

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

°Bilato D., *Ceglie L., *Giurisato I., §Catelli E., *Catania S.

°*Medico Veterinario (Padova)*

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Padova)*

§*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Ozzano Emilia (Bologna)*

Summary

In this study we evaluate the prevalence of *Chlamydiaceae*, especially *C. psittaci*, in synanthropic birds such as urban pigeons in some areas of Venice. Innovative molecular tools, such as microarray and MLVA (*Multilocus VNTR Assay*), were applied in order to evaluate the genotypes of *C. psittaci* and the other species of *Chlamydia* present in this avian population to assess the risk of zoonosis posed by pigeons in this urban area. Moreover, we classified and correlated the gross pathological lesions with the pathogen. Our results showed the presence of *C. psittaci* in urban population of pigeons in Venice, with a prevalence of 10%. We also demonstrated an atypical strain of *C. psittaci* not yet classified with the available laboratory techniques. Genotyping revealed the presence of genotypes B, E and E/B that could be considered less frequently involved in cases of human infection. Additionally, we found other *Chlamydia* strains suggesting the presence of a new *Chlamydia* genotype. Finally, the elaboration of the data, collected during the first and second sampling phase, revealed a correlation between *C. psittaci* and adult females pigeons, presenting hepatomegaly. Based on this results we develop and adopted a diagnostic protocol during necropsy that allows to select pigeons, which have a higher probability to be infected, and a better organization and management of interests samples, containing the economic costs and maintaining high-level of the diagnostic standards.

INTRODUZIONE

Le *Chlamydiae* appartengono all'ordine *Chlamydiales* e alla famiglia *Chlamydiaceae* (1). *Chlamydia spp.* è stata segnalata in 469 specie aviarie appartenenti a 30 ordini di uccelli, principalmente psittaciformi, columbiformi e passeriformi (2).

Il ruolo zoonosico di *C. psittaci* è ampiamente dimostrato, anche se risulta difficile correlare l'infezione in uccelli sinantropi, come il colombo di città, con un reale rischio per l'uomo. Spesso la sola identificazione di specie, all'interno del genere *Chlamydia*, non è sufficiente e sono richieste informazioni aggiuntive che possono caratterizzare ulteriormente questo patogeno, quali per esempio il sierotipo e genotipo. Nuove tecnologie, come il *microarray*, permettono di identificare per *C. psittaci* 9 genotipi, 7 aviarie (A, B, C, D, E, F, E/B) 2 non aviarie (WC, M56), ciascuno associato prevalentemente ad un ordine di uccelli e con diverso rischio zoonosico (3). Altre metodiche, come l'MLVA (*Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) permettono di distinguere 20 diversi *patterns* (4).

Inoltre, dato che sia i segni clinici che le lesioni anatomico-patologiche non sono patognomoniche e considerato lo stato di portatore asintomatico tipico delle specie aviarie, spesso è difficile avanzare un forte sospetto attraverso un esame clinico

o anatomo-patologico a causa delle scarse correlazioni tra sintomatologia ed eventuali lesioni anatomo-patologiche con l'infezione. Questa carenza pregiudica notevolmente l'esame autoptico quale strumento di *screening* preliminare, volto alla selezione di campioni potenzialmente infetti. Nel presente lavoro abbiamo valutato la prevalenza di *Chlamydiaceae*, ed in particolare *C. psittaci*, in una popolazione aviaria con caratteristiche sinantropiche quale il colombo di città (*Columba livia var. domestica*) nell'areale veneziano. Contestualmente le clamidie isolate sono state caratterizzate valutandone i genotipi mediante tecnologie biomolecolari innovative. Inoltre, si è proceduto ad una classificazione delle lesioni anatomo-patologiche e ad una loro correlazione con la presenza del patogeno.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il gruppo di animali oggetto di campionamento è stato rappresentato da specie aviarie sinantropiche, ovvero colombi di città (*Columba livia var. domestica*), provenienti da differenti aree della città storica di Venezia e Mestre. I prelievi sono stati eseguiti inizialmente su 439 colombi ed in una seconda fase su 100.

Il protocollo di prelievo ha previsto la strutturazione di schede di rilevamento e rilievo autoptico per singolo soggetto in cui venivano raccolti una serie di parametri utili durante l'esecuzione degli esami necroscopici e per la catalogazione delle lesioni evidenziate.

Da ogni soggetto è stato comunque preventivamente prelevato un campione ematico per effettuare uno *screening* sierologico per *C. psittaci* mediante Fissazione Del Complemento utilizzando un antigene commerciale, secondo protocollo del Manuale OIE (5).

Prima di procedere all'esame autoptico, veniva effettuato in sterilità il prelievo degli organi interessati nello studio, fegato e milza, per evitare eventuali contaminazioni degli stessi, previa compilazione della scheda di rilevamento. In tali schede è stato quindi valutato lo stato sanitario generale dei soggetti, ed in particolare l'età, sviluppo delle masse muscolari, stato del piumaggio, presenza di ecto/endoparassiti, e rilievo di lesioni anatomo-patologiche a carico di fegato, milza, apparato respiratorio e gastroenterico, con il fine di focalizzare la nostra attenzione solamente a quei soggetti presentanti determinate lesioni ascrivibili con maggiore probabilità alla positività per clamidia. Tutte le 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.

Isolamento e identificazione

L'iter diagnostico ha previsto una analisi preliminare di *screening*, mediante RFLP-PCR, da organi *target* quali fegato e milza. Gli organi risultati positivi venivano processati con metodiche di isolamento tradizionale in uova embrionate di pollo SPF, ed in linee cellulari continue LLC-MK2. I ceppi isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione mediante DNA *microarray Array Tube*TM, MLVA e sequenziamento. Successivamente sono state apportate una serie di modifiche, sulla base delle evidenze acquisite nella fase precedente, per migliorare la sensibilità diagnostica e per arrivare a valutare un metodo che potesse permettere di effettuare uno *screening* di animali

potenzialmente positivi al fine di contenere il numero di campioni da analizzare e il numero di isolamenti. Da un ulteriore gruppo di colombi (100) gli organi sono stati prelevati separatamente e conservati a -80°C con l'aggiunta di un terreno di trasporto antibiotato a base di saccarosio, fosfato di potassio, acido glutammico.

Da tale gruppo, i prelievi sono stati eseguiti dagli animali che sono stati selezionati sulla base dei risultati ottenuti attraverso una preliminare elaborazione di dati della prima fase di prelievo, ovvero introducendo il criterio selettivo adulti, femmine con epatomegalia pari od oltre il livello C della scala di *grading* (o in assenza considerando soggetti adulti/epatomegalia di grado elevato, eventualmente associata a splenomegalia di grado elevato).

RISULTATI

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

I risultati sierologici per *C. psittaci* hanno mostrato una positività del 34.4% sulla popolazione studiata con una maggior prevalenza negli animali adulti. In tutti gli animali abbiamo potuto riscontrare che le lesioni a carico del fegato e milza erano ascrivibili solamente ad un aumento delle dimensioni dell'organo. Dallo *screening* in PCR, 55 animali sono risultati positivi per *Chlamydia spp.*, 45 per *C. psittaci* (prevalenza 10%), 9 per *C. pecorum* (prevalenza 2%), ed un campione per *C. abortus*. Dall'analisi preliminare dei dati raccolti attraverso le schede di rilevazione e dai risultati di PCR, si è notato come la presenza della epatomegalia sembrava essere maggiormente correlata alla presenza di *Chlamydia*, a differenza della splenomegalia anche di grado elevato. Nel campione iniziale di 439 colombi si è rilevata una maggiore prevalenza di positività in PCR nel gruppo di femmine adulte (15.4%) che insieme alla epatomegalia ha permesso di focalizzare l'attenzione negli animali di sesso femminile, con apparato riproduttore maturo e con epatomegalia nella seconda fase di campionamento. Dalla selezione effettuata sul successivo conferimento di 100 colombi, secondo il criterio adulto/epatomegalia/preferibilmente femmine/eventuale associazione con splenomegalia elevata, solo 10 soggetti presentavano i requisiti richiesti. Di questi, 5 sono risultati positivi in PCR, di cui 3 per *C. psittaci* (una considerata debole) e 2 per *C. pecorum*, ottenendo una prevalenza sui soggetti selezionati del 50%, superiore rispetto alla prevalenza della popolazione studiata (12,5%).

Le due metodiche tradizionali di isolamento utilizzate hanno per lo più evidenziato i medesimi risultati ad eccezione della *C. abortus* che è cresciuta solamente in uova embrionate, con una maggior percentuale di isolati nella seconda fase a seguito delle variazioni apportate.

La metodica *microarray* ha classificato le *C. psittaci* come genotipo B, E, E/B ed un ceppo di *C. psittaci* definito atipico i cui risultati non sono stati conclusivi. Sia questo ceppo che l'isolato di *C. abortus* sono stati confermati appartenenti alle rispettive specie mediante *microarray*. MLVA ha permesso invece di associare tutte le *C. psittaci* al genotipo 7, mentre *C. abortus* al genotipo 2. Il campione considerato allo *screening* iniziale come *C. psittaci* debole, non ha ottenuto conferme riguardo la sua appartenenza alla specie *C. psittaci*, mentre sia la *Real Time PCR Chlamydiaceae*

che l'*Array Tube*TM hanno mostrato positività al genere *Chlamydia*. Gli isolati risultanti invece dai campioni identificati inizialmente come *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 ha permesso di evidenziare omologie con *C. psittaci* anche se il grado di omologia risulta essere basso ipotizzando la possibilità di nuovi ceppi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai risultati si può affermare che *C. psittaci* è presente nelle popolazioni di colombi di città a Venezia. È stata evidenziata una prevalenza di *Chlamydia* spp. sul totale dei campioni esaminati del 12,5% ed una prevalenza di *C. psittaci* del 10%.

I ceppi di *C. psittaci* isolati sono stati genotipizzati confermando la presenza nel colombo urbano del genotipo B, E, e del più recente 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 correlato con quelli dimostrati in Europa (6), una *C. psittaci* atipica ed una *C. abortus*. Dai risultati sierologici si è riscontrata una maggiore positività per *C. psittaci* nei colombi adulti rispetto a quelli giovani ed in tutti i soggetti risultati positivi per *C. pecorum* o *C. abortus* non è stata rilevata positività a livello sierologico per *C. psittaci*.

Infine, attraverso l'analisi dei dati raccolti durante la prima fase di campionamenti ed anche attraverso la conferma ottenuta durante la seconda fase, abbiamo strutturato un sistema di selezione, basato su caratteristiche funzionali ed anatomopatologiche (animali adulti, in fase riproduttiva, ed in particolare femmine con epatomegalia) che permette all'anatomo-patologo di selezionare in sede necroscopica i colombi molto probabilmente infetti, ottenendo una percentuale di positivi sui selezionati del 50%, rispetto alla prevalenza della popolazione studiata (12,5%). Tale approccio permette una migliore organizzazione e gestione dei campioni di maggior interesse, contenendo nel contempo i costi e mantenendo elevati gli *standard* diagnostici.

BIBLIOGRAFIA

1. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, WB Whitman (2011). The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dyctioglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Volume 4. Springer (Ed.). pp: 843-865.
2. Kaleta EF and Taday Eva MA (2003). Review. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32(5): 435-462.
3. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol Cell Probes.* 19(1): 41-50.

4. Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, Blanco K, Kaleta E, Hoop R, Magnino S, Vanrompay D, Sachse K, Myers GS, Bavoil PM, Vergnaud G, Pourcel C. (2008). High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol.* 8(2): 171-181.
5. OIE Terrestrial Manual (2008). Avian chlamydiosis. Section 2.3. Aves; Chapter 2.3.1.; pp: 431-442.
6. Laroucau K, Vorimore F, Aaziz R, Berndt A, Schubert E, Sachse K. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol.* 9(6): 1240-1247.