosa e soprattutto richiede una notevole esperienza dell'operatore particolare per la lettura dei risultati ed il confronto con i *pattern* dei ceppi di riferimento al fine di produrre il profilo corretto. Sicuramente a nostro parere risulta di più immediato utilizzo la metodica dell'ArrayTube™, che in un recente studio di validazione si è dimostrata sensibile quanto una *Real time* PCR, tanto che gli Autori la propongono la sostituzione della metodica dell'isolamento, attuale *gold standard*, con la combinazione della *Real time* PCR e ArrayTube™ (Sachse *et al.*, 2008).

# CONCLUSIONI

In conclusione possiamo affermare che nella popolazione oggetto del nostro studio abbiamo dimostrato una prevalenza di *C. psittaci* del 10%, dimostrando contestualmente la presenza di un ceppo di *C. psittaci* definito atipico, in quanto non viene classificato secondo i comuni canoni e con le attuali tecniche a nostra disposizione.

Inoltre i ceppi di *C. psittaci* isolati sono stati genotipizzati confermando la presenza nel colombo di città del genotipo B, E, e del più recente genotipo E/B, ceppi che solitamente risultano essere coinvolti con minore frequenza in episodi di infezione umana.

Abbiamo anche dimostrato la presenza di alcuni ceppi classificati come *Chlamydia spp.*, in quanto le metodologie applicate e le conoscenze attuali non permettono ulteriori distinzioni prospettando la possibilità di un nuovo ceppo. Infine attraverso l'analisi dei dati raccolti durante la prima fase di campionamenti ed anche attraverso la conferma ottenuta durante la seconda fase, siamo riusciti a strutturare un sistema di selezione, basato su caratteristiche funzionali ed anatomopatologiche, che permette all'anatomopatologo di selezionare in sede necroscopica i colombi molto probabilmente infetti, permettendo in tal modo una migliore organizzazione e gestione dei campioni di maggiore interesse, contenendo nel contempo i costi ma mantenendo elevati gli *standard* diagnostici.

# BIBLIOGRAFIA

- Andersen A.A. (1991). *Serotyping of Chlamydia psittaci isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test*. Journal of Clinical Microbiology; **29**(4): 707-711.
- Andersen A.A. (1996). *Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of Chlamydia psittaci from experimentally infected cockatiels and turkeys*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; **8**(4): 448-450.
- Andersen A.A. (1997). *Two new serovars of Chlamydia psittaci from North American birds*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; **9**(2): 159-164.
- Andersen A.A. (2005). *Serotyping of US isolates of Chlamydia psittaci from domestic and wild birds*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; **17**(5): 479-482.
- Andersen A.A. (2008). *Avian chlamydiosis*. OIE terrestrial Manual, 2008. Section 2.3. Aves; Ch. 2.3.1.; pp: 431-442.
- Andersen A.A. e Tappe J.P. (1989). *Genetic, immunologic, and pathologic characterization of avian chlamydial strains*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **195**(11): 1512-1516.
- Andersen A.A. e Vanrompay D. (2000). *Avian chlamydiosis*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.; **19**(2): 396-404.
- Andersen A.A. e Vanrompay D. (2003). *Avian Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis)*. Diseases of Poultry, Eleventh Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp: 863–879.
- Andersen A.A., Grimes J.E., Shivaprasad H.L. (1998). *Serotyping of Chlamydia psittaci isolates from ratites*. Journal Veterinary Diagnostic Investigation; **10**(2): 186-188.

- Anderson D.C., Stoesz P.A., Kaufmann A.F. (1978). *Psittacosis outbreak in employees of a turkey-processing plant*. American Journal of Epidemiology; **107**(2): 140-148.
- Andreani E. (1998). Trattato di malattie infettive degli animali. II Edizione. UTET editore, Torino, Italia, 1998. *Chlamydia*. Cap. 32; pp: 422-433.
- Andrews B.E., Major R., Palmer S.R. (1981). *Ornithosis in poultry workers*. Lancet; **1**(8221): 632-634.
- Arizmendi F. e Grimes J.F. (1995). *Comparison of the Gimenez staining method and antigen detection Elisa with culture for detecting chlamydiae in birds*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; **7**(3): 400-401.
- Arzey G.G. e Arzey K.E. (1990). *Chlamydiosis in layer chickens*. Australian Veterinary Journal; **67**(12):461.
- Arzey K.E., Arzey G.G., Reece R.L. (1990). *Chlamydiosis in commercial ducks*. Australian Veterinary Journal; **67**(9): 333-334.
- Baldaccini N.E. (1986). *Il colombo viaggiatore*. Edagricole Bologna.
- Ballarini G., Baldaccini N.E., Pezza F. (1989). *Colombi in Città. Aspetti Biologici, Sanitari e Giuridici. Metodologie di Controllo*. Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina. Documenti tecnici, 6. Bologna; p: 59.
- Barr D.A., Scott P.C., O'Rourke M.D., R.J. Coulter (1986). *Isolation of Chlamydia psittaci from commercial broiler chickens*. Australian Veterinary Journal; **63**(11) :377-378.
- Beasley J.N., Moore R.W., Watkins J.R. (1961). *The histopathologic characteristics of disease producing inflammation of the air sacs in turkeys: A comparative study of pleuropneumonia-like organisms and ornithosis in pure and mixed infections*. American Journal of Veterinary Research; **22**: 85-92.

- Bedson S.P. e Western G.T. (1930). *Observations on the virus of psittacosis*. British Journal of Experimental Pathology; **11**: 502-511.
- Bedson S.P. e Bland J.O.W. (1932). *A morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle*. British Journal of Experimental Pathology; **13**: 461-466.
- Bedson S.P. e Gostling J.V. (1954). *A study of the mode of multiplication of psittacosis virus*. British Journal of Experimental Pathology; **35**(3): 299-308.
- Beeckman D.S. e Vanrompay D. (2009). *Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective*. Clinical Microbiology and Infection; **15**(1): 11-17.
- Beeckman D.S e Vanrompay D. (2010). *Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent Chlamydophila psittaci strains in chicken macrophages*. Veterinary Microbiology; **141**(3-4): 342-353.
- Bejleri J. e Berxholi K. (1987). *Chlamydia in poultry in Albania*. Buletini i Shkencave Zooteknike e Veterinare; **5**(2): 63-70.
- Belchior E., Barataud D., Ollivier R., Capek I., Laroucau K., de Barbeyrac B., Hubert B. (2011). *Psittacosis outbreak after participation in a bird fair, Western France, December 2008*. Epidemiology and Infection; **139**(10): 1637-1641.
- Berger L., Volp K., Mathews S., Speare R., Timms P. (1999). *Chlamydia pneumoniae in a free-ranging giant barred frog (Mixophyes iteratus) from Australia*. Journal of Clinical Microbiology; **37**(7): 2378-2380.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Four. *The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dycioglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Planctomycetes*. :843-865. William B. Withman. Springer.

- Billington S. (2005). *Avian Practice: Clinical and zoonotic aspects of psittacosis*. In *Practice*; **27**: 256-263.
- Bodetti T.J., Jacobson E., Wan C., Hafner L., Pospischil A., Rose K., Timms P. (2002). *Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of Chlamydophila pneumoniae to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians*. *Systematic Applied Microbiology*; **25**(1): 146-152.
- Borel N., Kempf E., Hotzel H., Schubert E., Torgerson P., Slickers P., Ehricht R., Tasara T., Pospischil A., Sachse K. (2008). *Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay: a validation study*. *Molecular and Cellular Probes*; **22**(1): 55-64.
- Bougiouklis P., Papaioannou N., Georgopoulou I., Iordanidis P., Vlemmas I., Lekkas S., Siarkou V. (2000). *Chlamydia-induced bilateral ectropion of the inferior eyelids in pigeons*. *Avian Diseases*; **44**(2): 372-378.
- Bourke S.J., Carrington D., Frew C.E., McSharry C.P., Boyd G. (1992). *A comparison of the seroepidemiology of chlamydial infection in pigeon fanciers and farmers in the U.K.* *Journal of Infection*; **25** (Suppl.1): 91-98.
- Brade H. e Brunner H. (1979). *Serological cross-reactions between Acinetobacter calcoaceticus and chlamydiae*. *Journal of Clinical Microbiology*; **10**: 819 - 822.
- Brand C.J. (1989). *Chlamydial infections in free living birds*. *Journal of the American Veterinary Medicinal Association*; **195**(11): 1531-1535.
- Brumpt E. (1938). *Rickettsia intracellulaire stomacale (Rickettsia culicis N. Sp.) de Culex fatigans*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*; **16**: 153-158.
- Burkhart R.L. e Page L.A. (1971). *Chlamydiosis (ornithosis –psittacosis)*. In Davis J.W., Anderson R.C., Karstadt L. e D.O. Trainer (Eds.). *Infectious and parasitic disease of wild birds*. Ames, IA: Iowa State University Press; pp. 118-140.

- Burnet F.M. and Rountree P.H. (1935). *Psittacosis in the developing egg*. Journal of Pathology and Bacteriology; **40**: 471-481.
- Bush R.M. e Everett K.D. (2001). *Molecular evolution of the Chlamydiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; **51**(Pt1): 203-220.
- Calnek B.W. (2001). Patologia aviare. X Edizione. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova Italia, 2001. *Clamidiosi (Psittacosi, Ornitosi)*. Cap.15; pp: 371- 389.
- CEC (2000). Commission Decision of 16 October 2000 laying down the animal health requirements and the veterinary certification for the import of birds, other than poultry and the conditions for quarantine. *Official Journal of the European Communities L278*; pp: 26-34.
- Ceglie L., Lafisca S., Guadagno C., Dalla Pozza G., Capello K., Bano L., Vicari N., Donati M., Mion M., Giurisato I., Lombardo D., Pozzato N., Cavenini R., Natale A. (2007). *Serological surveillance in north-eastern Italy for the presence of Chlamydophila spp. from birds and molecular characterization of PCR isolates within the area of Venice*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> annual Workshop of Cost Action 855, Animal Chlamydioses and zoonotic implication. Pulawy, 10-11 September 2007; pp: 62-67.
- Circella E., Pugliese N., Todisco G., Cafiero M.A., Sparagano O.A., Camarda A. (2011). *Chlamydia psittaci infection in canaries heavily infested by Dermanyssus gallinae*. Experimental and Applied Acarology; **55**(4): 329-338.
- Coles A.C. (1930). *Micro-organisms in chlamydiosis* . The lancet; **1**: 1011-1012.
- Cotton M.M. e Partridge M.R. (1998). *Infection with feline Chlamydia psittaci*. Thorax **53**(1): 75-76.
- Crepaldi G. e Baritussio A. (2002). *Trattato di medicina interna*. Volume III. Piccin Nuova Libreria, Padova, Italia, 2002. Malattie da Chlamydiaceae. Cap.66; pp: 609-611.

- Davis D.J. (1955). *Psittacosis in pigeons*. In F.R. Beaudett (ed.). *Psittacosis: Diagnosis, Epidemiology, and Control*. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ; pp: 66-73.
- De Schrijver K. (1995). *A psittacosis outbreak in Belgian customs officers*. *Euro Surveillance*; Sep: 3.
- Dickinson E.M., Babcock W.E., Kilian J.G. (1957). *Ornithosis in Oregon turkeys*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; **130**(3): 117-118.
- Dickx V. e Vanrompay D. (2011). *Zoonotic transmission of Chlamydia psittaci in a chicken and turkey hatchery*. *Journal of Medical Microbiology*; **60**(Pt 6): 775-779.
- Dickx V., Geens T., Deschuyffeleer T., Tyberghien L., Harkinezhad T., Beeckman D.S.A., Braeckman L., Vanrompay D. (2010). *Chlamydia psittaci Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse*. *Journal of clinical microbiology* **48**(9): 3244–3250.
- Donati M., Laroucau K., Storni E., Mazzeo C., Magnino S., Di Francesco A., Baldelli R., Ceglie L., Renzi M., Cevenini R. (2009). *Serological response to pgp3 protein in animal and human chlamydial infections*. *Veterinary Microbiology*; **135**(1-2): 181-185.
- Dovc A., Dovc P., Kese D., Vlahović K., Pavlak M., Zorman-Rojs O. (2005). *Long-term study of Chlamydia psittaci in Slovenia*. *Veterinary Research Communications*; **29**(Suppl. 1): 23-36.
- Duizer G., Bowen G., Hutchison T.W. (2010). *Avian chlamydia infection in a Manitoba farmed pigeon flock*. *Canadian Veterinary Journal*; **51**(6): 605-606.
- Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. (1999). *Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; **49** (Pt 2): 415-440.

- Everett K.D., Hornung L.J., Andersen A.A. (1999). *Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests*. Journal of Clinical Microbiology; **37**(3): 575–580.
- Fenga C., Cacciola A., Di Nola C., Calimeri S., Lo Giudice D., Pugliese M., Niutta P.P., Martino L.B. (2007). *Serologic investigation of the prevalence of Chlamydophila psittaci in occupationally-exposed subjects in eastern Sicily*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine; **14**(1): 93-96.
- Ferreri A.J., Dolcetti R., Magnino S., Doglioni C., Cangì M.G., Pecciarini L., Ghia P., Dagklis A., Pasini E., Vicari N., Dognini G.P., Resti A.G., Ponzoni M. (2007). *A woman and her canary: a tale of chlamydiae and lymphomas*. Journal of the National Cancer Institute; **99**(18): 1418-1419.
- Ferreri A.J., Ponzoni M., Guidoboni M., Resti A.G., Politi L.S., Cortelazzo S., Demeter J., Zallio F., Palmas A., Muti G., Dognini G.P., Pasini E., Lettini A.A., Sacchetti F., De Conciliis C., Doglioni C., Dolcetti R. (2006). *Bacteria-eradicating therapy with doxycycline in ocular adnexal MALT lymphoma: a multicenter prospective trial*. Journal of the National Cancer Institute; **98**(19): 1375-1382.
- Flammer K. (1997). *Chlamydia*. Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, et al., eds. *Avian medicine and surgery*. Philadelphia: WB Saunders Co; 364–379.
- Fortner J. (1953). *Die Psittakose*. Monatshefte für Tierheilkunde; **5**: 29-134.
- Fudge A.M. (1991). Review. *ELISA testing for avian chlamydiosis*. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice; **21**(6): 1181-1187.
- Gaede W., Reckling K.F., Dresenkamp B., Kenklies S., Schubert E., Noack U., Irmscher H.M., Ludwig C., Hotzel H., Sachse K. (2008). *Chlamydophila psittaci infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany*. Zoonoses and Public Health; **55**(4): 184-188.

- Gaede W., Reckling K.F., Schliephake A., Missal D., Hotzel H., Sachse K. (2010). *Detection of Chlamydophila caviae and Streptococcus equi subsp. zooepidemicus in horses with signs of rhinitis and conjunctivitis*. Veterinary Microbiology; **142**(3-4): 440-444.
- Geens T., Desplanques A., Van Loock M., Bönner B.M., Kaleta E.F., Magnino S., Andersen A.A., Everett K.D., Vanrompay D. (2005a). *Sequencing of the Chlamydophila psittaci ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method*. Journal of Clinical Microbiology; **43**(5): 2456-2461.
- Geens T., Dewitte A., Boon N., Vanrompay D. (2005b). *Development of a Chlamydophila psittaci species specific and genotype-specific Real-Time PCR*. Veterinary Research; **36**(5-6): 787-797.
- Geigenfeind I., Haag-Wackernagel D. (2010). *Detection of Chlamydophila psittaci from feral pigeons in environmental samples: problems with currently available techniques*. Integrative Zoology; **5**(1): 63-69.
- Geigenfeind I., Vanrompay D., Haag-Wackernagel D. (2012). *Prevalence of Chlamydia psittaci in the feral pigeon population of Basel, Switzerland*. Journal of Medical Microbiology; **61**(Pt2): 261-265.
- Gerlach H. (1994). In Avian medicine: principles and application. Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. *Chlamydia*. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, 1994. Ch. 34; pp: 985-996.
- Ghigi A. (1989). *Colombi in città. Aspetti biologici, sanitari e giuridici. Metodologie di controllo*. Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina; Documenti tecnici Giugno.
- Girjes A.A., Hugall A.F., Timms P., Lavin M.F. (1988). *Two distinct forms of Chlamydia psittaci associated with disease and infertility in Phascolarctos cinereus (koala)*. Infection and Immunity; **56**(8): 1897-1900.

- Goodwin D. (1970). *Pigeons and doves of the world*. 2° ed. British Museum, London.
- Graber R.E. e Pomeroy B.S. (1958). *Ornithosis (psittacosis): an epidemiological study of a Wisconsin human outbreak transmitted from turkeys*. American Journal of Public Health and the nation's health; **48**(11 Pt 1): 1469-1483.
- Graham D.L. (1989). *Histopathologic lesions associated with chlamydiosis in psittacine birds*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **195**(11):1571-1573.
- Graham D.L. (1993). *A color atlas of avian chlamydiosis. Seminar in Avian Exotic Pet Medicine*; 2:184–189.
- Grimes J.E. (1985). *Enigmatic psittacine chlamydiosis: results of serotesting and isolation attempts, 1978 through 1983, and considerations for the future*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **186**(10):1075-1979.
- Grimes J.E. (1989). *Serodiagnosis of avian Chlamydia infection*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **195**(11): 1561-1564.
- Grimes J.E. e Page L.A. (1978). *Comparison of direct and modified direct complement-fixation and agar-gel precipitin methods in detecting chlamydial antibody in wild birds*. Avian Diseases; **22**(3): 422-430.
- Grimes J.E. e Wyrick P.B. (1991). *Chlamydiosis*. Calnek B.W. (ed.), Diseases of Poultry, 9<sup>th</sup> Ed., pp 311-325.
- Grimes J.E., Phalen D.N, Arizmendi F. (1993). *Chlamydia latex agglutination antigen and protocol improvement and psittacine bird anti-chlamydial immunoglobulin reactivity*. Avian Diseases; **37**(3): 817–824.
- Grimes J.E., Tully T.N. Jr, Arizmendi F., Phalen D.N. (1994). *Elementary body agglutination for rapidly demonstrating chlamydial agglutinins in avian serum with emphasis on testing cockatiels*. Avian Diseases; **38**(4): 822–831.

- Haag-Wackernagel D. e Bircher A.J. (2010). *Ectoparasites from feral pigeons affecting humans*. *Dermatology*; **220**(1): 82-92.
- Haag-Wackernagel D. e Moch H. *Health hazards posed by feral pigeons*. (2004). *Journal of Infection*; **48**(4): 307-313.
- Haag-Wackernagel D. e Spiewak R. (2004). *Human infestation by pigeon fleas (*Ceratophyllus columbae*) from feral pigeons*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*; **11**(2): 343-346.
- Halberstaedter L. e von Prowazek S. (1907). *Ueber Zelleinschlusse parasitarer Natur Beim Trachom*. *Arb. Gesundhamt*; **26**: 44-47.
- Hall C.F., Glass S.E., Grimes J.E., Moore R.W. (1975). *An epidemic of ornithosis in Texas turkeys in 1974*. *Southwestern Veterinarian*; **28**: 19-21.
- Harkinezhad T., Schautteet K., Vanrompay D. (2009a). *Protection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) against *Chlamydophila psittaci* challenge by DNA vaccination*. *Veterinary Research*; **40**(6):61.
- Harkinezhad T., Verminnen K., De Buyzere M., Rietzschel E., Bekaert S., Vanrompay D. (2009b). *Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds*. *Journal of Medical Microbiology*; **58**(Pt 9): 1207-1212.
- Harkinezhad T., Verminnen K., Van Droogenbroeck C., Vanrompay D. (2007). **Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans*. *Journal of Medical Microbiology*; **56**(Pt 8): 1097-1100.
- Harrison G.J. (1989). *A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; **195**(11): 1525-1528.
- Hawkes R.A. (1979). *General principles underlying laboratory diagnosis of viral infection*. In *diagnostic procedures for viral, rikettsial and chlamydial infections*, 5<sup>th</sup> ed.

E.H. Lennette and N.J. Schmidt, eds. American Public Health Association, Washington, D.C; pp.1-48.

- Hedberg K., White K.E., Forfang J.C., Korlath J.A., Friendshuh K.A., Hedberg C.W., MacDonald K.L., Osterholm M.T. (1989). *An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control*. American Journal of Epidemiology; **130**(3): 569-577.
- Heddema E.R., Ter Sluis S., Buys J.A., Vandenbroucke-Grauls C.M., van Wijnen J.H., Visser C.E. (2006a). *Prevalence of Chlamydothyla psittaci in Fecal Droppings from Feral Pigeons in Amsterdam, The Netherlands*. Applied and Environmental Microbiology; **72**(6): 4423–4425.
- Heddema E.R., van Hannen E.J., Duim B., de Jongh B.M., Kaan J.A., van Kessel R., Lumeij J.T., Visser C.E., Vandenbroucke-Grauls Christina M.J.E. (2006b). *An outbreak of psittacosis due to Chlamydothyla psittaci genotype A in a veterinary teaching hospital*. Journal of Medical Microbiology; **55**(Pt11): 1571-1575.
- Hellerström S. e Wassén E. (1930). Meningoenzephalitische Veränderungen bei Affen nach intracerebraler Impfung mit Lymphogranuloma inguinale. Proceedings of the Septième Congrès International de Dermatologie et de Syphiligraphie; pp: 1147-1151.
- Henry K. e Crossley K. (1986). *Wild-pigeon-related psittacosis in a family*. Chest; **90**(5); 708-710.
- Hewinson R.G., Griffiths P.C., Bevan B.J., Kirwan S.E.S., Field M.E., Woodward M.J., Dawson M. (1997). *Detection of Chlamydia psittaci DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction*. Vet. Microbiology; **54**: 155–166.
- Hinton D.G., Shipley A., Galvin J.W., Harkin J.T., Brunton R.A. (1993). *Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant*. Australian Veterinary Journal; **70**(5): 174–176.

- Holzinger-Umlauf H.A., Marschang R.E., Gravendyck M., Kaleta E.F. (1997). *Investigation on the frequency of Chlamydia sp. infections in tits (Paridae)*. Avian Pathology; **26**(4): 779-789.
- Huchzermeyer F.W., Gerdes G.H., Foggin C.M., Huchzermeyer K.D., Limper L.C. (1994). *Hepatitis in farmed hatchling Nile crocodiles (Crocodylus niloticus) due to chlamydial infection*. Journal of the South African Veterinary Association; **65**(1): 20-22.
- Hughes C., Maharg P., Rosario P., Herrell M., Bratt D., Salgado J., Howard D. (1997). *Possible nosocomial transmission of psittacosis*. Infection Control and Hospital Epidemiology; **18**(3): 165-168.
- Iijima Y., Akiyoshi K., Tanaka S., Nukina M., Ito M., Haruta T., Inoue A., Ando S., Kishimoto T. (2009). *Psittacosis outbreak at an avian exhibition*. Kansenshogaku Zasshi; **83**(5): 500-505.
- Ito I., Ishida T., Mishima M., Osawa M., Arita M., Hashimoto T., Kishimoto T. (2002). *Familial cases of psittacosis: possible person-to-person transmission*. Internal Medicine; **41**(7): 580-583.
- Jacobson E.R., Heard D., Andersen A. (2004). *Identification of Chlamydophila pneumoniae in an emerald tree boa, Corallus caninus*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; **16**(2): 153-154.
- Jones H., Rake G., Stearns B. (1945). *Studies on lymphogranuloma venereum. III. The action of the sulfonamides on the agent of lymphogranuloma venereum*. Journal of Infectious Diseases; **76**: 55-69.
- Kaibu H., Iida K., Ueki S., Ehara H., Shimasaki Y., Watanabe S., Anzai H., Takebu W., Muta T., Kusaba T., Kishimoto T., Ando S. *Psittacosis in all four members of a family in Nagasaki, Japan*. (2006). Japanese Journal of Infectious Diseases; **59**(5): 349-350.
- Kaleta E.F. e Taday Eva M.A. (2003). Review. *Avian host range of Chlamydophila spp. based on isolation, antigen detection and serology*. Avian pathology; **32**(5): 435-462.

- Kauffold J., Melzer F., Berndt A., Hoffmann G., Hotzel H., Sachse K. (2006). *Chlamydiae in oviducts and uteri of repeat breeder pigs*. Theriogenology; **66**(8): 1816-1823.
- Ketz C.J. e Carpenter J.W. (1999). *What is your diagnosis?* Journal of Avian Medicine and Surgery; **13**: 218-222.
- Koene R., Hautvast J., Züchner L., Voorn P., Rooyackers-Lemmens E., Noel H., Swaan C. (2007). *Local cluster of psittacosis after bird show in the Netherlands, November 2007*. Eurosurveillance; **12**(12): E071213.1.
- Kolb J., Kankondi R., Hübschle O.J. (1993). *Isolation of Chlamydia spp. from ostriches (Struthio camelus) (short report)*. Dtsch Tierarztl Wochenschr; **100**(11): 454.
- Kováčová E., Majtán J., Botek R., Bokor T., Blaskovicová H., Solavová M., Ondicová M., Kazár J. (2007). *A fatal case of psittacosis in Slovakia, January 2006*. Euro Surveillance; **12**(8):E070802.1.
- Kutlin A., Roblin P.M., Kumar S., Kohlhoff S., Bodetti T., Timms P., Hammerschlag M.R. (2007). *Molecular characterization of Chlamydophila pneumoniae isolates from Western barred bandicoots*. Journal of Medical Microbiology; **56**(Pt 3): 407-417.
- Laroucau K., Thierry S., Vorimore F., Blanco K., Kaleta E., Hoop R., Magnino S., Vanrompay D., Sachse K., Myers G.S., Bavoil P.M., Vergnaud G., Pourcel C. (2008). *High resolution typing of Chlamydophila psittaci by multilocus VNTR analysis (MLVA)*. Infection, Genetics and Evolution; **8**(2): 171-181.
- Laroucau K., de Barbeyrac B., Vorimore F., Clerc M., Bertin C., Harkinezhad T., Verminnen K., Obeniche F., Capek I., Bébéar C., Durand B., Zanella G., Vanrompay D., Garin-Bastuji B., Sachse K. (2009a). *Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France*. Veterinary Microbiology; **135**(1-2): 82-89.

- Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K. (2009b). *Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France*. Infection, Genetics and Evolution; **9**(6): 1240-1247.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. (2001). *A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis*. BMC Microbiology; **1**:2.
- Le Flèche P., Fabre M., Denoeud F., Koeck J.L., Vergnaud G. (2002). *High resolution, on-line identification of strains from the Mycobacterium tuberculosis complex based on tandem repeat typing*. BMC Microbiology; **2**:37.
- Levinthal W. (1930). *Die Ätiologie der Psittakosis*. Klinische Wochenschrift; **9**: 654.
- Lillie R.D. (1930). *Psittacosis: Rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals*. Public Health Report ; **45**: 173.
- Longbottom D. e Coulter L.J. (2003). *Animal chlamydioses and zoonotic implications*. Journal of Comparative Pathology; **128**(4): 217-244.
- Maffei C., Marracino A., Di Stanislao F., Pauri P., Clementi M., Varaldo P.E. (1987). *Psittacosis in a highly endemic area in Italy*. Epidemiology and Infection; **99**(2): 413-419.
- Magnino S., Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., Dovc A., Prukner-Radovčić E., Residbegović E., Ilieski V., Laroucau K., Donati M., Martinov S., Kaleta E.F. (2009). *Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications*. Veterinary Microbiology; **135**(1-2): 54-67.
- Maluping R.P., Oronan R.B., Toledo S.U. (2007). *Detection of Chlamydophila psittaci antibodies from captive birds at the Ninoy Aquino Parks and Wildlife Nature Center*,

Quezon City, Philippines. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*; **14**(1): 191-193.

- Martinov S.P. e Popov G.V. (1992). *Recent outbreaks of ornithosis in ducks and humans in Bulgaria*. Proceedings of the European Society for Chlamydia Research. Uppsala University Centre for STD Research, Uppsala, Sweden, pp: 203.
- Matsui T., Nakashima K., Ohyama T., Kobayashi J., Arima Y., Kishimoto T., Ogawa M., Cai Y., Shiga S., Ando S., Kurane I., Tabara K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A., Okabe N. (2008). *An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan*. *Epidemiology and Infection*; **136**(4): 492-495.
- McCulloh A. (1955). *An epidemic of psittacosis in poultry workers: clinical evaluation and treatment*. *Texas State Journal of Medicine*; **51**: 817-821.
- Messmer T.O., Skelton S.K., Moroney J.F., Daugharty H., Fields B.S. (1997). *Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks*. *Journal of Clinical Microbiology*; **35**(8): 2043–2046.
- Meyer K.F. (1941). *Phagocytosis and immunity in psittacosis*. *Schweiz. Med. Wochenschr.*; **71**: 436-438.
- Meyer K.F., 1952. *Ornithosis and psittacosis*. In H.E. Biester and L.H. Schwarte (Eds), *Disease of poultry*, 3rd edn. Ames, IA: Iowa State University Press. pp: 569-618.
- Meyer K.F. (1965). *Psittacosis-lymphogranuloma venerum agents*. In E.H. Lennette and Schmidt N.J. (Eds.), *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 4<sup>th</sup> edn. Philadelphia, PA: Lippincott; pp: 603-625.
- Meyer K.F. (1967). *The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venerum (PL) agents*. *American Journal of Ophthalmology*; **63**: 1225-1246.
- Meyer K.F. e Eddie B. (1953). *Characteristic of a psittacosis viral agent isolated from a turkey*. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*; **83**(1): 99-101.

- Meyer K.F., Eddie B., Yanamura H.Y. (1942). *Ornithosis (psittacosis) in pigeons and its relation to human pneumonitis*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; **49**: 609-615.
- Miyagawa Y., Mitamura T., Yaoi T., Ishii N., Okanishi J. (1935). *Studies on the virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas, Favre, and Durant I, II, III, IV, V*. Japanese Journal of Experimental Medicine; **13**: 331-338.
- Morange A. (1895). *De la psittacose, ou infection speciale determinee par des perruches*. Academie de Paris, Paris, France.
- Moulder J.W. (1966). *The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses*. Annual Review of Microbiology; **20**: 107-130.
- Newman C.P., Palmer S.R., Kirby F.D., Caul E.O. (1992). *A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors*. Epidemiology and Infection; **108**(1): 203-210.
- Okuda H., Ohya K., Shiota Y., Kato H., Fukushi H. (2011). *Detection of Chlamydophila psittaci by using SYBR green real-time PCR*. Journal of Veterinary Medical Science; **73**(2): 249-254.
- Page L.A. (1959). *Experimental ornithosis in turkeys*. Avian Diseases; **3**(1): 51-56.
- Page L.A. (1966). *Revision of the family chlamydiaceae rake (ricicettsiales): unification of the psittacosislymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus chlamydia Jones, Rake and Stearns, 1945*. International Journal of Systematic Bacteriology; **16**(2): 223-252.
- Page L.A. (1968). *Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia*. Jones, Rake, and Stearns, 1945. International Journal of Systematic Bacteriology; **18**: 51-66.

- Page L.A. (1974). *Application of an agar gel precipitin test to the serodiagnosis of avian chlamydiosis*. Proceedings American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians; **17**: 51–61.
- Page L.A., Derieux W.T., Cutlip R.C. (1975). *An epornitic of fatal chlamydiosis (ornithosis) in South Carolina turkeys*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **166**(2): 175-178.
- Palmer S.R., Andrews B.E., Major R. (1981). *A common-source outbreak of ornithosis in veterinary surgeons*. Lancet; **2**(8250): 798-799.
- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2009). *New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydophila psittaci and Chlamydophila abortus from tissue samples*. Veterinary Journal; **181**(2): 145-150.
- Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2010). *Detection of all Chlamydophila and Chlamydia spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases; **33**(6): 473-484.
- Petrovay F. e Balla E. 2008. *Two fatal cases of psittacosis caused by Chlamydophila psittaci*. Journal of Medical Microbiology; **57**(Pt 10): 1296-1298.
- Phalen D.N., Hofle M., Dahlhausen B., Stlyes D. (1999). *Diagnosis of Chlamydia psittaci infections in cockatiels and columbiformes*. Proceedings Annual Conference Association of Avian Veterinarians; 13–17.
- Pinkerton H. e Swank R.L. (1940). *Recovery of virus morphologically identical with psittacosis from thiamin deficient pigeons*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; **45**: 704-706.
- Potter M.E., Kaufmann A.K., Plikaytis B.D. (1983). *Psittacosis in the United States, 1979*. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries; **32**(1): 27SS-31SS.

- Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H., Ramisse F., Vergnaud G. (2004). *Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of Yersinia pestis*. BMC Microbiology; 4:22.
- Prukner-Radovčić E., Horvatek D., Gottstein Z., Grozdanić I.C., Mazija H. (2005). *Epidemiological investigation of Chlamydophila psittaci in pigeons and free-living birds in Croatia*. Veterinary Research Communications; 29(Suppl.1): 17-21.
- Rake G. (1953). *The lymphogranuloma-psittacosis group*. Annals of the New York Academy of Science; 56(3): 557-560.
- Rake G., McKee C.M., Shaffer M.F. (1940). *Agent of lymphogranuloma venerum in the yolk-sac of the developing embryo*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; 43: 332-335.
- Rake G., Shaffer M.F., Thygeson P. (1942). *Relationship of Agents of Trachoma and Inclusion Conjunctivitis to Those of Lymphogranuloma-Psittacosis Group*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine; 49:545-547.
- Rasmussen-Ejde RK. (1938). *Ueber eine durch Sturmvögel übertragbare Lungenerkrankung auf den Färöern*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Erste Abteilung Originale; 143: 89–93.
- Raso T.F., Carrasco A.O., Silva J.C., Marvulo M.F., Pinto A.A. (2010). *Seroprevalence of antibodies to Chlamydophila psittaci in zoo workers in Brazil*. Zoonoses and Public Health; 57(6): 411-416.
- Reed K.D., Ruth G.R., Meyer J.A., Shukla S.K. (2000). *Chlamydia pneumoniae infection in a breeding colony of African clawed frogs (Xenopus tropicalis)*. Emerging Infectious Diseases; 6(2): 196-199.

- Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. (2002). *Avian chlamydiosis as a zoonotic risk and reduction strategies*. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scsh/out73\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scsh/out73_en.pdf).
- Ritter J. (1879). *Beitrag zur Frage des Pneumotyphus. Eine Hausepidemie in Uster (Schweiz) betreffend*. Dtsch Arch Klin Med; **25**: 53-96.
- Rodolakis A. e Mohamad K.Y. (2010). Review. *Zoonotic potential of Chlamydia*. Veterinary Microbiology; **140**(3-4): 382-391.
- Ruppanner R., Behymer D.E., DeLong W.J. 3rd, Franti C.E., Schulz T. (1984). *Enzyme immunoassay of Chlamydia in birds*. Avian Diseases; **28**(3): 608-615.
- Sachse K. e Hotzel H. (2003). *Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR*. Methods in Molecular Biology; **216**: 123-36.
- Sachse K., Hotzel H., Slickers P., Ellinger T., Ehricht R. (2005). *DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydia spp.* Molecular and Cellular Probes; **19**(1): 41-50.
- Sachse K., Laroucau K., Hotzel H., Schubert E., Ehricht R., Slickers P. (2008). *Genotyping of Chlamydia psittaci using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes*. BMC Microbiology; **8**: 63.
- Sachse K., Laroucau K., Vorimore F., Magnino S., Feige J., Müller W., Kube S., Hotzel H., Schubert E., Slickers P., Ehricht R. (2009a). *DNA microarray-based genotyping of Chlamydia psittaci strains from culture and clinical samples*. Veterinary Microbiology; **135**(1-2): 22-30.
- Sachse K., Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A., Longbottom D. (2009b). *Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections*. Veterinary Microbiology; **135**(1-2): 2-21.

- Salinas J., Caro M.R., Cuello F. (1993). *Antibody prevalence and isolation of Chlamydia psittaci from pigeons (Columba livia)*. Avian Diseases; **37**(2): 523–527.
- Salinas J., Caro M.R., Cuello F. (1993). *Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to Chlamydia psittaci in pigeon sera*. Zentralblatt für Veterinärmedizin B; **40**(4): 239-244.
- Satalowich F.T., Barrett L., Sinclair C., Smith K.A., Williams L.P. (1993). *Compendium of chlamydiosis (psittacosis) control, 1994*. Journal of the American Veterinary Medical Association; **203**(12): 1673-1680.
- Sayada C., Andersen A.A., Storey C., Milon A., Eb F., Hashimoto N., Hirai K., Elion J., Denamur E. (1995). *Usefulness of omp1 restriction mapping for avian Chlamydia psittaci isolate differentiation*. Research in Microbiology; **146**(2): 155–165.
- Schachter J., Ostler H.B., Meyer K.F. (1969). *Human infection with the agent of feline pneumonitis*. Lancet; **1**(7605): 1063-1065.
- Smith K.A., Campbell C.T., Murphy G., Stobierski M.G., Tengelsen L.A. *Compendium of measures to control Chlamydia psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis), 2010*. NASPHV (National Association of State Public Health Veterinarians); [www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf](http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf).
- Spencer W.N. e Johnson F.W. (1983). *Simple transport medium for the isolation of Chlamydia psittaci from clinical material*. Veterinary Record; **113**(23): 535-536.
- Sprague L.D., Schubert E., Hotzel H., Scharf S., Sachse K. (2009). *The detection of Chlamydia psittaci genotype C infection in dogs*. Veterinary Journal; **181**(3): 274-279.
- Stamp J.T., McEwen A.D., Watt J.A., Nisbet D.I. (1950). *Enzootic abortion in ewes; transmission of the disease*. Veterinary Record; **62**(17): 251-254.

- Stephens R.S., Myers G., Eppinger M., Bavoil P. M. (2009). *Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved*. Immunology and Medical Microbiology; 55(2): 115-119.
- Stewardson A.J. e Grayson M.L. (2010). *Psittacosis*. Infectious Disease Clinics of North America; 24(1): 7-25.
- Storni E. (2007). Tesi di dottorato in biochimica. Università degli Studi di Bologna. Cap. 2; p: 56.
- Storz J. e Page L.A. (1971). *Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for Classifying Organisms of the Genus Chlamydia, Family Chlamydiaceae, in a Separate Order, Chlamydiales ord. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology; 21(4): 332-334.
- Strauss J. (1967). *Microbiologic and epidemiologic aspects of duck ornithosis in Czechoslovakia*. American Journal of Ophthalmology; 63(5Suppl): 1246-1259.
- Sudler C., Hoelzle L.E., Schiller I., Hoop R.K. 2004. Molecular characterisation of chlamydial isolates from birds. Vet Microbiol. ;98(3-4):235-41.
- Taday E.M.A. (1998). *Organveränderungen und Erregernachweise nach Infektionen mit Chlamydia sp. beim Vogel unter besonderer Berücksichtigung des aviären Wirt – spektrums –eine veterinar-historische Studie*. Dissertation thesis, Gießen, Germany.
- Tanaka C., Miyazawa T., Watarai M., Ishiguro N. (2005). *Bacteriological survey of feces from feral pigeons in Japan*. Journal of Veterinary Medical Science; 67(9): 951-953.
- Tang F.F., Chang H.L., Huang Y.T., Wang K.C. (1957). *Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo*. Chinese Medical Journal; 75(6): 429-447.

- Tappe J.P., Andersen A.A., Cheville N.F. (1989). *Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of Chlamydia psittaci*. Veterinary Pathology; **26**(5): 386-395.
- Telfer B.L., Moberley S.A., Hort K.P., Branley J.M., Dwyer D.E., Muscatello D.J., Correll P.K., England J., McAnulty J.M. (2005). *Probable psittacosis outbreak linked to wild birds*. Emerging Infectious Diseases; **11**(3): 391–397.
- Theegarten D., Sachse K., Mentrup B., Fey K., Hotzel H., Anhenn O. (2008). *Chlamydophila spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease*. Respiratory Research; **9**: 14.
- Thygeson P. (1934a). *Etiologic diagnosis of conjunctivitis*. Archives of Ophthalmology; **12**(5): 676-688.
- Thygeson P. (1934b). *The nature of the elementary and initial bodies of trachoma*. Archives of Ophthalmology; **12**: 308-317.
- Tiong A., Vu T., Counahan M., Leydon J., Tallis G., Lambert S. (2007). *Multiple sites of exposure in an outbreak of ornithosis in workers at a poultry abattoir and farm*. Epidemiology and Infection; **135**(7): 1184-1191.
- Toschi A. (1939). *Ricerche e osservazioni sul Colombo Selvatico (Columba livia L.)*. Ricerche di Zoologia Applicata alla Caccia, XIII, Istituto Zoologico R. Università Bologna, Bologna, p: 124.
- Trávnicek M., Cisláková L., Deptuła W., Stosik M., Bhide M.R. (2002). *Wild pigeons and pheasants--a source of Chlamydophila psittaci for humans and animals*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine; **9**(2): 253-255.
- Van Droogenbroeck C., Beekman D.S., Verminnen K., Marien M., Nauwynck H., Boesinghe L.T., Vanrompay D. (2009). *Simultaneous zoonotic transmission of Chlamydophila psittaci genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist*. Veterinary Microbiology; **135**(1-2): 78-81.

- Van Loock M., Geens T., De Smit L., Nauwynck H., Van Empel P., Naylor C., Hafez H.M., Goddeeris B.M., Vanrompay D. (2005). *Key role of Chlamydophila psittaci on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens*. *Veterinary Microbiology*; **107**(1-2): 91–101.
- Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1992). *Diagnosis of avian chlamydiosis; specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures*. *Journal of Veterinary Medicine B*. **39**(2): 105–112.
- Vanrompay D., Andersen A.A., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1993a). *Serotyping of European isolates of Chlamydia psittaci from poultry and other birds*. *Journal of Clinical Microbiology*; **31**(1): 134–137.
- Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F., Hendrickx W. (1993b). *Primary pathogenicity of an European isolate of Chlamydia psittaci from turkey poults*. *Veterinary Microbiology*; **38**(1-2): 103-113.
- Vanrompay D., De Meurichy W., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1994a). *Pneumonia in Moorish tortoises (Testudo graeca) associated with avian serovar A Chlamydia psittaci*. *Veterinary Record*; **135**(12): 284-285.
- Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1994b). *Pathogenicity for turkeys of Chlamydia psittaci strains belonging to the avian serovars A, B and D*. *Avian Pathology*; **23**(2): 247-262.
- Vanrompay D., Butaye P., Sayada C., Ducatelle R., Haesebrouck F. (1997). *Characterization of avian Chlamydia psittaci strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies*. *Research in Microbiology* **148**(4): 327–333.
- Vanrompay D., Cox E., Vandenbussche F., Volckaert G., Goddeeris B. (1999). *Protection of turkeys against Chlamydia psittaci challenge by gene gun-based DNA immunizations*. *Vaccine*; **17**(20-21): 2628-2635.

- Vanrompay D., Harkinezhad T., van de Walle M., Beeckman D., van Droogenbroeck C., Verminnen K., Leten R., Martel A., Cauwerts K. (2007). *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerging Infectious Diseases*; **13**(7): 1108-1110.
- Vázquez B., Esperón F., Neves E., López J., Ballesteros C., Muñoz M.J. (2010). *Screening for several potential pathogens in feral pigeons (Columba livia) in Madrid. Acta Veterinaria Scandinavica*; 52:45.
- Vergnaud G. e Pourcel C. (2009). *Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. Methods in Molecular Biology*; **551**: 141-158.
- Verminnen K., Van Loock M., Hafez H.M., Ducatelle R., Haesebrouck F., Vanrompay D. (2006). *Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Chlamydophila psittaci antibodies in turkey sera. Veterinary Research*; **37**(4): 623-632.
- Verminnen K., Duquenne B., De Keukeleire D., Duim B., Pannekoek Y., Braeckman L., Vanrompay D. (2008). *Evaluation of a Chlamydophila psittaci infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. Journal of Clinical Microbiology*; **46**(1): 281-285.
- Vicari N., Santoni R., Vigo P.G., Magnino S. (2004). *A PCR-RFLP assay targeting the 16S rRNA gene for the diagnosis of animal chlamydioses. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Meeting of the European Society for Chlamydia Research. Budapest, Hungary, September 1-4, 2004.*
- Vicari N., Laroucau K., Vorimore F., Barbieri I., Sachse K., Hotzel H., Fabbi M., Labalestra I., Magnino S. (2009). *Analisi molecolare di clamidie isolate da intestino e tamponi cloacali di piccioni catturati nelle città di Milano e Ferrara. Atti del XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Parma, 30 settembre-2 ottobre 2009; pp: 266-267.*
- Wages D.P. (1987). *Diseases of pigeons. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*; **17**(5): 1089-1107.

- Wilcke B.W. Jr, Newcomer C.E., Anver M.R., Simmons J.L., Nace G.W. (1983). *Isolation of Chlamydia psittaci from naturally infected African clawed frogs (Xenopus laevis)*. Infection and Immunity; **41**(2): 789-794.
- Williams J, Tallis G, Dalton C, Ng S, Beaton S, Catton M, et al. Community outbreak of psittacosis in rural Australian town. The Lancet 1998;351:1697-1699.
- Winsor D.K. Jr e Grimes J.E. (1988). *Relationship between infectivity and cytopathology for L-929 cells, membrane proteins, and antigenicity of avian isolates of Chlamydia psittaci*. Avian Diseases; **32**(3): 421-431.
- Wolins W. (1948). *Ornithosis; a review with a report of eight cases resulting from contact with the domestic Pekin duck*. American Journal of the Medical Sciences; **216**(5): 551-564.
- Wood M.M. e Timms P. (1992). *Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to Chlamydia psittaci in koalas*. Journal of Clinical Microbiology; **30**(12): 3200–3205.
- Wreghitt T. (2003). *Ornithosis*. Presentation, Seminar on birds and Public Health, British Ornithologists's Union held at The British Academy, London 27 November 2003; 14.
- Wreghitt T.G. e Taylor C.E. (1988). *Respiratory tract chlamydial infection and importation of psittacine birds*. Lancet; **2**(8613): 743.
- Yang J., Ling Y., Yuan J., Pang W., He C. (2011). *Isolation and characterization of peacock Chlamydophila psittaci infection in China*. Avian Diseases; **55**(1): 76-81.
- Yung A.P., Grayson L., 1988. Psittacosis - a review of 135 cases. Med J Austr.;146:228-233.
- Zhang F., Li S., Yang J., Pang W., Yang L., He C. (2008). *Isolation and characterization of Chlamydophila psittaci isolated from laying hens with cystic oviducts*. Avian Diseases **52**(1): 74-78.

- Zhou J., Qiu C., Lin G., Cao X., Zheng F., Gong X., Wang G. (2010). *Isolation of Chlamydophila psittaci from Laying Hens in China*. *Veterinary Research*; **3**(3): 43-45.
- Zweifel D., Hoop R., Sachse K., Pospischil A., Borel N. (2009). *Prevalence of Chlamydophila psittaci in wild birds—potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health?*. *European Journal of Wildlife Research*; **55**(6): 575-581.

# **RINGRAZIAMENTI**

*Desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi. In particolar modo la Prof.ssa Elena Catelli dell'Università degli Studi di Bologna e il Dr. Salvatore Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.*