



HAL
open science

Prévalence des Chlamydiales chez les rapaces de l'Oregon : identification d'une Rhabdochlamydia

Sophie Jouffroy

► **To cite this version:**

Sophie Jouffroy. Prévalence des Chlamydiales chez les rapaces de l'Oregon : identification d'une Rhabdochlamydia. Médecine vétérinaire et santé animale. 2017. dumas-04542370

HAL Id: dumas-04542370

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04542370v1>

Submitted on 11 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Open Archive Toulouse Archive Ouverte

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/19685>

To cite this version:

Jouffroy, Sophie. *Prévalence des Chlamydiales chez les rapaces de l'Oregon : identification d'une Rhabdochlamydia*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 82 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

PREVALENCE DES *CHLAMYDIALES* CHEZ LES RAPACES DE L'OREGON : IDENTIFICATION D'UNE *RHABDOCHLAMYDIA*

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

JOUFFROY, Sophie
Née, le 08/04/1992 à CHENOVE (21)

Directeur de thèse : Mme Hélène DANIELS

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Hélène DANIELS
M. Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

PREVALENCE DES *CHLAMYDIALES* CHEZ LES RAPACES DE L'OREGON : IDENTIFICATION D'UNE *RHABDOCHLAMYDIA*

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

JOUFFROY, Sophie
Née, le 08/04/1992 à CHENOVE (21)

Directeur de thèse : Mme Hélène DANIELS

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Hélène DANIELS
M. Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootecnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
- M. MAILLARD Renaud, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier,

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse,
Virologie-bactériologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommages respectueux.*

A Madame le Docteur Helene Daniels

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Microbiologie-Immunologie-Pathologies Infectieuses

*Pour l'intérêt porté à ce travail et le soutien dont vous avez fait preuve,
Sincères remerciements.*

A Monsieur le Docteur Guillaume le Loc'h

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Médecine Zoologique et de la Faune Sauvage

*Pour avoir accepté d'être assesseur de cette thèse,
Sincères remerciements.*

A mes maitres de stage,

Professeur Daniel D. Rockey,

Professeur
Bactériologie

Professeur Robert Bildfell,

Professeur,
Anatomie Pathologique

*Pour m'avoir proposé ce projet, pour m'avoir soutenu et aidé tout au long de sa réalisation,
Mes remerciements les plus sincères.*

Tables des matières

Résumé.....	7
Introduction.....	8
I. L'ordre des <i>Chlamydiales</i>	9
1. Taxonomie.....	9
2. Biologie.....	13
2.1. Cycle de développement.....	13
2.2. Vie intracellulaire	15
II. <i>Chlamydia psittaci</i>	15
1. Généralités.....	15
2. Pathogénie	16
2.1. Voie d'entrée.....	17
2.2. Dissémination.....	17
2.3. Temps d'incubation.....	18
2.4. Réponse immunitaire	18
3. Diagnostic.....	20
3.1. Signes cliniques	20
3.2. Mise en évidence.....	24
4. Données épidémiologiques	29
4.1. Réservoirs	29
4.2. Hôtes non aviaires.....	31
4.3. Modes de transmission	32
5. Moyens de lutte	34
5.1. Moyens de prévention	34
5.2. Prévention médicale	35
5.3. Traitements	35
5.4. Cadre réglementaire français.....	39
III. Famille des <i>Rhabdochlamydiaceae</i>	40
1. <i>Rhabdochlamydia porcellionis</i>	40
1.1. Hôte	40
1.2. Description morphologique	40
1.3. Séquençage	42
2. <i>Rhabdochlamydia crassifigans</i>	42
2.1. Hôte	43

2.2.	Description morphologique	43
2.3.	Séquençage	44
3.	Pouvoir pathogène des <i>Rhabdochlamydiaceae</i>	44
3.1.	Chez les animaux	44
3.2.	Chez l'homme	44
4.	Données épidémiologiques	47
4.1.	Les arthropodes piqueurs, vecteurs de Chlamydiales ?	47
4.2.	Potentiel zoonotique	49
5.	Mise en évidence	49

Résultats : prévalence de *Chlamydia psittaci* dans l'Oregon (E.U.) et identification d'une *Rhabdochlamydia* 51

I.	Contexte de l'étude	51
II.	Matériel et méthode	51
1.	Contact avec les centres de la faune sauvage	51
2.	Population cible	51
3.	Collecte des échantillons	52
4.	Extraction d'ADN	52
5.	Identifications bactériennes	53
5.1.	Choix des amorces	53
5.2.	Déroulement de la PCR	54
5.3.	Test de la séquence choisie	54
5.4.	Identification précise de l'espèce	54
III.	Résultats	55
1.	Echantillons récoltés	55
2.	Echantillon 2	57
3.	Echantillon 3	58
4.	Echantillon 1	58
4.1.	Evaluation de la PCR	58
4.2.	Résultats de la PCR	59
4.3.	Résultats du séquençage	59
4.4.	Classification phylogénétique	60
5.	Echantillons contenant l'ADN de poux	61
IV.	Discussion	62
1.	Echantillon 3 : portage de <i>Chlamydia psittaci</i>	62
2.	Echantillon 1 : portage de <i>Rhabdochlamydia</i>	63

2.1. Contamination de l'oiseau via des arthropodes	63
2.2. Contamination par des amibes via l'eau ou les aliments.....	64
2.3. Présence dans les sécrétions respiratoires	64
3. Echantillon 2 : résultats non conclusifs.....	65
Conclusion	66
Références bibliographiques.....	68

Table des annexes

Annexe 1: Fiche accompagnant les prélèvements, à être complétées par les centres	80
Annexe 2 : Lettre d'explication pour les centres de la faune sauvage	81
Annexe 3 : Article publié dans le Journal of Veterinary Diagnostic Investigation à la suite de l'étude	82

Table des illustrations

Figure 1 : Arbre phylogénétique de l'ordre des <i>Chlamydiales</i> , construit en sur la base des séquences 23s, d'après Everett <i>et al.</i> , 1999a.	10
Figure 2 : Arbre phylogénétique actuel de l'ordre <i>Chlamydiales</i> , basé sur la séquence 16s (Taylor-Brown and Polkinghorne, 2017)	12
Figure 3 : Cycle de développement des <i>Chlamydia</i> , d'après (AbdelRahman and Belland, 2005)	14
Figure 4 : Corps élémentaire et corps réticulé dans une inclusion immature de <i>C.trachomatis</i>	14
Figure 5: Observation en MET de cellules hépatopancréatiques de <i>P. scaber</i> (échelle = 2µm).	41
Figure 6 : Corps élémentaires matures en microscopie électronique à balayage (échelle : 10µm)	42
Figure 7 : Ultrastructure de <i>Rhabdochlamydia crassificans</i> (échelle (a) : 0,1µm ; (b) :1µm ; MET)	43
Figure 8 : Kit d'écouvillonnage	52
Figure 9 : Localisation des centres de faunes sauvages participant à l'étude.	56
Figure 10: 3 PCR positives pour <i>Chlamydia spp.</i> sur 3 échantillons différents	57
Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR de mise au point sur l'ADNg de <i>C. caviae</i> (MW : marqueur de taille 1kpb)	58
Figure 12 : Résultat de la recherche BLAST de la séquence obtenue avec l'échantillon 1 (SJ1599)	59
Figure 13: Arbre phylogénétique de la séquence 16s des Chlamydiales, obtenu selon la méthode de « Neighbor-joining ».	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Hôtes principaux des différents <i>serovars</i> de <i>Chlamydia psittaci</i> (Stewardson and Grayson, 2010)	16
Tableau 2: Résumé des hôtes mammifères non humains de <i>C. psittaci</i>	23
Tableau 3 : Récapitulatif des moyens diagnostiques utilisés pour mettre en évidence une infection à <i>C. psittaci</i> chez les oiseaux (Longbottom and Coulter, 2003; Maxted <i>et al.</i> , 2017)	27
Tableau 4 : Prévalence de <i>C. psittaci</i> chez les oiseaux en centres de faunes sauvages	30
Tableau 5: Voies d'administration et posologie de différents antibiotiques pour le traitement de la chlamydie aviaire chez les espèces citées, d'après Smith <i>et al.</i> , 2011	37
Tableau 6 : Bilan des analyses révélant la présence de <i>Rhabdochlamydiaceae</i> dans des échantillons d'origine humaine	46
Tableau 7 : Prévalence d'ADN de CLO chez les arthropodes piqueurs de différents pays.	48
Tableau 8 : Séquences des amorces spécifiques aux <i>Chlamydiales</i> ciblant les séquences 16s et 18s de l'ADN ribosomique présents dans les échantillons choanaux et cloacaux de rapaces.	53
Tableau 9 : Nombre d'échantillons récoltés, organisés par espèce de rapace.	55

Liste des abréviations

μL : microlitre

μm : micromètre

ADCC : Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CDC : Center for Disease Control

CE : Corps Elementaire

cf : *confer* « se référer à »

CLO : *Chlamydia*-Like Organisms

CR : Corps Réticulé

ddNTP : didésoxynucléotides

DEFRA : Department of Environment, Food and Rural Affairs

dNTP : désoxynucléotides

E.U. : Etats Unis d'Amérique

ELISA: Enzyme-LinkedImmunosorbantAssay

GAG : GlycoAminoGlycane

GNN : Granulocytes Neutrophiles

i.v. : intra veineux

IFD : ImmunoFluorescence Directe

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

IFN : Interferon

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL : Interleukine

LBA : Lavage Bronch-Alvéolaire

LT : Lymphocyte T

MET : Microscope Electronique à Transmission

MLST : Multi Locus Sequence Typing

NASPHV : National Association of State Public Health Veterinarians

nm : nanomètre

OSU : Oregon State University

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

Pb : Paires de Bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

p.i. : post-infection

PLT : Psittacose Lymphogranuloma Venereum

pM : picomolaire

RFC : Réaction de Fixation du Complément

s.l. : *sensu lato*

Spp. : *Species pluralis* “toutes les espèces d’un genre”

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des symboles

☞ : résumé expliquant un point technique

🔧 : résumé contenant des informations pratiques

Résumé

En tant que prédateurs au sommet de la chaîne alimentaire, les oiseaux de proie sont des témoins importants de la présence de microorganismes pathogènes dans les écosystèmes. En captivité, ils représentent un risque pour la santé du personnel soignant et des vétérinaires. Deux agents pathogènes nous ont particulièrement intéressés au cours de cette étude : *Chlamydia psittaci* et *Staphylococcus aureus* résistant à la Méricilline (SARM).

Chez l'homme, toutes les souches de *C. psittaci* peuvent provoquer une psittacose. L'objectif premier de cette étude était de mesurer la prévalence de *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de proie dans l'Oregon. Des écouvillons naso-buccaux ont été réalisés sur 82 oiseaux lors de leur admission dans l'un des neuf centres de faune sauvage participants à l'étude. La présence de *Chlamydia spp.* et de « *Chlamydia-like Organisms* » (CLO) a été déterminée par PCR 16s.

La présence de SARM chez la faune sauvage en général, et chez les oiseaux en particulier, n'est que peu décrite. Différentes études montrent cependant le potentiel zoonotique de cet agent.

L'autre but de cette étude était donc de mesurer la prévalence du SARM chez des oiseaux ayant séjourné au moins deux jours dans des centres de la faune sauvage et de la comparer à la prévalence de l'agent pathogène à l'admission. Pour ce faire, des échantillons naso-buccaux ont été prélevés sur 68 oiseaux au moment de l'admission, dans trois centres de faune sauvage différents. L'identification bactérienne a été réalisée par les techniques classiques d'isolement sur milieux gélosés spécifiques, coloration de Gram, recherche de la catalase et de la coagulase. Les colonies d'intérêt ont été séquencées selon la méthode Sanger.

Aucun SARM n'ayant été isolé parmi les 68 échantillons prélevés, seuls les travaux concernant *Chlamydia psittaci* seront développés dans ce manuscrit.

Introduction

Les oiseaux de proie, tout comme les oiseaux de façon générale, peuvent être des réservoirs pour différents pathogènes. Ils peuvent véhiculer des agents infectieux, et les transmettre à d'autres oiseaux ou aux hommes. En tant que chasseurs sélectifs, les oiseaux de proie, consommant souvent des proies mortes ou malades, sont particulièrement susceptibles de porter des agents pathogènes (Blomqvist *et al.*, 2012).

Dans les centres de faune sauvage, les oiseaux sont en contact étroit avec les hommes, dans des conditions particulièrement stressantes. La transmission d'agents zoonotiques est alors possible et ce, dans les deux sens.

Chlamydia psittaci est une bactérie intracellulaire obligatoire. Les oiseaux en sont l'hôte principal, mais cette bactérie peut aussi être transmise aux mammifères. Chez les oiseaux, le portage est souvent asymptomatique, mais dans des conditions particulières telles qu'un stress, un oiseau peut développer des signes cliniques de chlamyidiose aviaire. Les symptômes sont une cachexie, de la dyspnée, des sécrétions nasales, et éventuellement une diarrhée et des signes nerveux. Chez les hommes, l'infection est appelée psittacose. Les symptômes sont surtout respiratoires. L'intensité des symptômes varie, pouvant évoluer d'un syndrome grippal vers une pneumonie sévère si l'infection n'est pas traitée à temps.

Les oiseaux de proie sont des hôtes potentiels de *C. psittaci* (Kaleta and Taday, 2003), mais la prévalence de l'infection est moins documentée que chez les oiseaux domestiques. En 1983, une étude sur les rapaces du refuge de l'Université de Californie (University of California Raptor Rehabilitation Center) a été réalisée suite à une épidémie chez des buses dans un centre de faune sauvage local. Une analyse utilisant l'ELISA comme méthode diagnostique a montré que 92% des oiseaux possédaient des anticorps anti-*Chlamydia*, et *C. psittaci* a été isolée chez 10% des oiseaux. Ces résultats suggèrent une possible infection endémique des oiseaux de cette région (Fowler *et al.*, 1990). D'autres évaluations de prévalence chez ces oiseaux a été réalisée à partir d'un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et d'immunofluorescence après enrichissement sur culture cellulaire (Kaleta and Taday, 2003) et a révélé la présence de *C. psittaci* dans 13% et 14% des espèces des ordres Falconiformes et Accipitriformes, en Allemagne principalement. Des études plus récentes réalisées par PCR révèlent des prévalences de 1,3% (4/319 rapaces, Suède)(Blomqvist *et al.*, 2012) à 74 % (29/39 rapaces, Allemagne) (Schettler *et al.*, 2003).

D'autres études sur les oiseaux sauvages autres que les rapaces, tels que *Fulmarus glacialis* et des passereaux, ont montré la présence de *C. psittaci* (Gartrell *et al.*, 2013). Le potentiel zoonotique de *C. psittaci* a surtout été étudié à partir d'isolats de poulets et de fulmars dans des conditions spécifiques (élevage intensif, épidémie humaine de psittacose)(Lagae *et al.*, 2014 ; Herrmann *et al.*, 2006). Toutefois, un potentiel zoonotique semble possible quel que soit la souche de *Chlamydia psittaci*. La transmission à l'homme est étudiée régulièrement, comme c'est le cas dans cette étude lors d'une épidémie de psittacose dans un refuge de faune sauvage en Belgique (Kalmar *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus résistant à la Méricilline (SARM) a d'abord été identifié comme un pathogène humain opportuniste nosocomial et a été nommé HA-SARM (Human-Associated-MRSA). Certaines souches, appelées « Livestock-Associated MRSA » (LA-MRSA) pour « souches isolées à partir d'animaux d'élevage », ont été isolées chez des porcs d'élevage. Les SARM ont aussi été isolées sur des animaux de compagnie, d'élevage et sur des oiseaux. Cependant, le portage de SARM par la faune sauvage est peu documenté. Des études récentes montrent la présence de SARM chez des rapaces en Espagne et dans un centre de l'état de l'Iowa (USA)(Porrero *et al.*, 2014; Wardyn *et al.*, 2012). La transmission de différentes souches de SARM d'une espèce à une autre n'est pas élucidée, mais elle reste probable (Cuny *et al.*, 2010). Lors de notre étude, aucun SARM n'a été mis en évidence parmi les 68 échantillons prélevés et seule l'étude concernant *Chlamydia psittaci* sera donc développée dans ce manuscrit.

I. L'ordre des Chlamydiales

1. Taxonomie

La première description d'un cas de psittacose remonte à 1879, en Suisse (Read *et al.*, 2013). Le cycle de développement des chlamydiae, faussement appelées « virus de la Psittacose » lors de leur découverte, est décrit pour la première fois en 1934 par Bedson et Bland (Bedson and Bland, 1934). Jusque 1935, différentes études montrent une sensibilité des agents de « PLT » (Psittacose-Lymphogranuloma-Venereum) aux sulfamides et des doutes émergent sur la nature virale de ces agents (Jones *et al.*, 1945). La sensibilité des agents aux sulfamides, et donc leur synthèse de folate, est confirmée par des études postérieures, et d'autres caractéristiques confirment la nature bactérienne de l'agent : la division par fission binaire, l'observation de la double membrane des CR (Corps Réticulé, cf I.2.1) similaire à celle des Gram - et la présence d'acide muramique parmi les mucopeptides de la membrane cellulaire, ainsi que l'absence de membrane autour du nucléotide (Moulder, 1966). Les descriptions de l'agent progressent, mais sa classification est loin de faire consensus. Entre 1945 et 1964, non moins de sept tentatives de classification sont proposées, différentes en terme de nombre et appellation de famille, genre et espèces (Page, 1966).

Le résumé des connaissances sur le cycle de développement des chlamydiae, unique dans le monde bactérien, est repris par Moulder en 1966 (Moulder, 1966) et permet à Stolz de proposer en 1971 la création de l'ordre des *Chlamydiales*, de la famille des *Chlamydiaceae* et du genre *Chlamydia* (STORZ and PAGE, 1971). En 1980, la classification bactérienne distingue *Chlamydia trachomatis*, qui accumule le glycogène et est sensible à la sulfadiazine et *Chlamydia psittaci*, qui ne possède pas ces critères métaboliques (Herring, 1993). Dans les années qui suivent, les avancées des techniques de biologie moléculaire

basées sur les analyses d'ADN font évoluer la taxonomie, et permettent la classification de nouvelles espèces.

Ainsi, l'ordre des *Chlamydiales* continue de subir de profondes modifications. En 1999, il est proposé de restructurer les taxons de l'ordre des *Chlamydiales* en se basant sur les séquences ribosomales des gènes 16s et 23s. Quatre familles se dégagent alors au sein de l'ordre des *Chlamydiales*: les bactéries présentant plus de 90% d'homologie 16s et/ou 23s sont classées dans la famille des *Chlamydiaceae*, comprenant elle-même deux genres, *Chlamydia* et *Chlamydophila*. Les bactéries possédant entre 80 et 90% d'homologie 16s avec la famille des *Chlamydiaceae* sont subdivisées en trois autres familles : *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* et la famille de la souche WSU 86-1044 (Everett *et al.*, 1999a) (Figure 1).

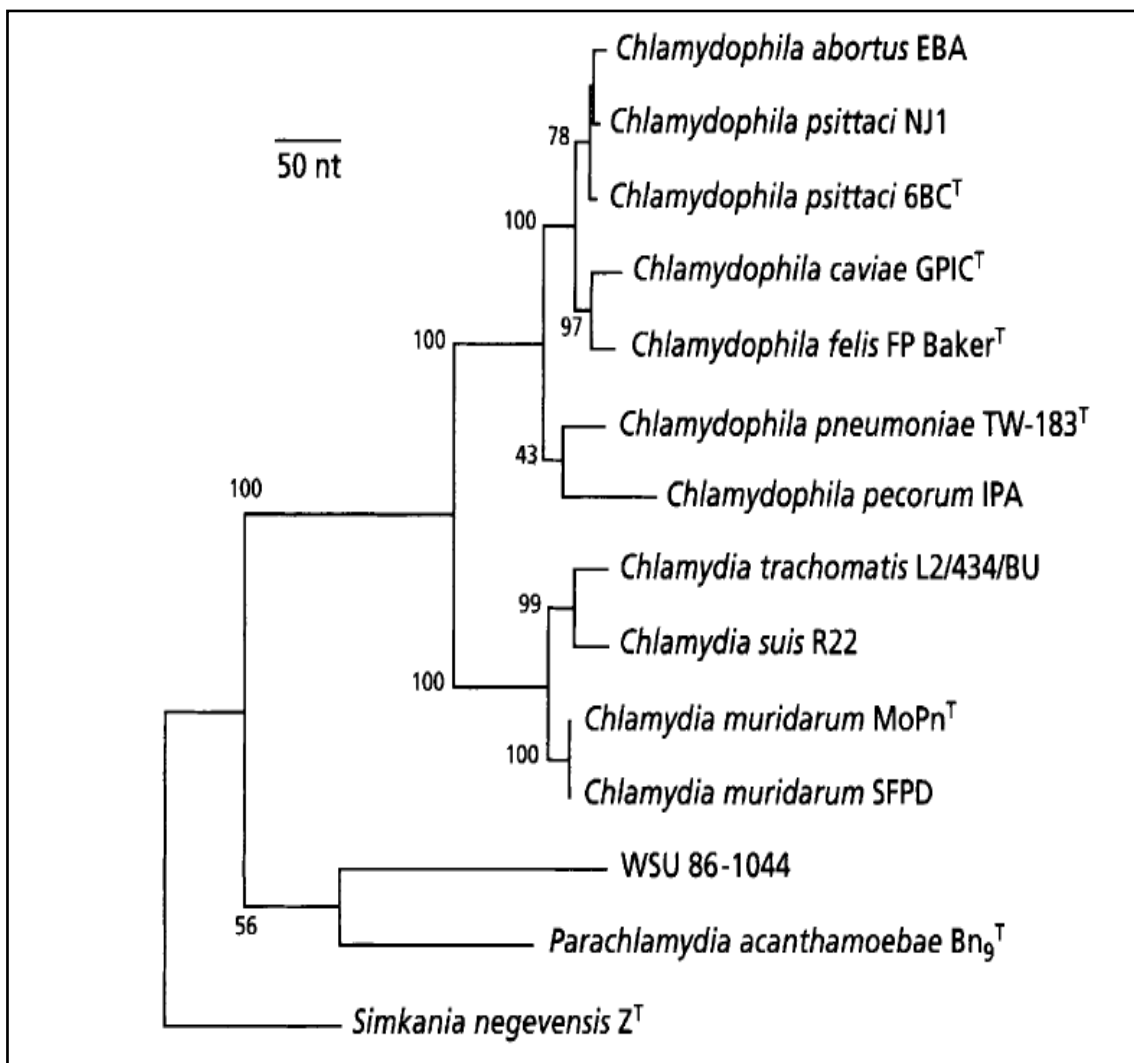


Figure 1 : Arbre phylogénétique de l'ordre des *Chlamydiales*, construit en sur la base des séquences 23s, d'après Everett *et al.*, 1999a.

Cette taxonomie proposant deux genres au sein de la famille des *Chlamydiaceae* est loin de faire l'unanimité dans la communauté scientifique (Schachter *et al.*, 2001). Huit ans plus tard, la taxonomie proposée n'est pas utilisée par la majorité des chercheurs travaillant sur les *Chlamydiales* (Stephens *et al.*, 2009). Des analyses génomiques et la prise en compte des caractéristiques biologiques des différentes espèces permettent à Stephens et collaborateurs de proposer en 2009 une taxonomie regroupant les 9 espèces de la famille des *Chlamydiaceae*, abolissant les 2 genres *Chlamydia* et *Chlamydophila*. Leurs arguments étant que les mutations, notamment au niveau du gène 16s, aboutissant à une séparation des espèces en deux genres ne conduisent pas à des différences phénotypiques majeures. Deux hypothèses permettraient d'expliquer un taux de mutation faible au sein de la famille des *Chlamydiaceae* : La particularité du cycle avec la nécessité de former d'un corps élémentaire (CE, cf 2.1) infectieux à la fin du cycle de répllication afin d'infester les cellules voisines, et l'isolement des *Chlamydia* au sein d'une vacuole d'endocytose de la cellule eucaryote. La séparation en genres basée sur l'unique séquence ribosomale 16s n'a pas lieu d'être, et les neuf bactéries de la famille *Chlamydiaceae* sont désormais rassemblées sans distinction de genre (Stephens *et al.*, 2009) (Figure 2).

Récemment, aux 9 espèces de *Chlamydiaceae* répertoriées se sont rajoutées 4 espèces, dont 3 proches de *C. psittaci* infectant principalement les oiseaux : *C. avium*, *C. gallinaceae* (Sachse *et al.*, 2014), *Candidatus C. ibidis* (Vorimore *et al.*, 2013) et une espèce pas encore cultivée, identifiée chez un serpent : *C. sanzinia* (Taylor-Brown *et al.*, 2016). Ces quatre espèces ont été respectivement identifiées (i) chez les pigeons et psittacidés, (ii) chez les poules, pintades, dindes et autres volailles, (iii) chez l'ibis sacré (*Threskiornis aethiopicus*) et (iv) dans le choane d'un serpent en captivité (*Sanzinia madagascariensis volontany*).

D'autres modifications de la taxonomie concernent aujourd'hui les bactéries communément appelées « *Chlamydia-like* », pour la ressemblance phénotypique et la ressemblance de leur cycle de développement aux bactéries de la famille des *Chlamydiaceae*. La classification actuelle comprend 8 familles de « *Chlamydia-like* » : *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavichlamydiaceae* et *Parilichlamydiaceae* (Taylor-Brown *et al.*, 2015).

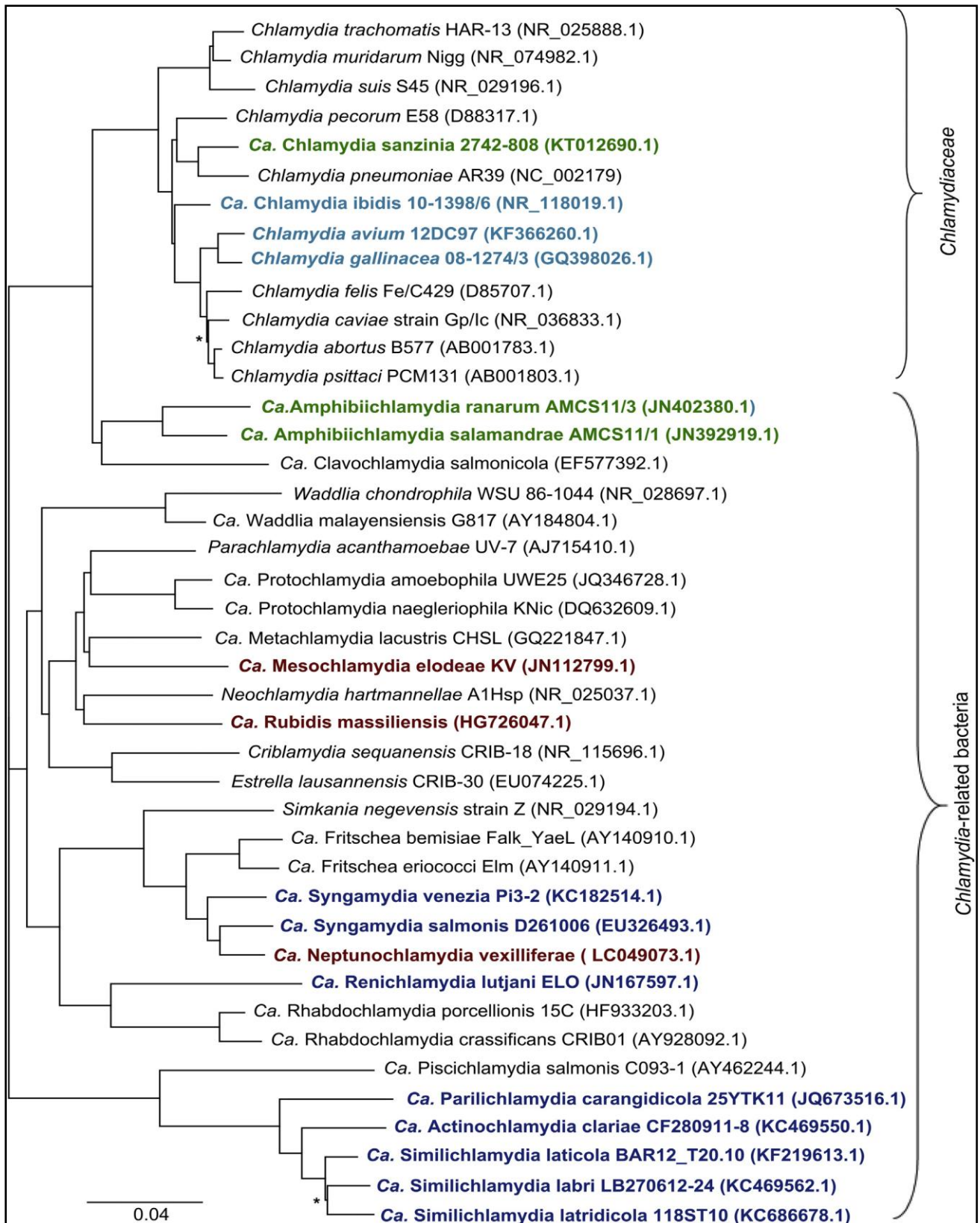


Figure 2 : Arbre phylogénétique actuel de l'ordre *Chlamydiales*, basé sur la séquence 16s (Taylor-Brown and Polkinghorne, 2017)

Les espèces découvertes depuis 2013 sont en gras ; les hôtes de ces nouvelles espèces sont des reptiles et amphibiens (vert), des oiseaux (bleu clair), des poissons (bleu foncé) ou des protozoaires (rouge foncé).

2. Biologie

2.1. Cycle de développement

Les bactéries appartenant à l'ordre des *Chlamydiales* présentent un développement particulier comprenant des étapes intra- et extracellulaires. Au cours du cycle, les chlamydiae sont sous formes de corps élémentaire (CE) ou sous forme de corps réticulé (CR). Le corps élémentaire, forme infectieuse de la bactérie, mesure environ 0,3µm. C'est une forme métaboliquement inerte, dans laquelle l'ADN bactérien est fortement condensé à l'aide de protéines bactériennes similaires aux histones eucaryotes (Hct-A et Hct-B). La membrane du CE ne contient pas ou très peu de peptidoglycanes. Sa rigidité serait assurée par la formation de ponts disulfures entre les régions riches en cystéine de certaines protéines de la membrane externe (la porine Omp-A et les adhésines OmcB et OmcA) et par la structure hexagonale de la couche protéique en face interne de l'enveloppe externe du CE.

Le CE se rapproche dans un premier temps de la cellule hôte par une interaction électrostatique réversible, puis se fixe de façon irréversible par une liaison à un récepteur, la nature de celui-ci n'étant pas connue et pouvant varier selon les espèces. Le CE est ensuite endocyté et reste contenu dans les vésicules d'endocytose de la cellule hôte. Il se transforme rapidement en une forme métaboliquement active, le Corps Réticulé (CR). Le CR mesure 1µm de diamètre et est délimité par une double membrane. C'est la forme métaboliquement active. L'ADN bactérien est décondensé et de nombreux ribosomes sont alors visibles dans le cytoplasme du CR. Ceux-ci permettent une réplication de l'ADN et confèrent au cytoplasme un aspect granuleux au microscope électronique (Figure 4). La réplication de l'ADN est maximale 6-8h après infection. Le CR se divise par scissiparité, et les inclusions grandissent avec le nombre de divisions. Suite à signal non encore identifié, les CR se différencient en CE par l'expression de gènes tardifs, codant entre autres les protéines de condensation de l'ADN et les composants de la membrane externe du CE. Finalement, de cent à plus de mille CE infectants sont libérés par lyse de la cellule hôte (AbdelRahman and Belland, 2005; Everett *et al.*, 1999a) (Figure 3).

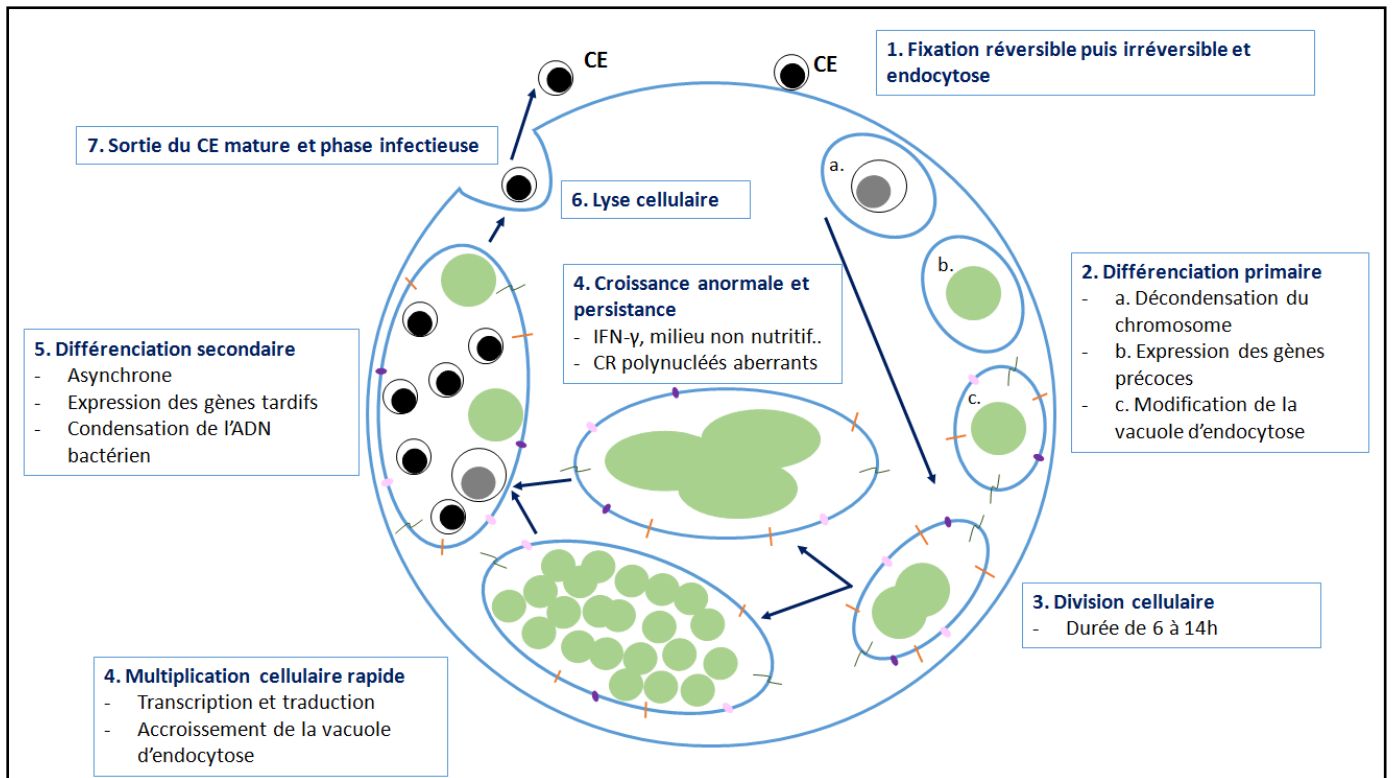


Figure 3 : Cycle de développement des *Chlamydia*, d'après (AbdelRahman and Belland, 2005)

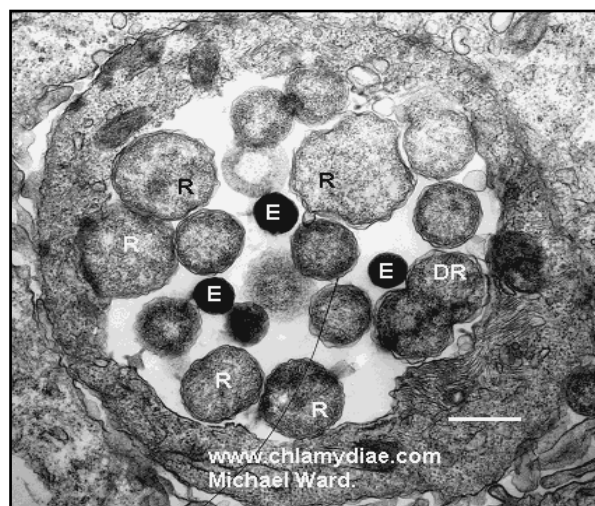


Figure 4 : Corps élémentaire et corps réticulé dans une inclusion immature de *C.trachomatis*

E : corps élémentaires ; R : corps réticulé ; DR : corps réticulé en division, adapté de Ward, 1988

2.2. *Vie intracellulaire*

a. Echappement à la phagocytose

La vacuole contenant la bactérie phagocytée échappe à la fusion avec le lysosome. Deux mécanismes pourraient expliquer ce phénomène : une phase de fusion plus tardive avec le lysosome due à des propriétés intrinsèques du CE, et une modification active des capacités de liaison de la vacuole (Scidmore *et al.*, 2003). La vacuole de phagocytose peut cependant fusionner avec les vacuoles d'exocytose contenant des lipides nécessaires à son développement (Elwell and Engel, 2012; Hackstadt *et al.*, 1995; Heuer *et al.*, 2009).

b. Persistance intracellulaire

Les *Chlamydia* peuvent aussi persister de façon chronique à l'intérieur de la cellule. Le système immunitaire ne peut alors pas les atteindre et donc les éliminer. Différents mécanismes semblent déclencher cette persistance : action de l'IFN- γ par la diminution de tryptophane dans le milieu (Pantoja *et al.*, 2001; Wyrick and Richmond, 1989), carence en fer (Raulston, 1997), infection par les phages (Hsia *et al.*, 2000), co-infection avec les virus (Borel *et al.*, 2010) ou un modèle d'infection persistante (Kutlin *et al.*, 2001), dont les conséquences pourraient être une carence en glucose et en acides aminés dans le milieu, ce qui provoque aussi la formation de CR persistants (Harper *et al.*, 2000). L'exposition à certains antibiotiques provoque aussi la formation de CR persistants : c'est le cas lors de l'exposition de *C. trachomatis* à l'orofloxacine et la ciprofloxacine, pouvant expliquer les échecs de traitements observés *in vivo* (Dreeses-Werringloer *et al.*, 2000). Une exposition *in vitro* de cellules infectées avec *C. psittaci* à de la pénicilline inhibe la formation de CE infectant à partir de CR, et résulte en la formation de CR persistants. Le cycle de développement de la bactérie reprend quelques heures après le retrait de la pénicilline du milieu de culture, indiquant la viabilité des particules observées (Matsumoto and Manire, 1970).

Chlamydia psittaci, le sujet de l'étude, a pour réservoir principal les oiseaux mais peut se transmettre aux mammifères, dont l'homme. La partie suivante vise à présenter les caractéristiques biologiques et épidémiologiques propres de cette espèce.

II. *Chlamydia psittaci*

1. Généralités

Chez *Chlamydia psittaci*, le CE mesure 350 nm de diamètre et le CR mesure 850 nm de diamètre (Stewardson and Grayson, 2010). Jusqu'ici, huit serovars de *C. psittaci* ont été décrits, à partir des variations de la porine OmpA, chaque serovar infectant

préférentiellement certaines familles d'oiseaux ou de mammifères (tableau 1). Les différences entre les séquences de la protéine OmpA correspondent aux variations identifiées dans la séquence du gène correspondant, sérotypes et génotypes sont donc équivalents (Vanrompay *et al.*, 1997a). Récemment, d'autres *serovars* ont été identifiés et les progrès en matière de biologie moléculaire permettent d'utiliser la méthode MLST (Multiple Locus Sequence Typing) pour obtenir les différents génotypes de *C. psittaci* (Knittler and Sachse, 2015).

Serovar	Genotype	Hôte principal : exemples	Infection humaine documentée
A	A	Psittaciformes : perruche ondulée, calopsitte, perroquets	Oui
B	B	Columbiformes : pigeons, tourterelle	Oui
C	C	Anseriformes : canards, oies, cygnes	Oui
D	D	Galliformes : dinde, faisant, poulet	Oui
E	E	Struthioniformes : autruche, pigeon, canard	Oui
F	F	Isolés d'un seul perroquet et dinde	Oui
WC		Bovins	
M56	H	Rongeurs	
	E/B	Canards	Oui

Tableau 1 : Hôtes principaux des différents *serovars* de *Chlamydia psittaci* (Stewardson and Grayson, 2010)

2. Pathogénie

L'infection à *Chlamydia psittaci* est susceptible de provoquer une maladie chez les oiseaux, appelée chlamyidiose aviaire, ornithose ou encore psittacose. Ce dernier terme est plutôt réservé à la maladie se déclarant chez l'homme. Chez ce dernier, assez peu de données sont disponibles concernant la physiopathologie de la maladie. En revanche, des études ont été réalisées chez les bovins, qui représentent un bon modèle (*cf* encart ci-dessous). C'est pourquoi, dans ce paragraphe, nous nous référerons souvent aux résultats obtenus chez le veau pour aborder les données humaines.

Le poumon des bovins comme modèle

Le modèle bovin est intéressant pour plusieurs raisons : le génome bovin est plus proche de celui des hommes que celui des souris (Elsik *et al.*, 2009), et certains composants du système

immunitaire des bovins sont plus proches de celui des hommes que celui des souris : c'est le cas par exemple de l'interleukine-8 (IL-8), dont le gène est absent chez les souris et présent chez les bovins (Hein and Griebel, 2003). Enfin la forte compartimentalisation du poumon des bovins, avec une unique bronchiole pour une alvéole en font un bon support d'étude des lésions pulmonaires.

2.1. Voie d'entrée

a. Chez les oiseaux

Chez les oiseaux, la principale voie d'entrée est la voie respiratoire à partir d'aérosols, la voie orale par ingestion de fèces infectées est moins fréquente (Page, 1959).

b. Chez l'homme

Chez l'homme, l'infection se fait principalement par des bactéries présentes dans des particules en aérosols. La principale voie d'entrée est l'appareil respiratoire. Les bactéries pénètrent préférentiellement dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, mais semblent capables d'infecter plusieurs types de cellules (macrophages, cellules épithéliales, cellules dendritiques, fibroblastes...) (Knittler and Sachse, 2015).

Les mécanismes de reconnaissance et d'attachement à la cellule hôte sont encore peu connus. Certaines études suggèrent une interaction électrostatique entre les Glyco-Amino-Glycane (GAG) de la cellule hôte et la bactérie. L'inhibition de la phagocytose en présence d'héparine suggère une phase d'attachement dans la phagocytose de la bactérie (Gutierrez-Martin *et al.*, 1997).

2.2. Dissémination

a. Chez les oiseaux

La bactérie est rapidement disséminée dans les poumons, les sacs aériens, le sac péricardique et dans le mésentère. Elle peut être isolée à partir de ces organes 4 heures après l'infection (Pospicshil *et al.*, 2010).

b. Chez l'homme

En 2012, une équipe étudie les effets de *Chlamydia psittaci* sur le poumon des veaux (Reinhold *et al.*, 2012). Chez les bovins, l'infection est localisée aux sites d'inoculation avec une dissémination de proche en proche. La dissémination générale est cependant possible,

et des atteintes multi-organes ont été rapportées chez l'homme. Des atteintes cardiaques, encéphaliques, hématologiques, gastro-intestinale, rénales et musculaires sont en effet rapportées (Crosse, 1990; Ramanathan and Waidyasekara, 2015).

2.3. Temps d'incubation

a. Chez les oiseaux

La période d'incubation peut durer 3 jours à plusieurs semaines (Andersen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2011).

b. Chez l'homme

Chez les bovins (Reinhold *et al.*, 2012), la période d'incubation est de 2-3 jours, et l'intensité des symptômes est variable selon la dose infectieuse. La période d'incubation chez l'homme est de 5 à 14 jours (Smith *et al.*, 2011) mais peut aller jusqu'à 28 jours (Crosse, 1990).

2.4. Réponse immunitaire

☞ L'immunité anti-bactérienne

L'entrée des bactéries dans l'organisme et le franchissement des barrières mécaniques et chimiques déclenchent une réaction inflammatoire, propre à la réponse immunitaire innée. Le complément est activé et permet le recrutement des Polynucléaires Neutrophiles (GNN) *via* les anaphylatoxines. Ces GNN détruisent les bactéries extracellulaires, mais n'ont aucune action sur les bactéries intracellulaires strictes, et les enzymes libérées par dégranulation peuvent engendrer des dommages tissulaires. Les GNN dégénérés s'accumulent et forment du pus.

Le profil de la réponse immunitaire adaptative lors de l'infection par une bactérie intracellulaire est généralement de type Th1. Suite à la reconnaissance de PAMPs de type 1 (issus de micro-organismes intracellulaires), les cellules présentatrices d'antigènes sécrètent de l'IL-12 et de l'INF γ , induisant la différenciation des LT CD4 en LT auxiliaires de type 1 (Th1). Ces Th1, *via* la sécrétion d'INF γ notamment, vont permettre (i) la mise en place d'une réponse à médiation cellulaire par l'activation des LT CD8 en LT cytotoxiques (LTc), capables de tuer directement les cellules hôtes infectées (ii) l'activation des plasmocytes sécréteurs d'IgG2a, anticorps spécialisés dans l'activation du Complément et l'ADCC (iii) l'augmentation de l'activité bactéricide des macrophages et de leur production de cytokines pro-inflammatoires.

a. Type de réponse immunitaire

La cytologie du fluide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) chez les veaux infectés à différentes doses de *C. psittaci* montre **un recrutement particulièrement important de Granulocytes Neutrophiles (GNN)**, ainsi que de macrophages et lymphocytes (Reinhold *et al.*, 2012).

Un dosage des eicosanoides dans le LBA de veaux inoculés permet de mettre en évidence une réponse inflammatoire importante et dose-dépendante.

Des études basées sur d'autres espèces de *Chlamydiaceae* identifient différents récepteurs cellulaires intervenant dans la réponse immunitaire. Ainsi, la protéine membranaire TLR-3 (Toll-Like Receptor-3) est activée en présence de *C. muridarum* et activerait à son tour l'interféron β (IFN- β) ainsi que d'autres cytokines et chimiokines. Les TLR-2, 1 et 6 sont aussi des récepteurs permettant l'activation de réactions en cascades, faisant intervenir entre autres l'interleukine 6 (IL-6), IL-8, TNF- α et IL-1 β (Bas *et al.*, 2008; Derbigny *et al.*, 2012).

b. Cinétique de la réponse immunitaire

La réponse innée intervient rapidement, et des GNN et macrophages sont visibles dans la cytologie du liquide de Lavage Broncho Alvéolaire (LBA) dès 48 à 72h post infection (p.i)(Reinhold *et al.*, 2012).

Des anticorps circulants sont détectés 7 jours p.i. dans le sérum et le liquide de LBA de veaux inoculés avec 10^8 UFC. Aucun anticorps n'est décelé chez les veaux inoculés avec une dose inférieure même à 11 jours p.i. (Reinhold *et al.*, 2012).

c. Persistance du pathogène

La quantité d'antigènes de *C. psittaci* décelable par PCR dans le fluide de LBA varie en fonction de la dose infectieuse chez le veau (Reinhold *et al.*, 2012). Elle est maximale 3 jours post-infection (p.i.), diminuée 7 jours p.i. et quasi nulle 30 jours p.i.

d. Facteur de virulence

La virulence des souches de *C. psittaci* dépendrait de leur capacité à stimuler le système immunitaire de l'hôte. In vivo, les souches virulentes activent peu les macrophages. Cette absence d'activation provoque un afflux de GNN, corrélé à une évolution aiguë et grave des symptômes chez les souris (Miyairi *et al.*, 2011). Les GNN, peu efficaces pour éliminer les bactéries intracellulaires, peuvent cependant libérer, entre autres, des protéases délétères pour le tissu pulmonaire.

Dans des cas de psittacose chez l'homme, différents génotypes ont été identifiés. Si le génotype A, porté principalement par les psittacidés, semble plus fréquent, presque tous les génotypes ont pu aussi être identifiés : B,C (Heddema *et al.*, 2006a), D, F et E/B (Geens *et al.*, 2005) et E (Verminnen *et al.*, 2008). Une virulence plus forte du génotype A, particulièrement la souche 6BC, pourrait expliquer une fréquence plus élevée de ce génotype dans les cas de zoonose (Read *et al.*, 2013). Le génotype A est de plus impliqué dans les formes cliniques les plus graves (Gaede *et al.*, 2008). En revanche, le génotype E/B semble présenter une virulence plus atténuée (Harkinezhad *et al.*, 2007).

3. Diagnostic

3.1. Signes cliniques

a. Chez les oiseaux

Le plus souvent, le portage est asymptomatique chez les oiseaux. La maladie peut se déclarer suite à un stress (changement d'environnement, début de la saison de reproduction, baisse des températures, etc...). La gravité est fonction de la susceptibilité individuelle (fonction de l'âge et du statut immunitaire), de la virulence de la souche et de la dose infectieuse.

Les signes cliniques de chlamydie aviaire ne sont pas ou peu spécifiques : léthargie, anorexie, plumage ébouriffé, rhinite, sinusite, conjonctivite, dyspnée, diarrhée et excrétion d'urates jaunes-verts. Dans quelques rares cas, des signes nerveux peuvent être observés : convulsions, trémulations, port de tête penchée, parésie des postérieurs. Des animaux sévèrement atteints peuvent être émaciés, anorexiques et/ou déshydratés, ces signes cliniques pouvant évoluer vers la mort de l'animal (Flammer, 1997; Smith *et al.*, 2011).

Un portage chronique est possible. Lors de cas d'infections à répétition d'un même individu, il est difficile de savoir si c'est un portage chronique qui est en cause, ou une réinfection par des espèces ou génotypes semblables (AbdelRahman and Belland, 2005). Comme décrit précédemment (*cf* I.2.1.b) les chlamydiae peuvent persister dans certaines conditions environnementales. Cet état de vie ralentie est réversible *in-vitro*, lorsque les facteurs déclenchant sont retirés du milieu. De nombreuses études décrivent la persistance de chlamydia *in-vitro*, mais peu d'études cliniques en mesurent l'impact *in-vivo*. Des cas de portage chronique de *C. psittaci* chez des psittacidés ont été suspectés dans une étude de 1933, mais la distinction entre portage asymptomatique et chronique n'est pas claire (Meyer and Eddie, 1933). Une étude de 1996 décrit un portage chronique de *C. psittaci* dans la couche subépithéliale du tractus génital de brebis, 1 an après avortement ou mise bas d'agneaux chétifs dus à *C. psittaci*. Dans ce cas, les tractus génitaux présentent une fibrose chronique (Papp and Shewen, 1996).

b. Chez l'homme

Les symptômes les plus fréquents lors d'une infection à *C. psittaci* sont une hyperthermie, des frissons, maux de tête, malaise et une myalgie, une toux non excrétoire souvent accompagnée de dyspnée.

Les symptômes varient en intensité selon la dose infectieuse et selon la sensibilité de l'hôte. Dans un modèle bovin, les symptômes respiratoires sont de faible intensité après inoculation de 10^6 Unités Formant Colonies (UFC), d'intensité modérée après inoculation de 10^{7-8} UFC, et d'intensité sévère après inoculation de 10^9 UFC (Ostermann *et al.*, 2013; Reinhold *et al.*, 2012).

De façon plus occasionnelle, l'infection est décrite comme pouvant toucher d'autres organes et provoquer une endocardite, myocardite, hépatite, arthrite, kérato-conjonctivite, encéphalite et lymphome oculaire annexe (Zucca and Bertoni, 2006).

c. Chez d'autres mammifères

Les *Chlamydia* présentent une spécificité d'hôte importante, mais certaines espèces, dont *Chlamydia psittaci*, peuvent infecter d'autres hôtes. *C. psittaci* a ainsi été identifiée chez des bovins, brebis, chevaux, chats, chèvres, truies et rats de laboratoire. Le Tableau 2 liste les mammifères non humains chez qui *C. psittaci* a été identifié, ainsi que les symptômes associés. Notons de plus un développement de symptômes cliniques par inoculation expérimentale de *C. psittaci* chez des veaux (Reinhold *et al.*, 2012).

Dans certains cas, une co-infection a été observée avec *Trypanosoma equiperdum* (Henning *et al.*, 2008), avec d'autres espèces de *Chlamydia* (Kauffold *et al.*, 2006), tel que *C. abortus* ou *C. pecorum* (Lenzko *et al.*, 2011), ou avec *Clostridium botulinum* type C (Docherty *et al.*, 2012).

Espèce hôte	Symptômes	Lésions	Echantillon et analyse	Organisme identifié	Référence
Bovins laitiers en début de lactation (100 premiers jours)	Aucun : étude de prévalence randomisée. Etude de facteurs de risque au niveau du troupeau.	Non observées	PCR 23s puis PCR <i>ompA</i> , sur écouvillon vaginal	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Kemmerling <i>et al.</i> , 2009)
Bovins	Atteinte respiratoire haute	Non observées	PCR sur échantillons conjonctivaux	<i>Chlamydia abortus</i> ou <i>C. psittaci</i>	(Twomey <i>et al.</i> , 2006)
	Suspensions de Chlamydiose	Non observées	PCR <i>ompA</i> sur écouvillon et échantillon fécal	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Pantchev <i>et al.</i> , 2010)
	Aucun	Non observées	PCR <i>omp1</i> sur sperme et séquençage, ELISA sur serum	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Kauffold <i>et al.</i> , 2007)
	Aucun : étude de prévalence chez des taureaux en centre de reproduction.	Non observées	PCR 16s sur sperme frais et congelé	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Teankum <i>et al.</i> , 2007)
Brebis	Avortement 3 semaines avant termes ou mise-bas d'agneaux chétifs et infectés	Fibrose du tractus génital 1 an après avortement	Immunohistochimie et PCR (<i>ompA</i>) sur échantillon de tissus vaginale, utérin et de l'oviducte. ELISA sur écouvillon vaginale ante-mortem.	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Papp and Shewen, 1996)
	Aucun : étude de prévalence sur animaux apparemment sains	Non observées	PCR (<i>ompA</i>) sur écouvillon vaginale ou rectal ou sur placenta, et ELISA sur serum	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Lenzko <i>et al.</i> , 2011)
Chat	Suspensions de Chlamydiose	Non observées	PCR <i>ompA</i> sur écouvillon et échantillon fécal	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Pantchev <i>et al.</i> , 2010)

Chevaux	RAO (Recurrent Airway Obstruction) ou absence de symptômes (groupe témoin))	Bronchiolite avec différents degrés de sévérité.	IFD sur coupes de poumon, PCR <i>ompA</i> sur tissu pulmonaire et séquençage	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Theegarten <i>et al.</i> , 2008)
	Avortements	Absence de lésions ou placentite	Sérologie, IFD et PCR <i>ompA</i> sur placenta et séquençage	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Szeredi <i>et al.</i> , 2005)
Chèvre	Suspensions de Chlamydiose	Non observées	PCR <i>ompA</i> sur écouvillon et échantillon fécal	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Pantchev <i>et al.</i> , 2010)
Truies	Inflammation de l'utérus chez certaines truies, mais lien non prouvé avec infection à <i>Chlamydia</i> .	signes d'inflammation de l'oviducte	PCR (<i>ompA</i>) sur organes (différentes localisation de la trompe utérine)	<i>Chlamydophila psittaci</i>	(Kauffold <i>et al.</i> , 2006)
	Absence de signe clinique décrit		ELISA et électrophorèse sur serum; PCR (<i>ompA</i>) et séquençage après mise en culture à partir d'échantillons de poumons, intestins, de fèces et de fœtus.		(Vanrompay <i>et al.</i> , 2004)
	Suspensions de Chlamydiose	Non observées	PCR <i>ompA</i> sur écouvillon et échantillon fécal	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Pantchev <i>et al.</i> , 2010)
Rat de laboratoire	Mort subite	Selon les cas, absence de lésion macroscopique ou splénomégalie, hyperplasie folliculaire et serosité.	PCR sur tissus du cœur, foie, de la rate, des reins et sur sang.	<i>Chlamydia psittaci</i>	(Henning <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 2: Résumé des hôtes mammifères non humains de *C. psittaci*

3.2. Mise en évidence

a. Chez les oiseaux

Différentes techniques de laboratoire ont utilisées pour diagnostiquer une infection à *C. psittaci*, elles sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	Test ou procédure	Principe	Résultats	Avantages	Inconvénients	
Recherche d'anticorps	Agglutination CE	Titration des IgM surtout, présents principalement en phase aiguë de l'infection	Test positif quand titration des IgM >10 (>20 chez les grands oiseaux)	Kit commerciaux disponibles	Après traitement, les IgM peuvent persister (faible spécificité)	<ul style="list-style-type: none"> - La présence d'anticorps indique seulement que l'oiseau a été infecté à un moment dans sa vie, mais pas quand. - Risque de faux négatifs pendant la période de séroconversion et suite à la prise d'antibiotiques
	Immunofluorescence indirecte (IFI)	Détection des IgG principalement, à l'aide d'anticorps et techniques de fluorescence	Positif quand multiplication des anticorps par au moins 4 entre la phase aiguë et la phase de convalescence (2-4 semaines d'intervalle)		Possibilité de réaction croisée. La quantité d'IgG varie selon la réponse immunitaire	
	Réaction de fixation du complément (RFC)	Fixation du complément au complexe anticorps-antigène et mise en évidence par un système révélateur coloré		Meilleure sensibilité que le test d'agglutination	Des cas de faux négatifs décrits chez les perroquets, les jeunes gris du Gabon et les inséparables.	
	ELISA indirect *	Détection d'anticorps à l'aide d'anticorps et techniques enzymatiques		Kit commerciaux disponibles * ; Bonne sensibilité et spécificité si ELISA élaboré pour <i>C. psittaci</i> (conditions de laboratoire)	Réactions croisées possibles *	
Recherche d'antigènes	ELISA direct*	Détection d'antigènes à l'aide d'anticorps et techniques enzymatiques			Plusieurs kits commerciaux disponibles*	Réactions croisées avec d'autres bactéries Gram - *

	Immunofluorescence directe (IFD)	Fixation d'anticorps et techniques de fluorescence			Réactions croisées possibles	
Recherche d'ADN	PCR	Amplification de séquences cibles d'ADN dans l'échantillon	Test positif quand une bande de la taille de la séquence cible apparaît lors de la migration sur gel	Très bonne sensibilité, seuil de détection bas. Très bonne spécificité. Rapide et peu onéreux.	Risques de contamination, pas de test standardisé ni de kit commercial disponible, absence d'amorces "officielles"	
	Hybridation <i>in-situ</i>	Hybridation d'une sonde marquée si la séquence cible est présente dans l'échantillon ; réalisée sur coupe de tissus ou sur cellules fixées.				
Séquençage d'ADN	Méthode de Sanger	Séquençage de zones plus ou moins longues du génome		Permet d'identifier les espèces précises et de génotyper les souches.		
Recherche de lésions macroscopiques	Autopsie	Eventuellement aérosaculite, hépatome et/ou splénomégalie			Pas de lésion macroscopique pathognomonique Faible sensibilité et spécificité	

Recherche de lésions microscopiques	Histologie	MET ou techniques de mises en évidences d'antigènes ou d'ADN <i>in situ</i> (cf ci-dessus).	Test positif si la bactérie est observée ou mise en évidence		Possibilité de réactions croisées (lors de recherches d'antigènes) Faible sensibilité	
Culture bactériologique	Culture cellulaire, œuf embryonné	Multiplication de la bactérie si celle-ci est présente dans l'échantillon initial (échantillon de foie, rate; écouvillons choanaux, cloacaux, conjonctivaux)	A compléter d'autres tests pour la mise en évidence de <i>Chlamydia psittaci</i>	Etape préalable permettant d'améliorer la sensibilité d'autres tests	- seulement en laboratoire équipé pour la réception et la manipulation de <i>Chlamydia</i> vivantes - Si prélèvement cloacal : prélèvement quotidien sur 3 à 5 jours car excrétion intermittente.	

Tableau 3 : Récapitulatif des moyens diagnostiques utilisés pour mettre en évidence une infection à *C. psittaci* chez les oiseaux (Longbottom and Coulter, 2003; Maxted *et al.*, 2017)

* Les tests ELISA disponibles ayant été élaborés pour tester la présence de *Chlamydia trachomatis* chez l'homme, leur spécificité et sensibilité pour détecter les anticorps contre les autre *Chlamydiaceae* n'est pas connue. Les résultats de ces tests sont donc à utiliser avec précaution, en ne perdant pas de vue la clinique de l'animal, et sont éventuellement à confirmer par d'autres moyens diagnostics.

Lors d'une suspicion clinique, un cas peut être **confirmé** par la mise en évidence du pathogène (ou de ses antigènes) à partir d'un échantillon prélevé sur l'animal ou/et par la mise en évidence d'une séroconversion (RFC ou IFI) à 2 à 4 semaines d'intervalle.

Une chlamydie est **probable** lorsqu'un unique titre en anticorps est élevé sur un serum prélevé après le début des symptômes, ou lorsque des antigènes de *Chlamydiaceae* sont mis en évidence par ELISA, PCR ou immunofluorescence dans les fèces, dans un écouvillon cloacal, dans des sécrétions oculaires ou de l'appareil respiratoire (Smith *et al.*, 2011).

Les chiffres des études spontanées de prévalence de *C. psittaci* tendent à montrer que la psittacose serait sous diagnostiquée (Beeckman and Vanrompay, 2009; Spoorenberg *et al.*, 2016; Vanrompay *et al.*, 1997b). Une des raisons principale est la culture fastidieuse des chlamydiae et la difficulté à établir un diagnostic de certitude. Aujourd'hui, de nombreux laboratoires offrent une possibilité de détection de *C. psittaci* par PCR. La sensibilité et la spécificité de cette méthode est proche de 100%, mais peut varier selon les amorces et les méthodes de prélèvement. Il n'existe pas aujourd'hui d'amorces faisant consensus permettant d'harmoniser les procédures, mais divers équipes travaillant sur les *Chlamydia* travaillent sur la classification bactérienne (Salamin *et al.*, 2015) et mettent au point des amorces permettant un diagnostic d'espèce, pour *C. psittaci* (Opota *et al.*, 2015) et pour d'autres *Chlamydiales* (Casson *et al.*, 2008; Goy *et al.*, 2009; Jaton *et al.*, 2006; Welti *et al.*, 2003), famille (Everett *et al.*, 1999b) ou ordre (Everett *et al.*, 1999b; Lienard *et al.*, 2011). Le choix des amorces lors du choix de la PCR est crucial : selon le niveau choisi, un séquençage sera nécessaire ou non pour identifier une espèce précise.

Les échantillons peuvent être un écouvillon oculaire, cloacal, choanal ou sur sang et une combinaison de plusieurs écouvillons permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la méthode. Les échantillons cloacaux sont à prélever sur 3 à 5 jours consécutifs, l'excrétion de *C. psittaci* étant intermittente.

b. Chez l'homme

Chez l'homme, un **cas est confirmé** si l'individu présente les signes cliniques compatibles avec une psittacose et que la présence de *Chlamydia psittaci* est diagnostiquée directement à partir d'un échantillon respiratoire (fluide pleural, expectoration, tissu de biopsie) et indirectement par l'apparition d'une séroconversion (RFC ou IFI).

Un **cas est probable** si l'individu présente les signes cliniques compatibles avec une psittacose et si le titre en anticorps (IgM) est supérieur ou égal à 32 dans au moins un sérum prélevé après le début des symptômes ou si de l'ADN de *C. psittaci* est mis en évidence dans un échantillon respiratoire (fluide pleurale, expectoration, tissu de biopsie).

En pratique, la méthode la plus utilisée par les laboratoires est le titrage en anticorps à 2-4 semaines d'intervalles, en phase aiguë puis en phase de convalescence en utilisant l'IFI. Cette méthode est plus sensible et spécifique que la RFC et le diagnostic est établi si un résultat positif à cette analyse est combiné à des signes cliniques de la maladie (Smith *et al.*, 2011). Cependant, des réactions croisées restent possibles avec les méthodes sérologiques et, de la même façon que pour les oiseaux, les techniques d'amplification d'ADN comme la PCR possèdent une meilleure sensibilité et spécificité. Cette technique permet de plus un résultat plus rapide (Beeckman and Vanrompay, 2009).

4. Données épidémiologiques

4.1. Réservoirs

De nombreuses espèces aviaires peuvent héberger *C. psittaci* de façon endémique et le plus souvent asymptomatique. La bactérie a été identifiée dans plus de 467 espèces aviaires, réparties dans 30 ordres. Des analyses sérologiques, antigéniques ou par isolation directe du pathogène montrent que l'ordre des Psittaciformes (Perroquets etc..) et les ordres des animaux aquatiques (Lariformes, Anatiformes, Sphenisciformes, Alciformes) sont les ordres parmi lesquels figurent le plus d'espèces porteuses de *C. psittaci* (Kaleta and Taday, 2003).

a. Réservoir domestique

De par le potentiel zoonotique de la bactérie, les espèces domestiques (ordre des Psittaciformes et ordre des Phasianiformes) sont particulièrement surveillées (Kaleta and Taday, 2003). Selon les études, le portage chez les Psittaciformes peut être de 19% (59/308) (Vanrompay *et al.*, 1997a), et la séroprévalence de 30% (Chu *et al.*, 2016). Contrairement à l'ordre des Psittaciformes, *C. psittaci* est peu identifiée dans l'ordre des Phasianiformes (5% des espèces). Certaines espèces non domestiques et tout de même en contact étroit avec les hommes sont surveillées de près. C'est le cas par exemple du pigeon domestique (*Columba livia domestica*), dont les individus sont présents en nombres élevés dans nos villes européennes. Selon les études et la technique diagnostique utilisée, le nombre d'échantillons à partir desquels on peut identifier *C. psittaci* chez les pigeons domestiques varie entre 2 et 42,3% (culture cellulaire) et entre 3,4 et 50% (PCR)(Magnino *et al.*, 2009).

b. Réservoir sauvage

Il existe peu de données sur la prévalence de *C. psittaci* chez les oiseaux sauvages. Les études se penchant sur la question présentent des chiffres variant de 2,9% (9/312) chez des passereaux en Suède (Olsen *et al.*, 1998) à 74% (29/39) chez des oiseaux de proie en

Allemagne (Schettler *et al.*, 2003). Chez les fulmars juvéniles des îles Féroé, la prévalence est de 10% (43/431) (Herrmann *et al.*, 2006).

La prévalence de *C. psittaci* chez les oiseaux recueillis en centre de faune sauvage varie de 0 à 26,2% (Tableau 4). Les études ciblant toutes les espèces trouvent une prévalence plus élevée chez les Columbiformes (ordre des pigeons domestiques et assimilés). En ciblant des types d'oiseaux particuliers, on trouve les prévalences les plus fortes chez les buses à queue rousse (*Buteo jamaicensis*) pour les rapaces et chez les fous de Bassan (*Morus bassanus*) pour les oiseaux marins. Les études récapitulées ci-dessous donnent des chiffres de prévalences basés sur la mise en évidence de la bactérie, par la présence d'antigènes ou d'ADN, et non par sérologie.

Localisation du centre	Prévalence	Echantillon	Analyse	Espèces ciblées (Ordres des oiseaux porteurs)	Référence
France	18,5% (36/195)	Ecouvillon cloacal	qPCR ciblant 23s	Oiseaux marins (Anseriformes, Charadriiformes, Suliformes)	(Aaziz <i>et al.</i> , 2015)
Belgique	26,2% (11/42)	Ecouvillons pharynx	Culture cellulaire et immunofluorescence directe	Toutes espèces (Charadriiformes, Columbiformes, Gruiformes Passeriformes, Strigiformes)	(Kalmar <i>et al.</i> , 2014)
Angleterre	11,6% (5/43)	Ecouvillon cloacal	Nested PCR ciblant <i>ompB</i>	Toutes espèces (Columbiformes)	(Sharples and Baines, 2009)
Croatie	0% (0/107)	Ecouvillon cloacal	Recherche directe d'antigènes avec kit commercial et Culture sur œuf embryonné	Toutes espèces	(Vlahović <i>et al.</i> , 2004)
Californie (E.U.)	10% (10/100)	Ecouvillon cloacal et serum	Immunofluorescence directe et culture sur œufs embryonnés et cellules de McCoy	Rapaces (Accipitridae, Strigidae, Cathartidae)	(Fowler <i>et al.</i> , 1990)

Tableau 4 : Prévalence de *C. psittaci* chez les oiseaux en centres de faunes sauvages

c. Réservoirs en élevage

Plusieurs cas de psittacose, sporadiques ou multiples, ont pour origine les élevages industriels de poules, dindons ou canards. La maladie concerne alors les différents acteurs de la filière ayant un contact plus ou moins direct avec l'animal, et différentes études visent à estimer la prévalence du portage de *C. psittaci* chez les oiseaux ou à identifier les sources de contamination. *Chlamydia psittaci* est un pathogène respiratoire particulièrement connu en élevage de dinde, et sa prévalence est élevée (Loock *et al.*, 2005). Une très forte séroprévalence (94%) est observée dans les élevages de dindes au moment de l'abattage en Belgique (94%, Loock *et al.*, 2005) et en Allemagne (81,3%, Hafez and Sting, 1997). D'autres études indiquent aussi la présence de la bactérie dans les élevages de canard (Newman *et al.*, 1992) et une forte prévalence dans les élevages de poulet (Gaede *et al.*, 2008). La forte prévalence se retrouve à différents points de la filière. Les infections ou co-infections à *C. psittaci* chez les dindes ont lieu plutôt entre 3 et 6 semaines puis entre 8 et 12 semaines d'âge (Loock *et al.*, 2005). Dans un élevage de 9000 dindons, les 20 femelles échantillonnées sont porteuses de *C. psittaci* de leur arrivée à 1 jour jusqu'à leur abattage à 15 semaines d'âge, indiquant une contamination potentielle à la couveuse (Verminnen *et al.*, 2008). Une étude belge conduite dans 2 abattoirs met en évidence *C. psittaci* par PCR et par culture sur 57% des lots de dinde et 85% des lots de poulets (Dickx *et al.*, 2010).

d. Répartition

La répartition de *C. psittaci* est supposée mondiale (Gartrell *et al.*, 2013). Le portage de la bactérie est identifié sur plusieurs continents : Asie (Wannaratana *et al.*, 2017), Europe (Olsen *et al.*, 1998), Océanie (Gartrell *et al.*, 2013) et Amérique du Sud (Raso *et al.*, 2010) et du Nord (Docherty *et al.*, 2012) et des anticorps ont pu être détecté chez des oiseaux migrateurs jusque dans le cercle polaire arctique (Hildes *et al.*, 1965).

4.2. Hôtes non aviaires

a. Mammifères non humains

Comme décrit précédemment (*cf.* I.3.1.c), différents mammifères peuvent aussi être infectés par *Chlamydia psittaci*, avec des prévalences variables. Une transmission par voie sexuelle peut être suspectée, comme c'est le cas lors de l'identification de *C. psittaci* dans le sperme de taureaux (Teankum *et al.*, 2007), mais cette voie n'a pas encore été prouvée. Le rôle de mammifères en tant que réservoir de *C. psittaci* reste à prouver. Une étude récente décrit cependant plusieurs cas de psittacose humaine ayant comme origine probable un placenta de jument infecté (Chan *et al.*, 2017). Ce serait la première description de transmission zoonotique d'origine non aviaire.

Chaque *serovar* de *C. psittaci* infecte préférentiellement des espèces ou ordre différentes (cf I.1). Si les génotypes sont associés à des ordres d'oiseaux spécifiques, il semblerait qu'un portage par d'autres espèces n'est pas exclu. Ainsi, le génotype C, plus souvent trouvé chez les *Anseriformes* (canards...), a aussi été retrouvé chez des bovins, ovins et porcins (Song *et al.*, 2009). Cependant, rares sont les études qui génotypent les souches de *C. psittaci* trouvées sur les mammifères lors de cas sporadiques. Cette information fournit cependant une donnée épidémiologique intéressante (Heddema *et al.*, 2006b).

b. Réservoir humain

L'homme a été longtemps suspecté d'être seulement un hôte secondaire de *C. psittaci*, mais il semblerait qu'il puisse transmettre la bactérie (McGuigan *et al.*, 2012; Wallensten *et al.*, 2014)

4.3. Modes de transmission

a. Transmission entre oiseaux

Chez les oiseaux, **la principale voie de transmission est via les aérosols**, à partir de fientes d'oiseaux porteurs (Page, 1959). La bactérie peut aussi être excrétée au niveau des voies respiratoires, des sécrétions oculaires, dans la salive et dans les urines. L'excrétion peut être exacerbée en période de stress, de refroidissement, de reproduction, lors du nourrissage des oisillons ou lors de manipulation par les hommes. L'excrétion de *C. psittaci* est intermittente (Docherty *et al.*, 2012).

Chez les oiseaux, la transmission peut se faire des parents aux jeunes lors du nourrissage (Flammer, 1997; Wittenbrink *et al.*, 1993) ou de façon verticale. La transmission dans l'œuf de *C. psittaci* a été prouvée chez le poulet (Wittenbrink *et al.*, 1993), le canard, la mouette, et les psittacidés. L'importance épidémiologique de cette voie de transmission n'est cependant pas claire, les œufs infectés n'éclosent que rarement (Shewen, 1980). Un portage et une possible transmission de *C. psittaci* par les arthropodes (poux et acariens) parasites d'oiseaux ont aussi été observés (Eddie *et al.*, 1962).

b. Transmission à l'homme

Chez l'homme, les modes de transmission sont similaires, c'est-à-dire une transmission de la bactérie par les aérosols de fèces contaminés ou par les sécrétions respiratoires d'un oiseau infecté (Maxted *et al.*, 2017). De par la transmission de la bactérie *via* les aérosols, des essais de création d'arme biologique ont été réalisés au début du 20^{ème} siècle, ce qui lui a valu d'être classée en tant qu'agent de bioterrorisme par le CDC (Center for Disease Control). La transmission bouche à bec ou en manipulant des plumes d'oiseaux

infectés est aussi possible. La transmission d'homme à homme est possible et fortement suspectée lors de 2 épidémies récentes en Ecosse en 2012 et en Suède en 2013 (McGuigan *et al.*, 2012; Wallensten *et al.*, 2014).

Le contact direct avec les oiseaux est la première source de contamination (Constantinescu and Scott, 2008; Harkinezhad *et al.*, 2009a; Stewardson and Grayson, 2010). La psittacose est donc une maladie auxquels certaines professions ou groupes de personnes sont particulièrement exposés : les propriétaires et les éleveurs d'oiseaux, les employés de parcs zoologiques, les employés en animalerie, le personnel travaillant avec la volaille, les vétérinaires et le personnel travaillant en centre de faune sauvage (Dickx *et al.*, 2010; Gosbell *et al.*, 1999; Harkinezhad *et al.*, 2007, 2009a; Heddema *et al.*, 2006b; Kalmar *et al.*, 2014; Maxted *et al.*, 2017; Petrovay and Balla, 2008; Raso *et al.*, 2010; Stewardson and Grayson, 2010; Vanrompay *et al.*, 2007; Wobeser and Brand, 1982). Cependant, dans certains cas de psittacose, un contact direct avec un oiseau n'est pas rapporté et l'exposition peut être indirecte (Branley *et al.*, 2014; Harkinezhad *et al.*, 2009a; Maxted *et al.*, 2017).

c. Cas de zoonoses

Les cas de portages de *C. psittaci* **asymptomatiques ou provoquant de légers symptômes** chez l'homme sont décrits lors d'études sur la prévalence de la bactérie dans différents milieux, que ce soit dans les filières d'élevages (Dickx *et al.*, 2010; Verminnen *et al.*, 2008), en parc zoologique (Raso *et al.*, 2010) ou chez des particuliers (Harkinezhad *et al.*, 2009a)

Les **cas présentant une clinique de psittacose** sont rapportés suite à une épidémie ou par déclaration ou description de cas isolés.

Les **épidémies** décrites dans la littérature ont eu lieu soit (i) suite à un contact direct avec les oiseaux sauvages et le nettoyage de nourrisseurs à oiseaux en Suède (Rehn *et al.*, 2013), (ii) suite à la capture et la consommation de jeunes fulmars dans les îles Féroé dans les années 1929-1930 (Herrmann *et al.*, 2006), (iii) dans le cadre d'une exposition d'oiseaux (Koene *et al.*, 2007) ou (iv) suite à une activité extérieure comme la tonte de la pelouse (Williams *et al.*, 1998), et donc un contact indirect avec les oiseaux.

Les **cas isolés** répertorient des cas variés de transmission : des propriétaires ou gardiens temporaires de perroquets (Cheng *et al.*, 2013; Constantinescu and Scott, 2008), des employés d'animalerie (Ramanathan and Waidyasekara, 2015), un vétérinaire (Gosbell *et al.*, 1999) ou encore des biologistes sur le terrain (Wobeser and Brand, 1982).

La psittacose étant une maladie à déclaration obligatoire dans un certain nombre de pays, le nombre de cas déclarés par an peut être communiqué par les autorités nationales de santé. Cependant, ces chiffres ne sont pas disponibles pour toutes les années et les prévalences obtenues laisse penser à une sous déclaration et un sous diagnostic de la maladie. En effet, aux Etats-Unis les derniers chiffres disponibles datent de la période 2006-2012, durant laquelle 58 cas sont déclarés (Maxted *et al.*, 2017) soit presque autant qu'en 2005 en Angleterre, où la DEFRA (Department of Environment, Food and Rural Affairs)

donnent le chiffre de 59 (Sharples and Baines, 2009). Un diagnostic tardif de la maladie et une absence d'information sur les symptômes, particulièrement pour les personnes à risque, peut s'avérer fatal pour la victime (Petrovay and Balla, 2008). La principale cause de ce sous-diagnostic serait l'absence de recherche systématique de la bactérie dans les analyses de routine en laboratoire (Constantinescu and Scott, 2008; Read *et al.*, 2013; Rehn *et al.*, 2013; Spooenberg *et al.*, 2016), de part notamment le travail fastidieux que représente la mise en évidence du pathogène et le diagnostic de certitude de la maladie, ou l'ignorance de la part des médecins et de la population de l'importance du portage de *C. psittaci*.

d. Persistance dans l'environnement

C. psittaci est peu résistant dans l'environnement mais peut persister au moins un mois dans les déjections et la litière sèche (Smith *et al.*, 2011). *C. psittaci* peut persister au moins 72h dans les fèces de pigeon à une température de 56°C tout en restant infectieux, ce qui peut avoir des conséquences en terme d'épidémiologie de la bactérie dans les pays tropicaux (Wannaratana *et al.*, 2017).

5. Moyens de lutte

5.1. Moyens de prévention

Afin d'éviter aux hommes de rentrer en contact avec des animaux porteurs, différentes mesures, explicitées par le National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV) peuvent être conseillées. Ces mesures reprennent des règles simples d'hygiène applicable de façon générale à toutes les maladies. Elles comprennent l'éducation de toute personne amenée à manipuler des oiseaux vis-à-vis des risques, du mode de transmission et des formes de maladie chez l'homme et les nombreuses mesures d'hygiène qui seraient optimales pour limiter la propagation et la transmission à partir d'un oiseau malade : protections (lunettes, masque, gants) lors du nettoyage des cages, mise en quarantaine de nouveaux oiseaux ou d'oiseaux malades, éviter de mélanger les oiseaux de différentes sources, testage régulier des oiseaux souvent exposés à l'homme, soins aux animaux malades en dernier dans une volière. Enfin, en ce qui concerne le commerce, il est conseillé de garder une trace écrite précise de toute transaction pendant un an, et de noter l'adresse et le nom de l'acheteur, afin de pouvoir le contacter facilement.

La désinfection de tout objet ou cage ayant été en contact avec l'oiseau porteur peut être réalisée avec des désinfectants classiques, tels qu'un ammonium quaternaire ou de la javel.

5.2. Prévention médicale

Il n'existe actuellement aucun vaccin animal ou humain contre *C. psittaci*, même si plusieurs pistes sont aujourd'hui explorées pour la création d'un vaccin commercialisable. La diversité des *serovars* et la variabilité des réponses individuelles à une infection rend la tâche particulièrement difficile (Flammer, 1997).

5.3. Traitements

a. Chez les oiseaux

Soins à apporter à l'oiseau malade

Le NASPHV a listé de nombreuses mesures permettant de prendre en charge correctement un oiseau atteint de chlamydie. Leurs recommandations comprennent un isolement de l'oiseau malade dans une cage propre, ainsi qu'un lavage intensif de sa cage d'origine. Un régime non enrichi en calcium (absence de coquilles d'huîtres ou de blocs de minéraux) pendant le traitement favorise une meilleure absorption des tétracyclines, et si l'oiseau nécessite un apport en calcium, celui-ci doit être espacé de 4 à 6h par rapport au traitement. De façon plus générale, toute situation de stress environnemental ou alimentaire doit être évitée durant la convalescence et le poids de l'oiseau doit être suivi régulièrement pour évaluer le maintien ou l'amélioration de l'état corporel.

Dose et molécule

Comme chez l'homme, **le traitement de première intention en cas d'infection à *C. psittaci* est la doxycycline**. La doxycycline a de nombreux avantages par rapport à la chlorotétracycline ou l'oxytétracycline, autres molécules de la famille des tétracyclines. Elle est en effet mieux absorbée par voie orale et donc nécessite une plus faible dose, présente une meilleure biodisponibilité, a un temps de demi-vie plus long, et une partie de son élimination ayant lieu par voie digestive, elle est une toxicité rénale plus faible que les autres molécules citées (Riond and Rivière, 1988).

Les antibiotiques agiraient sur le cycle de développement des *Chlamydia*, et auraient une action bactériostatique. Cette propriété justifie une durée de traitement longue, de 30 à 45 jours chez les oiseaux (Flammer, 1997).

Quelques espèces domestiques font l'objet d'études pharmaceutiques plus approfondies. Quelques traitements décrits dans la littérature sont rapportés ci-dessous.

Voie d'administration (molécule)	Espèce (référence bibliographique)	Dose	Précautions
Eau de boisson (Hyclate de doxycycline)	Calopsittes (<i>Nymphicus hollandicus</i>) (Virginia Powers <i>et al.</i> , 2000)	200 à 400 mg/L	Ne pas utiliser cette voie d'administration chez les perruches ondulées (pas de maintien de la concentration thérapeutique); Changer l'eau tous les jours
	Cacatoès de Goffin(Flammer <i>et al.</i> , 2001)	400 à 600 mg/L	
	Perroquet gris africain(Flammer <i>et al.</i> , 2001)	800 mg/L	
	Autres psittacidés	400 mg/L	
Voie orale (Monohydrate ou calcium en solution)	Calopsittes	25 à 35 mg/kg une fois par jour	En cas de régurgitation, utiliser une autre forme de traitement
	Perroquet du Sénégal	25 à 50 mg/kg	
	Perroquet d'Amazonie à front bleu et ailes oranges		
	Perroquet gris africain	25 mg/kg	
	Cacatoès de Goffin	25-30 mg/kg	
	Ara bleu et Ara vert		
	Autres Ara et Cacatoès		
Autres psittacidés	25-50 mg/kg		
Voie intramusculaire (Vibramycin, Vibrovenos®: non disponible en France)		75 à 100 mg/kg, tous les 5 à 7 jours pour les 4 premières semaines et ensuite tous les 5 jours pour le reste du traitement.	Cette formulation peut provoquer des irritations locales mais reste bien tolérée. Toute autre formulation est très irritante et est donc à éviter.

Voie sous cutanée (Oxytetracycline LA-200)	Cacatoès de Goffin, Aras bleu (autres espèces : dosage non testé)	75mg/kg tous 3 jours	Solution irritante au point d'injection. A utiliser si l'oiseau ne se nourrit pas ou pour stabiliser un oiseau sévèrement atteint. Prendre le relai avec une autre molécule et voie d'administration.
Mélange avec l'alimentation (Chlortetracycline)			L'aliment médicamenteux doit être la seule source d'alimentation pendant la durée du traitement. On doit d'abord s'assurer que l'animal mange les aliments proposés.

Tableau 5: Voies d'administration et posologie de différents antibiotiques pour le traitement de la chlamydie aviaire chez les espèces citées, d'après Smith *et al.*, 2011

Les **perruches ondulées** sont des oiseaux adaptés aux milieux arides. Elles peuvent vivre en buvant de faibles quantités d'eau si le goût de celle-ci ne leur plait pas. Pour une meilleure observance du traitement, il est donc recommandé d'ajouter la doxycycline à l'alimentation plutôt qu'à l'eau de boisson de cette espèce (Flammer *et al.*, 2003). Dans les aliments médicamenteux, la valeur énergétique de l'aliment proposé influence la pharmacocinétique de la molécule. Un aliment de faible valeur énergétique est consommé en plus grande quantité pour atteindre un apport énergétique suffisant, ce paramètre est donc à prendre en compte dans l'élaboration des mélanges. Un aliment humide de faible valeur énergétique (type « Mash ») peut mener à une intoxication à la doxycycline (Virginia Powers *et al.*, 2000). Des équipes ont donc élaborés des menus adaptés permettant d'atteindre la concentration plasmatique recommandée pour le traitement de la psittacose, soit $>1\mu\text{g/L}$ (Flammer, 1997).

👉 **Proposition de traitement pour les Perruches ondulées (*Melopsittacus undulatus*)** (Flammer *et al.*, 2003) **et Calopsittes** (Virginia Powers *et al.*, 2000)

1. Mélangez un volume de céréales concassées avec 3 volumes de graines de millet
 2. Pour 1kg de mélange céréales-millet, ajouter 5-6mL d'huile de tournesol, mélangez le tout.
 3. Ajouter 300 mg de doxycycline hyclate par kg du mélange précédent et mélangez.
- Cette recette doit être préparée quotidiennement, la stabilité de la doxycycline étant inconnue dans ce mélange.
- Ce traitement peut être suivi pendant 30 jours (Flammer *et al.*, 2003).

Toxicité des tétracyclines

Chez les mammifères, les tétracyclines peuvent provoquer des irritations gastro-intestinales, des atteintes hépatiques, une nécrose tubulaire rénale (rapportée chez les bovins et les chiens après une administration à forte dose et de longue durée), une coloration des dents en jaune et un ralentissement de la croissance fœtale (Riond and Rivière, 1988). Une allergie et de la photosensibilisation sont aussi rapportés. Une injection trop rapide en i.v. peut provoquer hypotension, bradychardie et perte de conscience (Rivière and Papich, 2009).

Chez les oiseaux, les signes de toxicité sont anorexie, léthargie et perte de poids (Virginia Powers *et al.*, 2000) .

Résumé pour le vétérinaire praticien

- La chlamydie aviaire est difficile à diagnostiquer, et doit être intégrée dans le diagnostic différentiel de façon quasi systématique. Elle doit être particulièrement suspectée en cas d'oiseaux vivant dans de mauvaises conditions sanitaires, en collectivité, ou en contact récent avec un autre oiseau.

- Le diagnostic de certitude ne peut être établi que par analyse de laboratoire. Il existe une multitude de techniques différentes, l'analyse la plus courante étant la PCR. La sensibilité de cette technique doit mener à une interprétation prudente des résultats (possibilité de contamination), et peut être intéressante couplée à une culture cellulaire, à une détection des anticorps ou à un séquençage.

- L'excrétion de chlamydia est intermittente, les prélèvements cloacaux doivent se faire sur 3-4 jours.

- Le traitement doit durer au moins 30 à 45 jours, du fait du mode de vie intracellulaire strict de la bactérie : les antibiotiques agissent sur les formes actives de la bactérie, et non pas sur les CE métaboliquement inactifs.

- Il n'y a pas de prévention médicale. La prévention passe en grande partie par l'éducation des propriétaires et les professionnels de la filière.

- La chlamydie aviaire est une maladie animale à déclaration obligatoire en France.

b. Chez l'homme

Traitement de première intention (Smith *et al.*, 2011):

Tétracycline pendant 10 à 14 jours après la chute de fièvre :

- Doxycycline 100 mg toutes les 12h
- Tétracycline hydrochloride 500 mg toutes les 6h

Pour les cas plus critiques, de la doxycycline hyclate i.v. à la dose de 4,4mg/kg/jour en deux injections, avec un maximum de 100 mg/dose, peut être administrée.

Les rechutes sont possibles, bien que peu fréquentes.

Les signes cliniques doivent s'améliorer après 1 à 2 jours de traitement.

Pronostic

Avant l'utilisation d'antibiotiques, le traitement d'infection à *Chlamydia* (*C. psittaci* et *C. trachomatis*) étaient associées à une mortalité de 20 à 40% (Wobeser and Brand, 1982). Avec les traitements actuels, le pronostic est généralement bon si la prise en charge de la maladie est faite rapidement. Une prise en charge tardive peut entraîner des complications et la mort du patient (Petrovay and Balla, 2008). Les commémoratifs ainsi que la connaissance de certains loisirs ou occupations professionnelles du patient sont des informations très importantes pour orienter le diagnostic à temps (Constantinescu and Scott, 2008; Ramanathan and Waidyasekara, 2015).

5.4. Cadre réglementaire français

Depuis 1973, la Convention de Washington restreint le commerce mondial des espèces animales sauvages. Toute importation illégale d'oiseaux représente, entre autres, un risque sanitaire.

En France, l'importation des psittacidés est réglementée par la directive européenne 2000/666/EC : l'oiseau doit être accompagné d'un certificat vétérinaire officiel et il la mise en quarantaine est obligatoire dans le pays d'origine (>21 jours) et dans le pays d'arrivée (>30 jours).

En France, la chlamydie aviaire est une maladie animale à déclaration obligatoire (MADO) sans application de mesures de police sanitaire, d'après le décret 2006-179 du 17 février 2006. Les critères de déclaration de la maladie ne sont pas spécifiés dans le décret. La psittacose humaine n'est pas une maladie à déclaration obligatoire (articles D3113-6 et D3113-6 du Code de la Santé Publique). La psittacose humaine figure en revanche sur la liste des maladies professionnelles (régime agricole : tableau 52 et régime général : tableau 87).

En conclusion, *Chlamydia psittaci* est une espèce de chlamydia à potentiel zoonotique présente dans de nombreux pays et identifiée chez un grand nombre d'espèces aviaires ainsi que quelques mammifères. Les cas de psittacose et de chlamydie sont sous diagnostiqués, et la prévalence de la maladie chez l'homme est probablement sous-évaluée. Ainsi, pour une bactérie dont la première description remonte à plus d'un siècle, plusieurs aspects épidémiologiques et pathologiques restent à élucider, comme le prouve la découverte récente de 2 espèces proches de *C. psittaci* (*C. avium* et *C. gallinaceae*) et, plus généralement, la pleine expansion de l'ordre des *Chlamydiales*. En effet, depuis 20 ans l'ordre des *Chlamydiales* s'enrichit de nouvelles familles avec la découverte de nouvelles chlamydiae (cf. I.1), désignées comme des « CLO », pour « *Chlamydia-Like Organisms* ». Le

terme « CLO » regroupe des bactéries partageant le cycle de réplication intracellulaire des membres bien connus de la famille des *Chlamydiaceae* et infestant une variété d'hôtes jusque là insoupçonnée pour les membres des *Chlamydiales*, allant des hommes aux organismes unicellulaires telles que les amibes, en passant par les mammifères terrestres, les poissons et les reptiles.

Les CLO regroupent actuellement 8 familles dont la famille des *Rhabdochlamydiaceae*, décrite dans la suite de ce travail.

La famille des *Rhabdochlymidiaceae* comprend actuellement un seul genre, *Rhabdochlamydia*, divisé en deux espèces : *Rhabdochlamydia porcellionis* et *Rhabdochlamydia crassificans*, et une espèce non classée en genre, *Renichlamydia lutjani* (Taylor-Brown *et al.*, 2015).

Nous avons vu précédemment que les oiseaux sont des porteurs avérés de *Chlamydia*, cependant peu de données existent sur le portage aviaire de CLO.

III. Famille des Rhabdochlamydiaceae

1. *Rhabdochlamydia porcellionis*

1.1. Hôte

R. porcellionis a été observé pour la première fois chez le cloporte rugueux (*Porcellio scaber*) (Kostanjsek *et al.*, 2004). Cette bactérie tient son nom de son hôte principal, *P. scaber*, chez qui une infection provoque des taches blanches sur l'hépatopancréas. Le portage de *R. porcellionis* peut être asymptomatique : l'infection par *R. porcellionis* n'est pas corrélée à une dysorexie ou anorexie des cloportes (Drobne *et al.*, 1999) et l'infection des hôtes en milieu naturel suggère une circulation asymptomatique de la bactérie chez une partie de la population.

1.2. Description morphologique

L'espèce *R. porcellionis* a été décrite et classée pour la première fois parmi l'ordre des *Chamydiales* en 2004 (Kostanjsek *et al.*, 2004).

Des inclusions bactériennes ont été observées sur des cellules hépatopancréatiques de *P.scaber* infectés. Au sein du cytoplasme de la cellule, dans des vacuoles d'endocytose, des bactéries à différents stades de développement sont présentes. Trois stades sont distinguables à la morphologie des inclusions (Figure 5): (i) les corps réticulés sphériques (jusque 1µm de diamètre), au contenu cytoplasmique granuleux après fission binaire, (ii) les corps élémentaires jeunes, sphériques, aussi appelé les corps intermédiaires (350-650 nm de

diamètre), et (iii) les corps élémentaires matures en forme de bâtonnets (paroi bactérienne composée de 5 couches, 250 à 700 nm de long et 100-150 nm de large, Figure 6). Ces formes bactériennes intracellulaires sont propres à l'ordre des *Chlamydiales*.

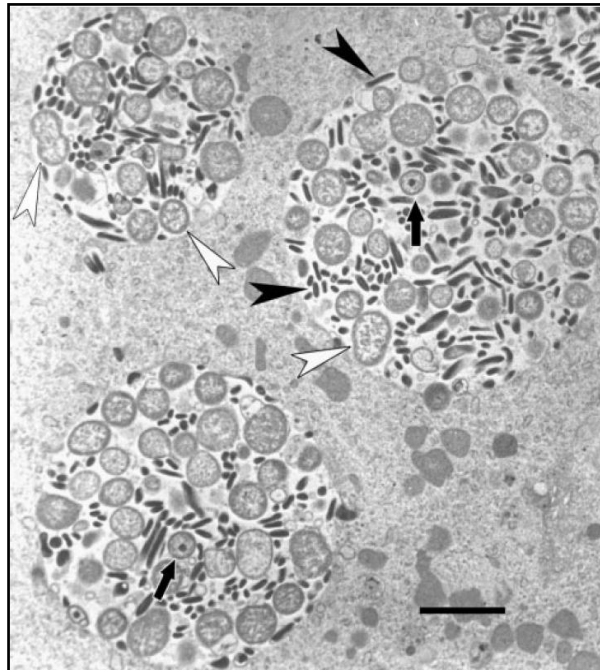


Figure 5: Observation en MET de cellules hépatopancréatiques de *P. scaber* (échelle = 2µm).

Les vacuoles renferment des bactéries intracellulaires présentant plusieurs formes : des corps élémentaires matures en forme de tige (pointes de flèches noires), des corps réticulés sphériques (pointes de flèche blanches) et des corps intermédiaires (flèches noires). (Kostanjsek *et al.*, 2004)

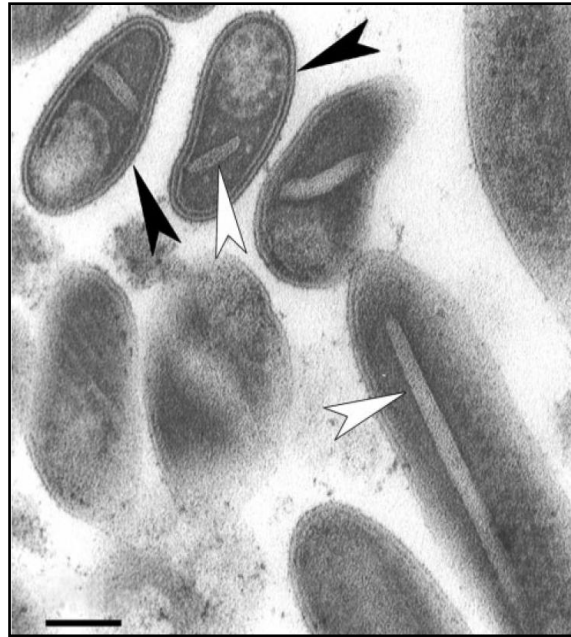


Figure 6 : Corps élémentaires matures en microscopie électronique à balayage (échelle : 10µm)

Les corps élémentaires matures sont entourés d'une paroi constituée de 5 couches (pointes de flèches noires) et présentent, dans leur cytoplasme dense aux électrons, des éléments oblongs et translucides (pointes de flèches blanches) (Kostanjsek *et al.*, 2004).

1.3. Séquençage

Suite à cette découverte, les bactéries observées ont été classifiées sur la base de leur homologie de séquence ADN 16s. La comparaison des séquences ribosomales obtenues avec les séquences ribosomales répertoriées grâce au logiciel BLAST montre 80% de similitude, ce qui concorde avec l'appartenance à l'ordre des *Chlamydiales* (Everett *et al.*, 1999a). Les séquences les plus semblables à celles obtenues présente 90,1 à 91,7% d'homologie, ce qui justifie la création d'une nouvelle espèce pour classer *Rhabdochlamydia porcellionis*.

2. *Rhabdochlamydia crassificans*

En 2000, des bactéries intracellulaires sont décrites dans les adipocytes de la blatte orientale (*Blatta orientalis*). Ces bactéries sont classées en tant que Rickettsies car (i) elles sont intracellulaires (ii) elles présentent trois stades de développement et (iii) sont sous formes de bâtonnet ou de disque. Cependant, la taille de la bactérie ou sa forme à différents stades de développement ne permettent pas de l'affilier à une espèce déjà établie de *Rickettsie* (Radek, 2000). En 2005, la comparaison entre les caractéristiques morphologiques visibles sur les photos obtenues lors de cette étude avec celles de *Rhabdochlamydia porcellionis* permet de classer l'espèce « *Rickettsia crassificans* » parmi l'ordre des

Chlamydiales (Corsaro *et al.*, 2007). Elle est maintenant officiellement considérée comme la deuxième espèce de la famille des *Rhabdochlamydiaceae* et a été dénommée *Rhabdochlamydia crassificans*.

2.1. Hôte

L'hôte primaire de *R. crassificans* semble être la blatte orientale.

Chez *Blatta orientalis*, l'infection par *R. crassificans* peut être asymptomatique, ou provoquer un gonflement abdominal chez les adultes, d'où le nom d'espèce du latin *crassus* « épais » et *facere* « faire ». Le gonflement abdominal peut être si important chez les cafards infectés que la mobilité des insectes est impactée, réduisant alors considérablement leur espérance de vie. Les larves, moins souvent touchées que les adultes, meurent rapidement lors d'une infection, limitant alors le développement de la colonie (Radek, 2000).

2.2. Description morphologique

Comme le montre la Figure 7, les critères morphologiques retenus pour la description de l'espèce sont (i) des CE dont la membrane est composée de 5 couches, et dont le cytoplasme présente une densité hétérogène, comprenant un pôle granuleux composé de granules ressemblant aux ribosomes (500 nm de long et 250 nm de large) (ii) les corps réticulés avec une membrane en 3 couches (900 nm de diamètre) (iii) les corps « aplatis » et (iv) les sphères condensées, pouvant se diviser par fission binaire comme les CR.

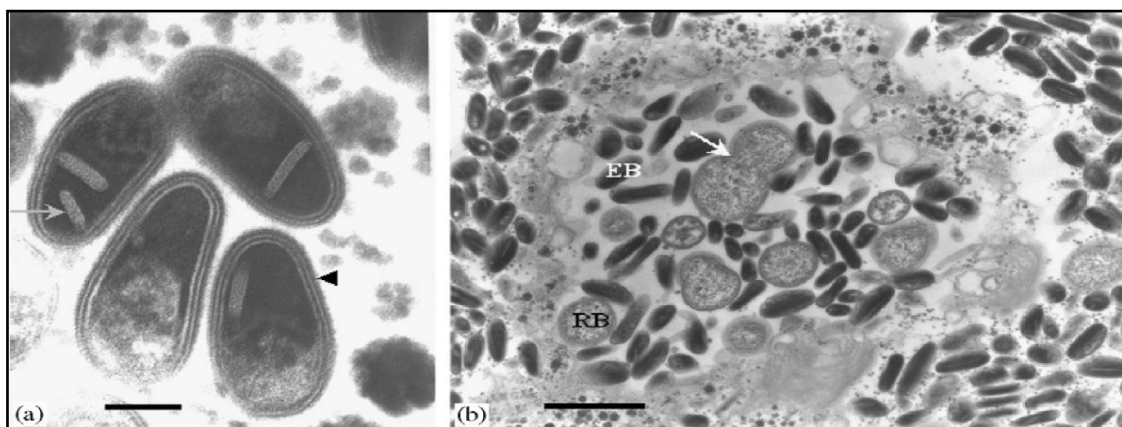


Figure 7 : Ultrastructure de *Rhabdochlamydia crassificans* (échelle (a) : 0,1 μ m ; (b) : 1 μ m : MET)

(a) Corps élémentaire en bâtonnet, entouré d'une membrane composée de 5 couches (pointe de flèche noire) et d'une ou deux figures oblongues translucides (flèche grise) dans le cytoplasme. (b) inclusions contenant des corps élémentaires (EB), des corps réticulés (RB) et des corps réticulés division (flèche blanche). D'après (Corsaro *et al.*, 2007).

2.3. Séquençage

La séquence du gène 16s de *R. crassificans* présente 82 à 87% d'homologie avec les autres membres de l'ordre des *Chlamydiales*, justifiant son appartenance à cet ordre (Everett *et al.*, 1999a). Cette séquence présente 97,1% de similitude avec *R. porcellionis*.

3. Pouvoir pathogène des *Rhabdochlamydiaceae*

3.1. Chez les animaux

Les deux espèces du genre *Rhabdochlamydia* décrites ci-dessus provoquent une pathologie chez leur hôte principal : des tâches blanches sur l'hépatopancréas du cloporte rugueux pour *R. porcellionis* et un gonflement abdominal chez la blatte orientale pour *R. crassificans*.

Des séquences 16s proches de la séquence 16s de *Rhabdochlamydia* ont aussi été identifiées dans le sperme d'un taureau en Suisse (Teankum *et al.*, 2007), sans que ce portage ne soit associé à une pathologie de la reproduction. De même, des déjections de chauve-souris en Finlande se sont révélées positives en PCR (Hokynar *et al.*, 2017), sans que le portage ne soit associé à des signes cliniques, mais pouvant être lié à la consommation d'insectes : cette étude identifie chez des insectes des séquences d'ADN de *Rhabdochlamydia* proches de celles identifiées chez les chauves souris. Les insectes piégés appartiennent en majeure partie à la famille des *Chironomidae*, qui constitue une partie du régime alimentaire des chauves-souris. Des séquences 16s proches de celles du genre *Rhabdochlamydia* ont aussi été isolées à partir de 4 échantillons d'avortons bovins différents en Angleterre. Dans ce cas la recherche d'autres agents abortifs était négative, et l'avortement possiblement dû à *Rhabdochlamydia* (Wheelhouse *et al.*, 2010).

3.2. Chez l'homme

Le pouvoir pathogène des *Rhabdochlamydia* chez l'Homme n'est pas élucidé. La présence de *Rhabdochlamydia* chez les personnes atteintes au niveau respiratoire est parfois accompagnée du portage d'autres agents pathogènes respiratoires mieux connus tels que *Mycoplasma pneumoniae* ou *Haemophilus influenza* (Haider *et al.*, 2008; Lamothe *et al.*, 2011; Niemi *et al.*, 2011). Selon les études, la liste des autres agents pathogènes du système respiratoire recherchés en parallèle des *Rhabdochlamydia* peut se restreindre à deux pathogènes majeurs, *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. Se pose alors la question de l'imputabilité des symptômes observés aux bactéries isolées. Les *Rhabdochlamydia* peuvent de plus être présentes chez des personnes saines, comme le

montre une étude de la prévalence des *Chlamydiales* chez des volontaires non malades (Corsaro and Venditti, 2015).

Dans une étude suisse datant de 2009, les nouveaux nés porteurs d'organismes semblables aux *Chlamydia* ont nécessité plus de réanimation à la naissance, ont eu besoin d'assistance ventilatoire invasive, ont contracté plus de pneumonie et ont présenté un taux de mortalité plus élevé que les nouveaux nés prématurés ne présentant pas de CLO (Lamoth *et al.*, 2009). Cependant, cette étude ne mentionne pas de recherche d'autres agents pathogènes susceptibles d'avoir pu causer les mêmes symptômes, mais soulève principalement la question du mode d'acquisition de ces bactéries.

Le Tableau 6 présente un récapitulatif des études ayant mis en évidence des *Rhabdochlamydiaceae* chez l'Homme.

Lieu de l'étude	Pathologie	Type d'échantillon	Nombre d'échantillons prélevés	Autre agents pathogènes présents dans l'échantillon	Nombre d'échantillons positifs à <i>Rhodochlamydia</i> (prévalence)	Nature des échantillons positifs à <i>Rhodochlamydia</i>	Référence
Vienne, Autriche	Pneumonie	LBA/sécrétions respiratoires/ lavage pharyngé	493 (387 patients)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (2/2), <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> (1/2)	2 (0,5%)	Expectoration	(Haider <i>et al.</i> , 2008)
Suisse	Naissances prématurées avec détresse respiratoire	Echantillon respiratoire, nature NP	39 (29 patients)	NP	4 (14%)	NP	(Lamoth <i>et al.</i> , 2009)
Suisse	Pneumonie ou trachéobronchite	Sécrétions naso-pharyngées (90% des échantillons)	(29 patients)	<i>M.pneumoniae</i> (1/12), <i>C.pneumoniae</i> (1/12)	12 (25%)	NP	(Lamoth <i>et al.</i> , 2011)
Finlande	Pneumonie au sens large, atteinte respiratoire	LBA; sécrétion naso-pharyngées (expectoration); liquide pleural; biopsies pulmonaires; sécrétions nasopharyngées, pharyngées, trachées, bronches	531 échantillons (envoyés pour analyse <i>C.pneumoniae</i> et <i>M. pneumoniae</i>) dont : 136 pour <i>Rhodochlamydia</i>	NP (8/16) Levurose (1/16) suspicion H1N1 (1/16), <i>M.pneumoniae</i> chronique (1/16), pneumonies à étiologie NP (2/16) leucémie (1/16) greffe de foie (1/16), CMV culture + (1/16)	16/136 (11,8%)	écouvillon gorge (6/16), LBA (5/16), sécrétion bronchique (2/16), écouvillon nasopharyngé (2/16), expectoration (1/16)	(Niemi <i>et al.</i> , 2011)
Europe	Volontaires sains	Écouvillon nasal	25 patients	<i>Legionella spp.</i>	1/25 (4%)	écouvillon nasal	(Corsaro and Venditti, 2015)

Tableau 6 : Bilan des analyses révélant la présence de *Rhodochlamydiaceae* dans des échantillons d'origine humaine

CMV : Cytomegalovirus ; LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire ; NP : Non précisé

4. Données épidémiologiques

4.1. Les arthropodes piqueurs, vecteurs de *Chlamydiales* ?

Les arthropodes piqueurs, et notamment les tiques, peuvent être vecteurs de nombreuses bactéries pathogènes, telles que *Borrelia burgdorferi s.l.*, agent étiologique de la maladie de Lyme (Asman *et al.*, 2017) ou *Coxiella burnetti*, agent zoonotique de la fièvre Q (Sivabalan *et al.*, 2017). Concernant les *Chlamydiaceae*, deux études suggèrent la possibilité de transmission de l'hôte à la nymphe (Caldwell and Belden, 1973) et de tiques adultes à l'hôte (McKercher *et al.*, 1980). Plusieurs études récentes montrent une grande diversité d'ADN de CLO chez *Ixodina spp.* (tiques dures).

La prévalence minimale d'ADN de CLO varie de 0,86% (Pilloux *et al.*, 2015) à 33% (Burnard *et al.*, 2017), et les prévalences réelles mesurées sont semblables dans 2 études différentes, à savoir 40,4% (Hokynar *et al.*, 2016) et 45% (Croxatto *et al.*, 2014). Les prévalences observées sont similaires aux prévalences de différents agents pathogènes véhiculés par les tiques (Smith and Wall, 2013; Wicki *et al.*, 2000).

Les deux familles de CLO les plus représentées, sauf pour les *Parachlamydiaceae* dans l'étude australienne (Burnard *et al.*, 2017), sont *Rhabdochlamydiaceae* et *Parachlamydiaceae* (Tableau 7). L'étude australienne est la seule à avoir prélevé les tiques directement sur les hôtes, et le genre le plus représenté parmi les lots d'échantillons testés est *Rhabdochlamydia*. La séquence d'ARN ribosomal 16s la plus représentée dans cette étude est une séquence présentant 96% de similitude avec l'espèce *Rhabdochlamydia porcellionis*, ce qui pourrait représenter une nouvelle espèce de *Rhabdochlamydia* selon les seuils établis par Everett (Everett *et al.*, 1999a). Cette séquence est retrouvée chez *Ixodes tasmani*, *I. holocyclus*, et *I. ornithorhynchi*, prélevés respectivement sur des koalas (*Phascolarctos cinereus*), des ornithorhynques (*Ornithorhynchus anatinus*) et opossums d'Australie (*Trichosurus vulpecula*) (Burnard *et al.*, 2017). Ces derniers résultats montrent la diversité d'hôtes auxquels pourraient être transmis des organismes semblables aux CLO, si une transmission entre tiques et hôtes de ces bactéries est avérée. Plus particulièrement, la famille des *Rhabdochlamydiaceae* est assez fortement représentée et ce, quelle que soit la région du globe étudiée. Dans ce contexte, de plus amples investigations sur le pouvoir pathogène et/ou zoonotique de cette famille de CLO pourraient s'avérer intéressantes.

Pays de l'étude	Espèce de tique et stade de développement	Prévalence d'ADN de CLO par lot de tiques [mini-maxi] ¹	Prévalence d'ADN de <i>Rhabdochlamydiaceae</i> ⁴	Prévalence d'ADN de <i>Parachlamydiaceae</i>	Prévalence moyenne d'ADN de CLO chez les puces	Prévalence d'ADN de <i>Rhabdochlamydiaceae</i>	Prévalence d'ADN de <i>Parachlamydiaceae</i>	Référence						
Algérie	<i>Ixodina spp</i> ²	45% (25/55) ³	13% (4/31)	74% (23/31)	7% (7/97)	0%	86% (6/7)	(Croxatto <i>et al.</i> , 2014)						
Australie	Adulte, femelle, <i>Ixodes tasmani</i>	43,5%(54/124) [17,4% - 71,6%]	60% (32/53)	0%				(Burnard <i>et al.</i> , 2017)						
	Adulte, femelle, <i>Ixodes holocyclus</i>	23,4%(29/124) [33% - 61,9%]												
Finlande	Adultes <i>I. ricinus</i> et <i>I. persulcatus</i>	40,4% (19/47) ³	9% (3/35)	69% (24/35)							(Hokynar <i>et al.</i> , 2016)			
	Larves et nymphes <i>I. ricinus</i>	18,7% (52/278)[2,9% -NE]												
Suisse	Adultes et nymphes, <i>Ixodes ricinus</i>	28,1% (54/192) [4,0% - 28,4%]	39% (16/41)	29% (12/41)										(Croxatto <i>et al.</i> , 2014)
Suisse	Adultes et nymphes, <i>Ixodes ricinus</i>	6,4% (543/8534) [0,86% - 6,6%]	33,1% (119/359)	29,2% (105/359)										

Tableau 7 : Prévalence d'ADN de CLO chez les arthropodes piqueurs de différents pays.

¹ la plupart des études regroupe les tiques par lots. La prévalence par lots est le nombre de lots positifs sur le nombre total de lots selon les études (le nombre de tiques par lot varie entre 1 et 10). La prévalence minimale est calculée en considérant une seule tique positive par lot, la prévalence maximale est calculée en considérant toutes les tiques du lot comme étant positives, et le dénominateur est le nombre total de tiques. ² *Dermacentor marginatus*, 10 *Hyalomma detritum*, 20 *Hyalomma romedarii*, 9 *Ixodes ricinus*, 9 *Rhipicephalus sanguineus* ; Stade (adulte ou nymphe) non précisé. ³ Prévalences réelles (pas de lots de tiques pour ces études) ; ⁴ Nombre d'échantillons contenant de l'ADN de *Rhabdochlamydia*/Nombre total d'échantillons séquencés ;

NE : Non Evalué

4.2. *Potentiel zoonotique*

Différentes études cherchent à identifier la prévalence et la diversité des CLO parmi des échantillons d'origine humaine. Toutes les séquences semblables à la famille des *Rhabdochlamydiaceae* sont retrouvées dans des échantillons de l'appareil respiratoire, issus de personnes saines, de personnes présentant une atteinte du système respiratoire et de nouveaux-nés prématurés (cf Tableau 6). Le portage de *Rhabdochlamydia* par l'homme semble donc possible. De plus, les données épidémiologiques concernant la présence de ces CLO chez les tiques dures suggère la possibilité d'une transmission vectorielle de ces bactéries. Dans l'ensemble, ces résultats soulèvent la question du potentiel zoonotique d'une bactérie au rôle pathogène non élucidé.

Une étude finlandaise compare les séquences nucléotidiques du gène 16s d'*Ixodes spp.* avec celles obtenues sur des biopsies de peau de personnes suspectées ou non d'avoir été mordues par une tique (la biopsie est réalisée au lieu de morsure présumé)(Hokynar *et al.*, 2016). Parmi les biopsies des personnes suspectées d'avoir été mordues par une tique, la prévalence d'ADN de CLO est de 85% ou 71%, selon que la recherche de *Borrelia burgdorferi* est positive ou négative, respectivement. Deux séquences du gène 16s identifiées sur les biopsies de peau et appartenant à *Rhabdochlamydiaceae* présentent 95 et 98% de similitude avec deux séquences isolées chez des tiques de cette même étude.

Ainsi, la prévalence de l'ADN de CLO dans la peau des personnes suspectées d'avoir été mordues par une tique est élevée. La transmission de ces bactéries semblables aux *Chlamydia*, et notamment des membres de *Rhabdochlamydiaceae*, de tique à homme serait donc une possibilité à investiguer d'avantage.

5. *Mise en évidence*

Seule une étude (Lamoth *et al.*, 2009) utilise une paire d'amorce ciblant uniquement la famille des *Rhabdochlamydiaceae*. Le plus souvent des amorces 16s ciblant l'ordre des *Chlamydiales* (Corsaro *et al.*, 2007; Everett *et al.*, 1999a; Lienard *et al.*, 2011) ou le genre *Chlamydia* (Kostanjsek *et al.*, 2004; TMOKO *et al.*, 1997) sont utilisées. La séquence 16s obtenue est alors séquencée et comparée aux séquences 16s existantes dans les bases de données pour déterminer les séquences les plus similaires. La PCR reste l'unique moyen actuel d'évaluer la présence de *Rhabdochlamydia*.

Pour conclure, les *Chlamydiae* sont des bactéries présentant un cycle de développement unique, dont les premières descriptions remontent au début du XXème siècle. Au cours des vingt dernières années, les progrès de la biologie moléculaire ont permis une nouvelle classification des espèces bien connues de la famille des *Chlamydiaceae*, ainsi que la découverte, description et classification de nouvelles chlamydiae, regroupées en 8 familles-

pour l'instant. Bien que les connaissances sur les membres de la famille des *Chlamydiaceae* soient bien étayées chez certains hôtes, telles que *Chlamydia trachomatis* chez l'Homme et *Chlamydia psittaci* chez les psittacidés, de nombreuses zones d'ombres demeurent. La prévalence de certaines *Chlamydia* chez des hôtes moins fréquents n'est parfois que peu connue et peu étudiée, le portage pouvant cependant avoir des conséquences pour la santé humaine. Parmi les nouvelles familles de *Chlamydiales* décrites, certaines espèces, telle que *Waddlia chondrophila*, ont un rôle pathogène fortement suspecté dans certaines maladies, contrairement à d'autres pour lesquelles le pouvoir pathogène n'est pas encore élucidé. La description de leur portage fournit néanmoins une donnée épidémiologique intéressante, et la présence de ces bactéries peut interférer avec le diagnostic d'autres maladies dues aux *Chlamydia*.

C'est ainsi que nous avons choisi de nous pencher sur la prévalence de *Chlamydia psittaci* chez les rapaces recueillis en centres de soin dans l'Oregon (E.U.), et que cette étude a permis de mettre en évidence une espèce de *Chlamydia* jusque-là jamais identifiée sur un rapace.

Résultats : prévalence de *Chlamydia psittaci* dans l'Oregon (E.U.) et identification d'une *Rhabdochlamydia*

I. Contexte de l'étude

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'une étude réalisée lors d'un stage de recherche effectué dans le cadre du « Summer Research Program » de l'Université Vétérinaire de l'Oregon (Oregon State University (OSU)) situé à Corvallis (Oregon, E.U.).

Le stage a été effectué sous la co-tutelle des Pr. Daniel Rockey (Professeur de Sciences Biomédicales, Veterinary College, OSU) et Robert Bildfell (Professeur d'Anatomie Pathologique, OSU), ce dernier ayant proposé le sujet. Le Dr Bildfell a permis les contacts avec les centres de la faune sauvage. Le Dr Rockey et son laboratoire ont fourni les connaissances théoriques et pratiques sur les *Chlamydia*.

La collaboration avec les centres de la faune sauvage était centrale à ce sujet, le contact entre la faune sauvage et les soignants étant l'une des inspirations principales du projet. L'état de l'Oregon compte 34 centres, plus ou moins spécialisés dans certains types d'animaux. Ainsi, parmi les centres ayant contribué à cette étude, le centre basé à Cascade (Cascade Raptor Center) ne recueille que des rapaces, mais le centre de Chintimini à Corvallis (Chintimini Wildlife Center) accepte aussi les mammifères et les reptiles.

Les centres sont gérés par des employés et des bénévoles, la proportion desquels varie d'un centre à l'autre.

II. Matériel et méthode

1. Contact avec les centres de la faune sauvage

Le contact avec ces centres a été établi par téléphone afin de savoir s'ils étaient volontaires pour participer à l'étude. Si c'était le cas, des kits d'écouvillonnage accompagnés de fiches de renseignement étaient envoyés et le personnel soignant formé effectuait l'écouvillonnage (Annexe 1 et Annexe 2). Les fiches de renseignement individuelles demandaient le lieu de ramassage de l'oiseau, l'espèce, le sexe, l'âge, la raison de l'admission et le devenir de l'oiseau s'il était connu.

2. Population cible

Les échantillons sont prélevés uniquement sur des rapaces, étant définis comme des oiseaux de proie pourvus d'un bec fort et crochu et de serres puissantes. Ce terme vernaculaire regroupe en réalité plusieurs ordres d'oiseaux.

3. Collecte des échantillons

Lors de l'examen clinique d'admission, les bénévoles des centres ont écouvillonné le choane et le cloaque des oiseaux. Le protocole de prélèvement a été approuvé par le Comité d'Éthique sur l'utilisation et le soin aux animaux de l'Université de l'Oregon (« Oregon State University Animal Care and Use Committee »).

L'écouvillonnage a été réalisé en utilisant des écouvillons floqués et des tubes Eppendorfs® secs. Les kits d'écouvillonnage envoyés aux centres contenaient 2 écouvillons, 2 tubes Eppendorfs® et une fiche à remplir concernant l'oiseau échantillonné (Annexe 1). Le tout était emballé dans un sachet stérile.

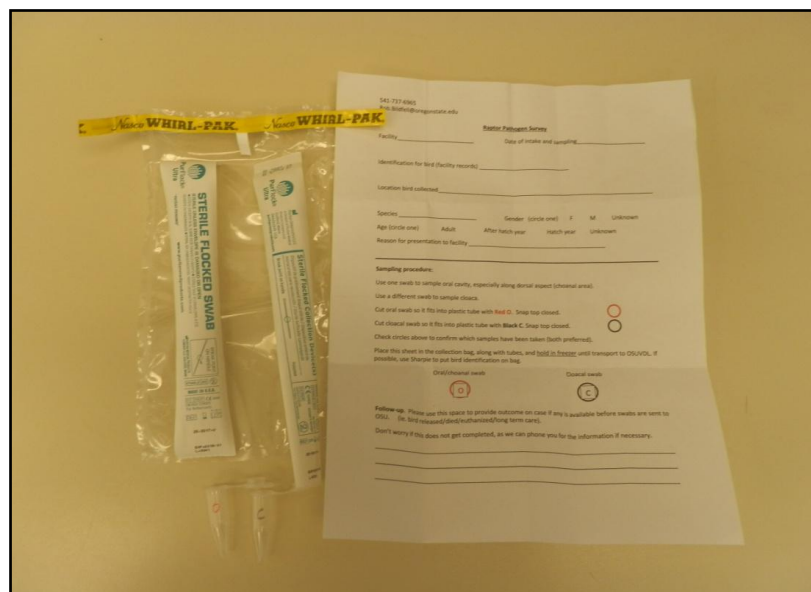


Figure 8 : Kit d'écouvillonnage

4. Extraction d'ADN

Après échantillonnage, les écouvillons sont gardés au congélateur à une température de -18°C jusqu'au moment de l'analyse. L'ADN est extrait des écouvillons en utilisant le « DNeasy Blood and Tissue kit » (Qiagen #69506) selon les recommandations du fournisseur en ajoutant 5mM de Dithiothreitol (DTT) au tampon de lyse. L'ADN extrait est conservé dans 50 μL de solution tampon (Buffer AE) et conservé à -18°C .

Les poux ont été prélevés sur 14 rapaces dans un centre de faune sauvage de l'Oregon. L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant les mêmes kits et protocoles que précédemment. L'ADN obtenu a été quantifié et sa pureté analysée par spectrophotométrie à 260nm et 280nm (Nanodrop®) puis conservé à -18°C .

5. Identifications bactériennes

5.1. Choix des amorces

Une PCR ciblant l'extrémité 5' de la séquence 16s de l'ADN ribosomale du genre *Chlamydia* a été utilisée pour évaluer la présence de *Chlamydiaceae* (Tableau 8). Deux paires d'amorces différentes ciblant les *Chlamydiaceae* ont été utilisées : l'une pour identifier la présence de *Chlamydiaceae* dans les échantillons, et l'autre pour confirmer les échantillons positifs.

Nom	Séquence(5'→3')	Position (bp)	Référence
Chlam16sF	GTGGATGAGGCATGCRAAGTCGA	44-65	(Ossewaarde and Meijer, 1999)
Chlam16sR	CTCTCAATCCGCCTAGACGTC	295-315	
16sIGF	CGGCGTGGATGAGGCAT	40-56	(Everett <i>et al.</i> , 1999a)
16sIGR	TCAGTCCCAGTGTTGGC	321-337	
18S2F	CCTGGTTGATCCTGCCAGTA	3-22	Cette étude
18S2R	ACCAGACTTGCCCTCCAATG	606-625	

Tableau 8 : Séquences des amorces spécifiques aux *Chlamydiales* ciblant les séquences 16s et 18s de l'ADN ribosomique présents dans les échantillons choanaux et cloacaux de rapaces.

La position de la séquence homologue sur le gène 16s est indiquée en partant du point +1 de transcription.

Une recherche dans le logiciel BLAST montre que les amorces choisies présentent une correspondance de 100% avec les souches de *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. avium*, *C. pecorum* et *C. muridarum*. Les séquences des amorces ont été comparées à différents génomes de *Chlamydia spp.* en utilisant le logiciel Geneious software package® et la séquence 16s cible est conservée dans tous les génomes analysés.

Une paire d'amorces 18s (Tableau 8) a été utilisée pour amplifier la séquence 18s de l'ADN ribosomique de poux. Cet ADN a été utilisé comme témoin positif lors de la recherche d'ADN de poux dans les échantillons choanaux d'oiseaux avec la même amorce 18s.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Programme permettant de trouver des régions similaires entre plusieurs séquences de nucléotides (BLASTN) ou d'acides aminés (BLASTP). BLAST permet de trouver rapidement dans une base de données des séquences similaires, et calcule la signification statistique des correspondances trouvées.

5.2. Déroulement de la PCR

Les mélanges PCR ont eu la même composition tout au long de l'étude, quels que soient les amorces ou les échantillons. Le mélange est composé de 10µL de master mix commercial (New England Bio Labs™, Phusion™ High-Fidelity Master Mix with HF Buffer), de 6µL d'eau stérile exempte de nucléase, 2µL d'ADN et 1µL de chacune des amorces (à 5 pM). Les cycles PCR sont composés d'une phase initiale de dénaturation à 98°C pendant 1 minute, une phase de dénaturation à 94°C pendant 10 secondes, une phase d'hybridation à 55°C pendant 15 secondes et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 30 secondes. Un cycle est réalisé 25 à 35 fois. La phase d'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 minutes.

Après amplification, les produits sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. Pour chaque série de PCR, de l'eau stérile et exempte de nucléase est utilisée comme témoin négatif, et une souche laboratoire de *Chlamydia caviae* ou *Chlamydia abortus* sont utilisées comme témoin positif.

5.3. Test de la séquence choisie

Des souches de *C. abortus*, *C. trachomatis* et *C. caviae* du laboratoire ont été utilisées afin d'évaluer la performance de la détection par PCR. Les amorces ont aussi été testées sur différentes bactéries : *E. coli* et gram + provenant d'un échantillon de la cavité buccale d'un oiseau.

La sensibilité de la PCR a été évaluée par 4 dilutions successives au dixième sur une souche de laboratoire de *C. caviae*.

5.4. Identification précise de l'espèce

Les produits PCR 16s des échantillons positifs pour *Chlamydia spp.* ont été séquencés selon la méthode Sanger. Les produits de PCR permettant le séquençage ont été extraits grâce à un kit de purification d'ADN (Thermoscientific™, Purelink™ Quick Gel Extraction kit).

Principe de la méthode de séquençage Sanger

La méthode est nommée d'après le Pr. Frederick Sanger, double prix Nobel de chimie. L'ADN cible est intégrée dans un plasmide bactérien. Après répllication de la bactérie et lyse de sa membrane, les plasmides contenant l'ADN cible sont isolés. L'ADN double brin du plasmide est dénaturé par chauffage. La répllication de l'ADN cible, assurée par l'ADN polymérase et par la présence de désoxynucléotides (dNTP), s'arrête lors de l'ajout d'un nucléotide modifié (didésoxy nucléotide, ddNTP). Les différentes séquences obtenues subissent une électrophorèse sur gel, permettant aux séquences plus courtes de migrer plus loin dans le maillage d'agarose. Les différentes séquences obtenues sont lues dans l'ordre

croissant de taille, et la lecture du nucléotide terminal modifié de chaque séquence permet d'obtenir la séquence de l'ADN cible.

III. Résultats

1. Echantillons récoltés

Des échantillons issus de 82 rapaces appartenant à 12 espèces et 4 ordres différents sont récoltés. Les espèces chez qui le nombre d'échantillons est le plus élevé sont la buse à queue rousse, l'épervier de Cooper et la chouette effraie (Tableau 9).

Ordre	Nom commun (France)	Nom commun (Etats-Unis)	Nom latin	Nombre d'échantillons
Accipitiformes	Buse à queue rousse	Red Tailed Hawk	<i>Buteo jamaicensis</i>	25
	Epervier de Cooper	Cooper's Hawk	<i>Accipiter cooperii</i>	11
	Balbusard pêcheur	Osprey	<i>Pandion haliaetus</i>	9
	Pygargue à tête blanche	Bald Eagle	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	4
	Busard St Martin	Northern Harrier	<i>Circus cyaneus</i>	2
	Buse de Swainson	Swainson's Hawk	<i>Buteo swainsoni</i>	1
Cathartiformes	Urubu à tête rouge	Turkey Vulture	<i>Cathartes aura</i>	1
Falconiformes	Faucon pèlerin	Peregrine Falcon	<i>Falco peregrines</i>	1
Strigiformes	Chouette effraie	Barn Owl	<i>Tyto alba</i>	10
	Grand-duc d'Amérique	Great Horned Owl	<i>Bubo virginianus</i>	9
	Petit-duc des montagnes	Western Screech Owl	<i>Megascops kennicottii</i>	7
	Chouette rayée	Barred Owl	<i>Strix varia</i>	2
		Total :	12	82

Tableau 9 : Nombre d'échantillons récoltés, organisés par espèce de rapace.

Les échantillons sont récoltés dans 9 centres différents (Figure 9), principalement sur la côte ouest de l'Oregon. La partie Est de l'Etat se compose principalement de hauts

plateaux désertiques très peu peuplés. Parmi ces centres figurent notamment le centre d'Astoria, qui accueille surtout des oiseaux marins, le centre de Cascade qui accueille uniquement des rapaces, ou le centre de Portland Audubon, recueillant toutes les espèces d'oiseaux. Ces deux derniers centres ont été nos plus gros fournisseurs d'échantillons.

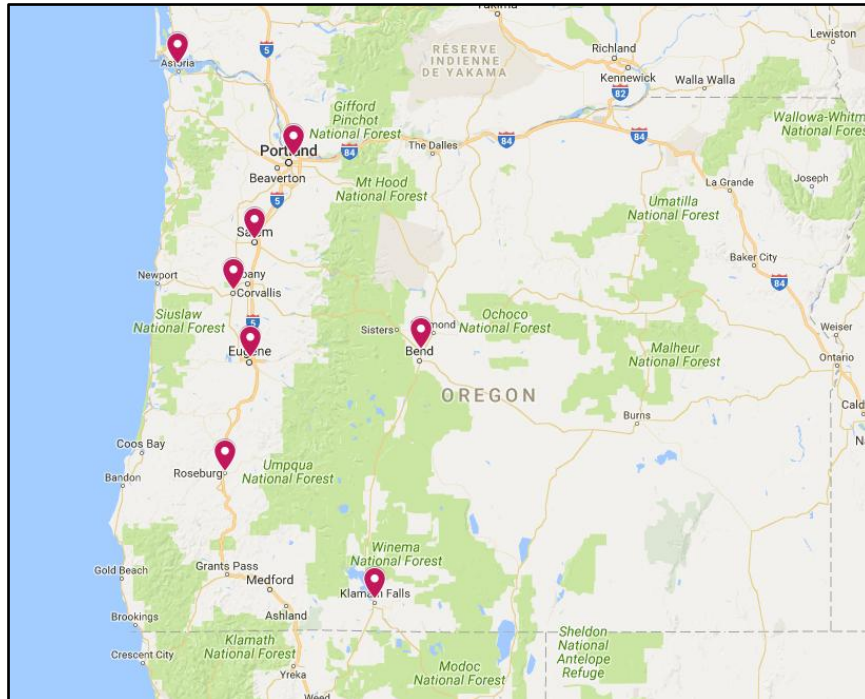


Figure 9 : Localisation des centres de faunes sauvages participant à l'étude.

Chaque échantillon reçu a été traité individuellement.

Les centres étaient chargés du prélèvement des échantillons choanaux et cloacaux. Le choane étant un site préférentiel d'écouvillonnage pour la recherche de *C. psittaci* (Andersen, 1996), seuls les échantillons choanaux ont été analysés dans un premier temps. Les échantillons cloacaux ont été utilisés en deuxième intention, en cas de doute ou pour confirmer un échantillon cloacal positif.

Trois des 82 (3,6%) échantillons testés pour la présence de la séquence 16s des *Chamydiaceae* sont positifs après migration sur gel de la PCR ; La Figure 10 montre ces résultats. Le témoin positif de cette PCR est une souche laboratoire de *Chlamydia abortus*.

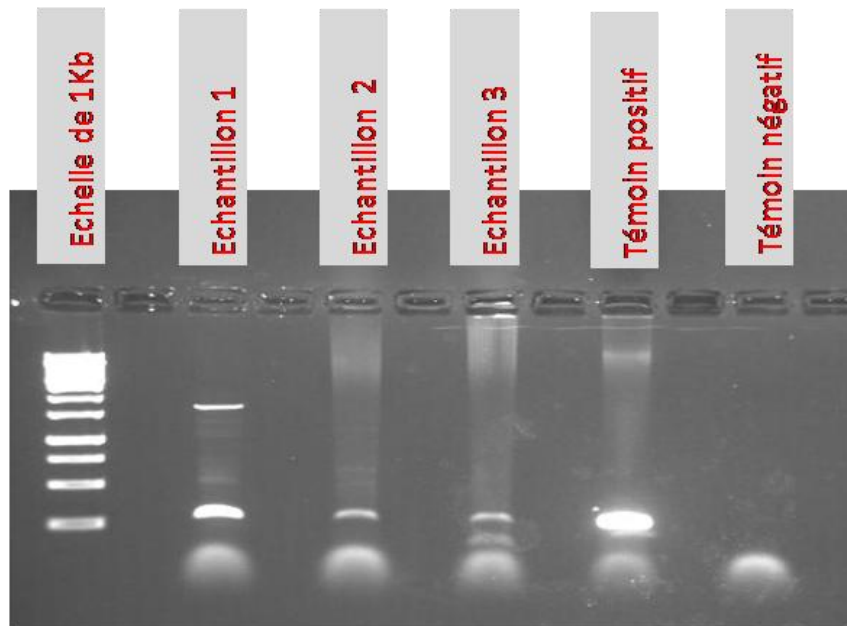


Figure 10: 3 PCR positives pour *Chlamydia spp.* sur 3 échantillons différents

La séquence 16s obtenue avec les amorces choisies étaient de 271 paires de bases. Les 3 échantillons positifs ont été séquencés selon la méthode Sanger. Toutes les séquences 16s obtenues ont été alignées avec différentes séquences répertoriées dans le logiciel BLAST. Les résultats pour chaque échantillon sont détaillés ci-après, du moins au plus significatif.

2. Echantillon 2

L'échantillon 2 provient d'un Grand-duc d'Amérique (*Bubo virginianus*) émacié. Le séquençage du produit PCR a été infructueux, aucune conclusion n'a donc pu être tirée de la PCR positive. La PCR a été répétée 3 fois sur l'échantillon choanal avec les amorces 16sF et 16sR (Tableau 8), et les 3 séquençages réalisés en suivant ont été infructueux. Aucun ADN de *Chlamydiaceae* n'a été amplifié par PCR à partir de l'échantillon cloacal. Les causes de ces échecs répétés peuvent être multiples : une contamination de l'ADN amplifié rendant le séquençage illisible ou une quantité d'ADN amplifié trop faible. La présence d'inhibiteurs de séquençage dans la solution tampon contenant l'ADN, ou plus généralement une erreur de manipulation lors du séquençage semblent peu probables : la solution tampon est la même pour tous les échantillons séquencés, et une erreur de manipulation a peu de chances de se répéter 3 fois pour un même échantillon. Enfin, l'excrétion intermittente de *C. psittaci* pourrait expliquer l'absence d'ADN de *Chlamydiaceae* dans l'échantillon cloacal.

3. Echantillon 3

L'échantillon 3 a été prélevé sur un Balbuzard pêcheur juvénile (*Pandion halieathus*) amené au centre pour de multiples fractures dues à une chute. La PCR est positive aux *Chlamydiaceae* pour les échantillons choanaux et cloacaux. Le séquençage des produits PCR confirme une infection de ces organes par *Chlamydia psittaci*.

4. Echantillon 1

Les résultats concernant l'échantillon 1 sont développés de manière plus conséquente car ils ont conduit à l'identification d'une CLO ainsi qu'à la mise en évidence de son portage chez un rapace.

4.1. Evaluation de la PCR

La sensibilité de la PCR a été évaluée par 4 dilutions successives au dixième sur une souche de laboratoire de *C. caviae*. Le résultat de cette dilution est montré en Figure 11. La concentration de la solution initiale d'ADN est de 125ng/μL. L'amorce peut se lier à l'ADN à une concentration de 1.25×10^{-2} ng/μL.

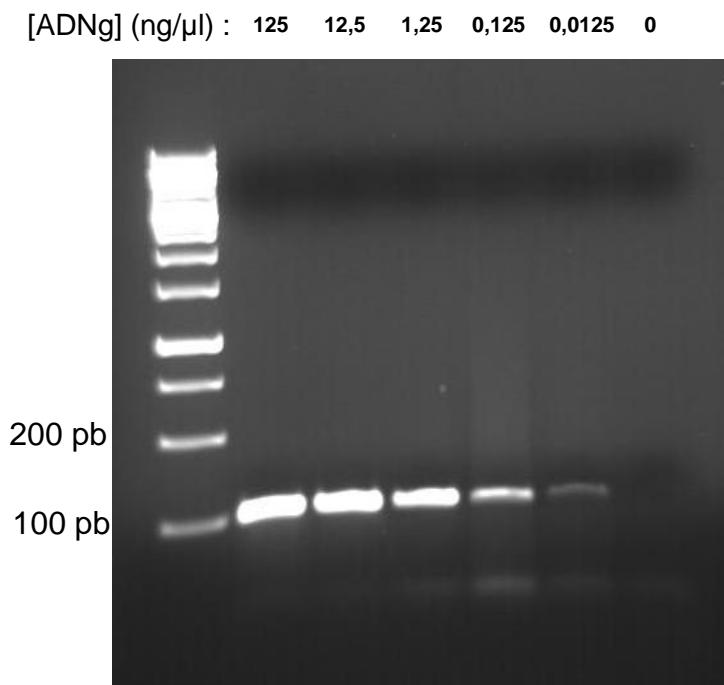


Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR de mise au point sur l'ADNg de *C. caviae* (MW : marqueur de taille 1kpb)

4.2. Résultats de la PCR

L'échantillon 1 est issu d'une Buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*) présentée au centre fortement déshydratée et émaciée. Elle était infestée de nombreux poux, et est morte la nuit suivant son admission.

L'échantillon prélevé au niveau du choane est positif par PCR avec les amorces ciblant les *Chlamydiaceae* (16sF et 16sR, cf Tableau 8). Le séquençage de l'ADN amplifié montre que la positivité de cet échantillon n'est pas due à *Chlamydia psittaci*, la séquence la plus proche de la séquence obtenue appartient au genre *Rhabdochlamydia*. Une PCR avec une autre paire d'amorces (16sIGF et 16sIGR, cf Tableau 8) ciblant la séquence 16s des *Chlamydiales* a aussi été réalisée sur cet échantillon. La séquence de 298 pb a été séquencée, cette séquence ayant servie de comparaison dans le logiciel BLAST (Figure 12) et pour la construction de l'arbre phylogénétique (Figure 13).

4.3. Résultats du séquençage

La recherche dans le logiciel BLAST de séquences similaires à celle obtenue montre que le produit PCR de l'échantillon 1 présente 95% de similitude avec la séquence 16s de *Rhabdochlamydia porcellionis* (Figure 12). Ce pourcentage de similitude entre les deux séquences 16s permet de classer ces bactéries comme appartenant au même genre *Rhabdochlamydia* (Everett et al., 1999a). Le genre *Rhabdochlamydia* semble avoir pour hôte des arthropodes (cf III), comme la blatte orientale ou le cloporte rugueux.

<i>R. porcellionis</i>	CGTGGATGAAGCATGCAAGTCGAACGGAAGCTA-GAGGGTAAACCTTTAGTTTLAGTGGCGAA	59
SJ1599	CGTGGATGAGGCATGCGAGTCGAACGGAAGCTA-GAGGGCAACCTTTAGTTTLAGTGGCGAA	62
<i>C. psittaci</i>	CGTGGATGAGGCATGCAAGTCGAACGGAATAATGACTTCGGTTGTTA-TTTAGTGGCGGA	101
<i>R. porcellionis</i>	AGGGTTAGTAATACATGAATAACTTACCCTTTACCTGGGGATAACGACTGGAACAGGCG	119
SJ1599	AGGGTTAGTAATACATGAATAACTTACCCTTTACCTGGGGATAACGACTGGAACAGGCG	122
<i>C. psittaci</i>	AGGGTTAGTAATACATAGATAATCTGTCTCAACTTGGGAATAACGGTTGGAACGACCG	161
<i>R. porcellionis</i>	CTAATACCGAATGAGGTACCGATAAAGAGTTATTGGCTATCAAAGTGGGGACCTTGTA	179
SJ1599	CTAATACCGAATGAGGTACCGATAAAGGAAATTATAGGATATCAAAGTGGGGACCTAG-AA	181
<i>C. psittaci</i>	CTAATACCGAATGTGGTATGTTTAGGCATCTAAAACATATTAAAGAAGGGGATCTT---	217
<i>R. porcellionis</i>	AGAGGCCTTGCGGTAAAGGATAGGTTTCATGTGATATCAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCG	239
SJ1599	GTAGGCCTTGCGGTAAAGGATAGGTTTCATGGGATATCAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCG	241
<i>C. psittaci</i>	-CGGACCTTTCGGTTGAGGGAGAGTCTATGGGATATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCC	276
<i>R. porcellionis</i>	CACCAAGGCTAAGACGTCTAGCGGATTGAGAGATTGACCGCAACACTGGGACTGAGAC	299
SJ1599	CACCAAGGCTAAGACGTCTAGCGGATTGAGAGATTGACCGCAACACTGGGACTGAGAC	298
<i>C. psittaci</i>	TACCAAGGCTTTCGACGTCTAGCGGATTGAGAGATTGACCGCAACACTGGGACTGAGAC	336

Figure 12 : Résultat de la recherche BLAST de la séquence obtenue avec l'échantillon 1 (SJ1599)

4.4. *Classification phylogénétique*

La séquence nucléotidique obtenue a été analysée phylogénétiquement par la méthode de « Neighbor-joining » en utilisant un logiciel commercial (Molecular Evolutionary Genetics Analysis : megasoftware.net). Cette analyse indique une forte corrélation entre la séquence obtenue et le genre *Rhabdochlamydia* (Figure 13), confirmant les résultats précédents obtenus par l'alignement de séquences.

Méthode de « Neighbor-joining »

Méthode d'élaboration d'arbres de données phylogénétiques. La méthode *neighbor joining* se base sur les mêmes principes que les méthodes d'analyse de groupe (cluster analysis), telles que la méthode d'UPGMA (qui se base sur les distances génétiques pour construire un arbre phylogénétique). La seule différence de la méthode de *neighbor joining* est qu'elle tient compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique. Cette méthode fournit un arbre non polarisé (non enraciné).

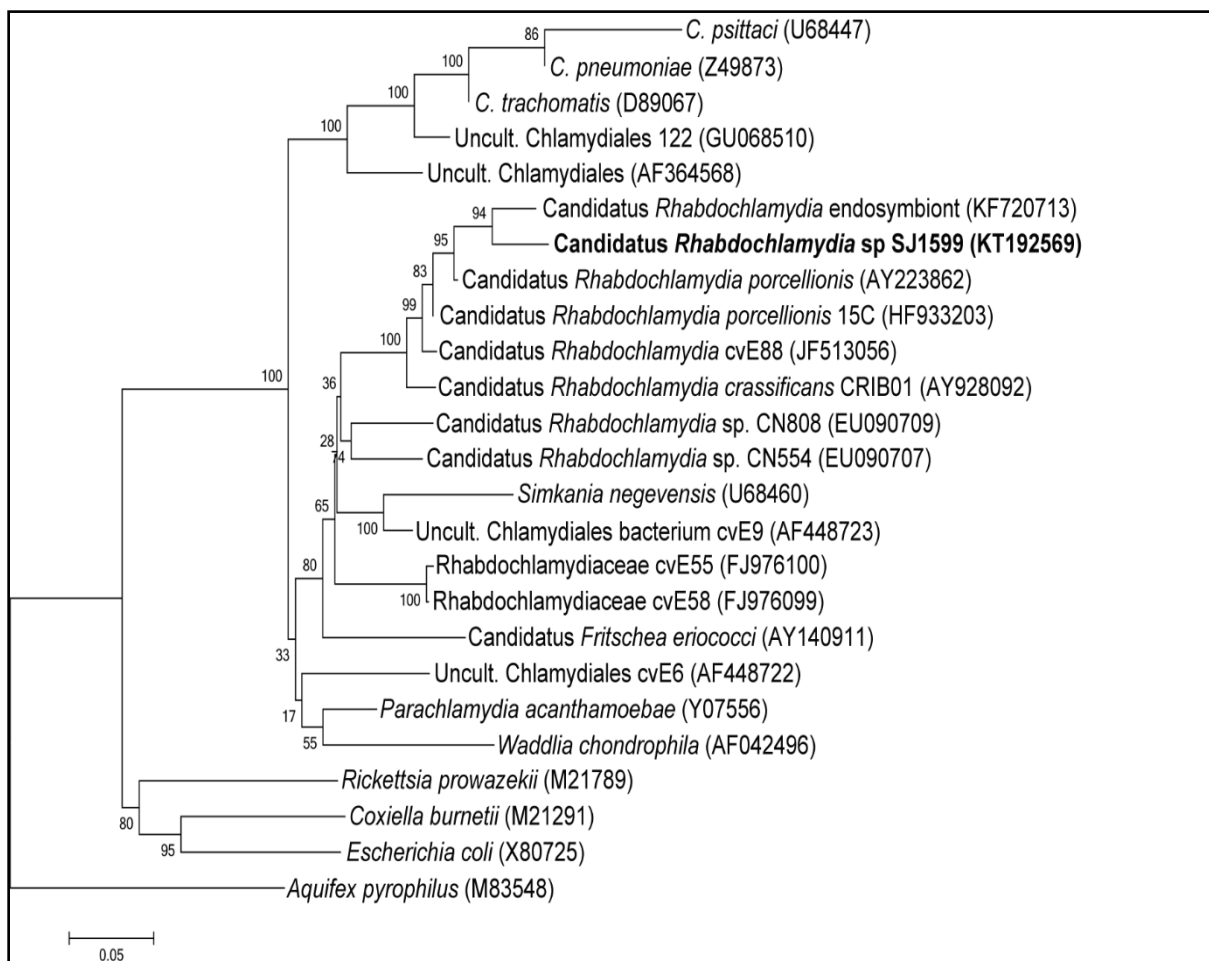


Figure 13: Arbre phylogénétique de la séquence 16s des Chlamydiales, obtenu selon la méthode de « Neighbor-joining ».

La séquence nucléotidique identifiée est en gras. La barre de légende en bas à gauche indique le nombre de paires de bases (pb) variable par nucléotide dans la séquence de 298 pb obtenue. Les valeurs bootstrap obtenues par le programme d'analyse phylogénétique sont indiquées à chaque bifurcation.

5. Echantillons contenant l'ADN de poux

L'ADN de *Rhabdochlamydia* dans le choane de la buse à queue rousse aurait pu provenir de poux présents sur l'oiseau lors de son admission. Pour vérifier cette hypothèse, 14 poux ont été prélevés sur des rapaces dans un centre de faune sauvage voisin de l'université, contribuant à l'étude. La PCR ciblant la séquence 18s de poux, réalisée sur le un mélange d'ADN des 14 arthropodes, n'a permis de mettre en évidence aucun ADN de *Rhabdochlamydia*.

IV. Discussion

Dans notre étude, trois des 82 échantillons testés se sont révélés positifs à la recherche de *Chlamydiales* par PCR 16s. Le séquençage de ces échantillons a confirmé la présence d'ADN de *Chlamydiales* pour deux d'entre eux. Pour le troisième cas de PCR positive (échantillon 2), nous avons décidé de le considérer comme négatif au vu des résultats non conclusifs du séquençage et de la négativité de la deuxième PCR effectuée sur l'échantillon cloacal. La PCR ciblant la séquence 16s dans cet échantillon a été répétée 3 fois, et les trois bandes obtenues n'ont pas pu être séquencées. Cet échec serait probablement dû à une contamination de l'échantillon par de l'ADN rendant la lecture du séquençage impossible, ou à une quantité trop faible d'ADN amplifié. Une erreur de manipulation sur 3 séquençages différents semble peu probable.

Concernant les deux échantillons séquencés, dans le premier cas (échantillon 3), l'analyse du produit PCR a permis de mettre en évidence la présence de *C. psittaci* chez un Balbuzard pêcheur juvénile. Ce résultat n'est pas surprenant au vu des données disponibles dans la littérature concernant l'existence d'un portage de *C. psittaci* chez les rapaces (Kaleta and Taday, 2003). Néanmoins, la faible prévalence obtenue dans notre travail contraste fortement avec les résultats publiés par d'autres équipes (Fowler et al., 1990; Schettler et al., 2003). Pour le deuxième oiseau positif aux *Chlamydiales* (échantillon 1), le résultat obtenu est plus surprenant puisque l'analyse du produit PCR révèle une très forte identité avec la séquence 16s de *Rhabdochlamydia porcellionis*. L'analyse phylogénétique de cette séquence a permis l'identification d'une nouvelle espèce de *Rhabdochlamydia* et la mise en évidence de son portage chez un rapace (Buse à queue rousse).

Les résultats obtenus pour ces oiseaux sont discutés individuellement ci-après.

1. Échantillon 3 : portage de *Chlamydia psittaci*

L'analyse des échantillons choanux et cloacaux du balbuzard pêcheur juvénile ont révélé la présence de *Chlamydia psittaci* au niveau de ces organes, confirmant le portage et l'excrétion de cette bactérie par l'oiseau. L'oisillon a été amené au centre pour multiples fractures, probablement dues à la chute du nid. Dans ce cas nous pouvons supposer une transmission verticale *via* l'œuf, ou plus probablement une transmission par les parents (Harkinezhad et al., 2009b).

Ainsi, nous concluons à une prévalence de 1,2% (1/82) de *Chlamydia psittaci* dans notre étude. Ce chiffre contraste avec la prévalence précédemment décrite dans un centre de faune sauvage de l'état californien voisin (Fowler et al., 1990). Cette étude publiée en 1990 décrit en effet une prévalence de 10% (mise en évidence du pathogène par immunofluorescence après culture cellulaire) et une séroprévalence de *Chlamydia psittaci* de plus de 40% chez les rapaces, avec un portage important par les buses à queue rousse. Le laps de temps entre les deux études et la différence de techniques utilisées (PCR vs

immunofluorescence et ELISA) ne permettent aucune conclusion concernant la significativité de cette différence de prévalence.

Une étude basée en Belgique, se basant sur une mise en évidence du pathogène par immunofluorescence sur culture cellulaire, trouve une prévalence de *C. psittaci* de 11% chez les rapaces du même ordre, mais ce résultat est basé sur l'étude de seulement neuf oiseaux. Dans la suite de leur travail, les auteurs décrivent une prévalence plus élevée toutes espèces confondues (11/42, soit 26%) (Kalmar *et al.*, 2014).

La faible prévalence trouvée dans notre étude est plus proche de la prévalence nulle relatée dans une étude croate (Vlahović *et al.*, 2004), qui contraste elle-même avec les fortes prévalences observées dans l'Allemagne quasi voisine (74% des rapaces testés par PCR sont positifs).

Ces résultats très divergents suggèrent un endémisme du portage de *C. psittaci* dans certaines régions ou, de manière plus triviale, reflètent la nécessité de l'harmonisation des techniques de détection de cette bactérie. Les techniques d'amplification de l'ADN sont privilégiées aujourd'hui lors de la recherche de *C. psittaci*, cette technique étant la plus sensible et la plus spécifique. Le séquençage des bandes positives reste le moyen le plus sûr d'identifier précisément la bactérie présente. Face à la diversité des *Chlamydiales*, si le séquençage n'est pas envisagé, le choix des amorces doit être réalisé avec soin.

Enfin, si le portage de ce pathogène zoonotique par les rapaces est faible dans certaines régions du globe, elle n'est pas à négliger : les rapaces font d'une part l'objet de différents projets de conservation, et d'autre part ce sont des espèces bénéficiant d'une attention plus grande de la part du public que d'autres types d'oiseaux (Grogan and Kelly, 2013). Il peut donc y avoir un contact fréquent entre l'Homme et les rapaces.

2. Echantillon 1 : portage de *Rhabdochlamydia*

L'analyse de l'échantillon 1, issu d'une buse à queue rousse a permis la mise en évidence d'une nouvelle espèce de CLO. La contamination de l'oiseau par cette bactérie pourrait avoir plusieurs origines, discutées dans les paragraphes suivants.

2.1. Contamination de l'oiseau via des arthropodes

La *Rhabdochlamydia* présente dans l'échantillon pourrait être issue de poux, présents dans la cavité buccale après un toilettage de l'oiseau. En effet, la buse à queue rousse dont l'échantillon choanal contenait des *Rhabdochlamydia* était infestée de poux. Des *Chlamydia* ont déjà pu être identifiées chez *Menopon gallinae* et d'autres arthropodes en contact avec les oiseaux (Eddie *et al.*, 1962) et les *Rhabdochlamydia* semblent avoir pour hôtes préférentiels les arthropodes (*cf* III.3.1 et III.4.1). Cette hypothèse n'est cependant pas

confirmée par nos analyses : la PCR ciblant la séquence 18s de poux dans l'échantillon est négative, mais celle ciblant la séquence 18s propre à l'ADN d'oiseau est positive. Aucun ADN de poux n'a donc pu être détecté dans l'échantillon choanal.

De plus, aucun des 14 poux prélevés sur d'autres rapaces dans l'Oregon ne contenait de *Rhabdochlamydia*. Les poux n'ont pas été prélevés dans le centre d'où provenait la buse porteuse de *Rhabdochlamydia* et provenaient d'un autre centre de faune sauvage participant à l'étude, situé dans la même ville que l'université. Une analyse des poux présents sur l'oiseau porteur auraient été plus pertinente, mais la buse a succombé la nuit après son admission et l'analyse des échantillons a eu lieu des semaines après, les poux présents sur l'oiseau lui-même n'ont donc pas pu être prélevés.

Ce résultat suggère une faible prévalence de *Rhabdochlamydia* chez les poux d'oiseaux dans l'Oregon. Cependant, le faible nombre de poux prélevés (n=14) ne permet pas de conclure avec certitude sur la prévalence.

2.2. Contamination par des amibes via l'eau ou les aliments

La présence de la bactérie de la famille des *Rhabdochlamydiaceae* due à une contamination des choanes par des amibes de l'eau de boisson ou des aliments semble peu probable. En effet, certaines espèces de *Chlamydiales* ont pu être isolées après mise en culture chez des amibes (Thomas *et al.*, 2006) et différentes espèces de CLO ont été identifiées dans de l'eau potable en Suisse (Lienard *et al.*, 2017) et dans des abreuvoirs en Angleterre (Wheelhouse *et al.*, 2011). Cependant, les bactéries identifiées appartiennent aux familles de *Parachlamydiaceae* majoritairement et aux familles de *Criblamydicaceae* et *Waddliaceae* (Lienard *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2006). Les *Rhabdochlamydiaceae* n'ont pas été isolées à partir de prélèvement d'eau et ne se multiplient pas dans les cultures d'amibes (Corsaro and Venditti, 2015). De plus, l'oiseau en question a été écouvillonné lors de son examen d'admission, et n'avait pas encore reçu d'aliments ou de traitement. Cette hypothèse reste toutefois possible dans la mesure où l'historique de l'oiseau avant son ramassage est inconnu.

2.3. Présence dans les sécrétions respiratoires

La présence de la bactérie de la famille des *Rhabdochlamydiaceae* dans la région des choanes pourrait s'expliquer par la présence de celle-ci dans les sécrétions respiratoires. En effet, des espèces de cette famille ont pu être identifiées dans des échantillons respiratoires humains (*cf.* III.3.2). Ces échantillons chez l'homme sont pour la plupart prélevés dans des cas de pneumonie, et les symptômes observés peuvent être dus à d'autres agents pathogènes plus connus du système respiratoire. Des bactéries de la famille des *Rhabdochlamydiaceae*

seraient donc capables de coloniser le système respiratoire, mais leur pathogénicité reste à élucider.

Si les *Rhabdochlamydia* ne sont pas décrits comme étant des pathogènes respiratoires chez les oiseaux, nous ne pouvons pas totalement exclure cette possibilité dans le cas présent. L'oiseau sur lequel la bactérie a été identifiée était présenté en mauvais état général. Il était émacié, déshydraté et infesté de poux, et est mort la nuit suivant son admission. Aucune analyse n'a été effectuée, autre que notre prélèvement, pour déterminer la cause de sa maladie, qui peut être d'origines multiples et l'animal n'a pas été autopsié.

En conclusion, bien que nos résultats suggèrent une prévalence faible des *Rhabdochlamydia* chez les rapaces de l'Oregon, cette étude, réalisée en 2014, est, à notre connaissance, le premier constat de la présence de *Rhabdochlamydia* aux Etats Unis et le premier constat de *Rhabdochlamydia* chez un oiseau. C'est probablement plutôt le fruit de l'absence de recherche directe, et non pas d'une présence particulièrement rare de ce microorganisme dans cette région du monde. De plus, d'autres « CLO », ou espèces de *Chlamydiales* nouvellement identifiées ont été trouvées chez des oiseaux (Aaziz *et al.*, 2015).

3. Echantillon 2 : résultats non conclusifs.

La PCR 16s de l'échantillon prélevé au niveau des choanes d'un hibou Grand Duc d'Amérique s'est révélée positive mais le produit PCR n'a pu être séquencé et la PCR 16s réalisée sur l'écouvillon cloacal n'a donné aucune amplification. Pourtant, l'oiseau est arrivé au centre avec des symptômes compatibles avec une chlamyidiose aviaire.

Les explications peuvent être multiples et plus ou moins triviales : artéfact de PCR, problème technique de séquençage (conservation de l'échantillon, erreur dans le mix réactionnel), une infection précoce expliquant l'absence dans le cloaque ou une excrétion intermittente de la bactérie.

Quoiqu'il en soit, ne pouvant statuer sur le statut de cet oiseau, nous l'avons écarté de la liste des positifs.

Conclusion

Chlamydia psittaci est une bactérie pathogène zoonotique principalement portée par les oiseaux. La prévalence, particulièrement élevée à quasi endémique chez certaines espèces, comme les pigeons, les perroquets ou les dindes d'élevage, est plus faible chez les rapaces de l'Oregon. La bactérie a aussi été identifiée chez certains mammifères, qui pourraient à leur tour, dans des cas particuliers, être réservoir de la bactérie. Le portage de la bactérie par les espèces réservoirs ou espèces secondaires est sous-estimé en raison, entre autre, du caractère fastidieux des analyses de laboratoire menant à un diagnostic de certitude et au manque de connaissance des personnes à risques et d'une partie du personnel soignant. Un diagnostic tardif peut cependant avoir des conséquences fatales pour la victime, d'autant plus que certaines souches plus virulentes provoquent des symptômes graves. Ainsi, bien que la première description de psittacose remonte à la fin du XIXème siècle, de nombreuses connaissances sur son agent étiologique, et sur l'ordre des *Chlamydiales* de façon générale, restent à acquérir.

Notre étude, qui a porté sur 82 rapaces de l'Oregon, a mis en évidence la présence de *C. psittaci* chez seulement l'un d'entre eux, contrastant avec certaines données précédentes concernant la prévalence élevée de cette bactérie chez les oiseaux. De plus, nous avons également identifié une nouvelle espèce de CLO chez une buse à queue rousse, à notre connaissance jamais décrite jusque-là. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication scientifique en premier auteur dans *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* en 2016, en annexe 3 (Jouffroy et al., 2016).

Ces 20 dernières années, les avancées en biologie moléculaire ont permis l'identification de nombreuses nouvelles espèces de chlamydia, dont 17 depuis 2013. Huit nouvelles familles ont vu le jour. Les progrès de la génomique apportent des précisions sur les espèces et souches connues, aboutissant ainsi à de nouveaux classements, de nouvelles espèces dans la famille pourtant connue des *Chlamydiaceae* et permettant d'élucider quelques aspects évolutifs des *Chlamydia*. L'identification moléculaire des bactéries est devenue plus aisée et plus rapide que les techniques de sérologie et d'identification moléculaire après mise en culture. Elles sont toutefois à utiliser avec précaution : la mise en évidence d'un panel insoupçonné d'hôtes pour les *Chlamydiales* doit pousser vers une identification précise des séquences amplifiées. Si l'identification de nouvelles bactéries est rapide, elle n'est pas toujours accompagnée de données de biologie et de pathogénie. De nombreuses études restent à faire afin de déterminer d'une part la prévalence de certaines bactéries dans les différentes populations, et d'autre part afin d'évaluer le pouvoir pathogène de bactéries nouvellement identifiées.

La génomique permet de plus d'identifier des gènes codant des facteurs de virulence et d'identifier des éléments génétiques transmis entre bactéries intracellulaire de cet ordre. Si

pour l'instant des résistances aux antibiotiques ont seulement été identifiées chez *Chlamydia suis*, un transfert horizontal de gènes de résistance de *C. suis* à d'autres espèces de *Chlamydiaceae* (*C. trachomatis* et *C. muridarum*) a été démontré *in vitro*. Le transfert de résistance aux antibiotiques est un problème majeur pour le traitement des infections aux *Chlamydia*, entre autres pour le traitement des trachomes et des maladies vénériennes dus à *C. trachomatis* chez l'homme. Au vu du portage des *Chlamydia* par les oiseaux, l'utilisation importante des tétracyclines en élevages de volailles pourrait faire émerger des résistances. Ainsi, considérant cette bactérie à prévalence forte chez certaines espèces aviaires, à réservoirs multiples et à fort potentiel zoonotique, la mise au point d'un vaccin commercialisable contre *Chlamydia psittaci* serait une perspective très intéressante.

Références bibliographiques

- Aaziz, R., Gourlay, P., Vorimore, F., Sachse, K., Siarkou, V.I., and Laroucau, K. (2015). Chlamydiaceae in North Atlantic Seabirds Admitted to a Wildlife Rescue Center in Western France. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 4581–4590.
- AbdelRahman, Y.M., and Belland, R.J. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol. Rev.* *29*, 949–959.
- Andersen, A.A. (1996). Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.* *8*, 448–450.
- Andersen, A.A., Grimes, J.E., and Wyrick, P.B. (1997). Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis). In *Diseases of Poultry*, (B.W. Calnek), pp. 333–349.
- Asman, M., Nowak-Chmura, M., Solarz, K., Szilman, E., Semla, M., and Zyśk, B. (2017). *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodida) ticks collected from Slowinski National Park (Northern Poland). *J. Vector Ecol.* *42*, 200–202.
- Bas, S., Neff, L., Vuillet, M., Spenato, U., Seya, T., Matsumoto, M., and Gabay, C. (2008). The Proinflammatory Cytokine Response to *Chlamydia trachomatis* Elementary Bodies in Human Macrophages Is Partly Mediated by a Lipoprotein, the Macrophage Infectivity Potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J. Immunol.* *180*, 1158–1168.
- Bedson, S.P., and Bland, J.O.W. (1934). The developmental forms of psittacosis virus. *Br. J. Exp. Pathol.* *15*, 243.
- Beeckman, D.S.A., and Vanrompay, D.C.G. (2009). Zoonotic *Chlamydia psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* *15*, 11–17.
- Blomqvist, M., Christerson, L., Waldenström, J., Lindberg, P., Helander, B., Gunnarsson, G., Herrmann, B., and Olsen, B. (2012). *Chlamydia psittaci* in birds of prey, Sweden. *Infect. Ecol. Epidemiol.* *2*.
- Borel, N., Dumrese, C., Ziegler, U., Schifferli, A., Kaiser, C., and Pospischil, A. (2010). Mixed infections with *Chlamydia* and porcine epidemic diarrhea virus—a new in vitro model of chlamydial persistence. *BMC Microbiol.* *10*, 201.
- Branley, J.M., Weston, K.M., England, J., Dwyer, D.E., and Sorrell, T.C. (2014). Clinical features of endemic community-acquired psittacosis. *New Microbes New Infect.* *2*, 7–12.
- Burnard, D., Weaver, H., Gillett, A., Loader, J., Flanagan, C., and Polkinghorne, A. (2017). Novel Chlamydiales genotypes identified in ticks from Australian wildlife. *Parasit. Vectors* *10*.
- Caldwell, H.D., and Belden, E.L. (1973). Studies of the role of *Dermacentor occidentalis* in the transmission of bovine chlamydial abortion. *Infect. Immun.* *7*, 147–151.

- Casson, N., Posfay-Barbe, K.M., Gervais, A., and Greub, G. (2008). New Diagnostic Real-Time PCR for Specific Detection of *Parachlamydia acanthamoebae* DNA in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 1491–1493.
- Chan, J., Doyle, B., Branley, J., Sheppeard, V., Gabor, M., Viney, K., Quinn, H., Janover, O., McCready, M., and Heller, J. (2017). An outbreak of psittacosis at a veterinary school demonstrating a novel source of infection. *One Health* *3*, 29–33.
- Cheng, Y.-J., Lin, K.-Y., Chen, C.-C., Huang, Y.-L., Liu, C.-E., and Li, S.-Y. (2013). Zoonotic atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: First reported psittacosis case in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* *112*, 430–433.
- Chu, J., Zhang, Q., Zhang, T., Han, E., Zhao, P., Khan, A., He, C., and Wu, Y. (2016). *Chlamydia psittaci* infection increases mortality of avian influenza virus H9N2 by suppressing host immune response. *Sci. Rep.* *6*.
- Constantinescu, O., and Scott, Y.G. (2008). *Chlamydophila psittaci* in a 48-Year-Old Man with Respiratory Failure. *Hosp. Physician* *44*, 45.
- Corsaro, D., and Venditti, D. (2015). Detection of novel *Chlamydiae* and *Legionellales* from human nasal samples of healthy volunteers. *Folia Microbiol. (Praha)* *60*, 325–334.
- Corsaro, D., Thomas, V., Goy, G., Venditti, D., Radek, R., and Greub, G. (2007). “*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*”, an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blattella orientalis* (Insecta: Blattodea). *Syst. Appl. Microbiol.* *30*, 221–228.
- Crosse, B. (1990). Psittacosis: A clinical review. *J. Infect.* 251–259.
- Croxatto, A., Rielle, N., Kernif, T., Bitam, I., Aeby, S., Péter, O., and Greub, G. (2014). Presence of *Chlamydiales* DNA in ticks and fleas suggests that ticks are carriers of *Chlamydiae*. *Ticks Tick-Borne Dis.* *5*, 359–365.
- Cuny, C., Friedrich, A., Kozytska, S., Layer, F., Nübel, U., Ohlsen, K., Strommenger, B., Walther, B., Wieler, L., and Witte, W. (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* *300*, 109–117.
- Derbigny, W.A., Shobe, L.R., Kamran, J.C., Toomey, K.S., and Ofner, S. (2012). Identifying a Role for Toll-Like Receptor 3 in the Innate Immune Response to *Chlamydia muridarum* Infection in Murine Oviduct Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *80*, 254–265.
- Dickx, V., Geens, T., Deschuyffeleer, T., Tyberghien, L., Harkinezhad, T., Beeckman, D.S.A., Braeckman, L., and Vanrompay, D. (2010). *Chlamydophila psittaci* Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 3244–3250.
- Docherty, D.E., Franson, J.C., Brannian, R.E., Long, R.R., Radi, C.A., Krueger, D., and Johnson, R.F. (2012). Avian botulism and avian chlamydiosis in wild water birds, Benton Lake National Wildlife Refuge, Montana, USA. *J. Zoo Wildl. Med.* *43*, 885–888.

- Dreses-Werringloer, U., Padubrin, I., Jürgens-Saathoff, B., Hudson, A.P., Zeidler, H., and Köhler, L. (2000). Persistence of *Chlamydia trachomatis* is induced by ciprofloxacin and ofloxacin in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 3288–3297.
- Drobne, D., Strus, J., Znidarsic, N., and Zidar, P. (1999). Morphological description of bacterial infection of digestive glands in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *J Invertebr Pathol* *73*, 113–119.
- Eddie, B., Meyer, K.F., Lambrecht, F.L., and Furman, D.P. (1962). Isolation of Ornithosis *Bedsoniae* from Mites Collected in Turkey Quarters and from Chicken Lice. *J. Infect. Dis.* *110*, 231–237.
- Elsik, C.G., Tellam, R.L., and Worley, K.C. (2009). The Genome Sequence of Taurine Cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science* *324*, 522–528.
- Elwell, C.A., and Engel, J.N. (2012). Lipid acquisition by intracellular *Chlamydiae*: Lipid acquisition by *Chlamydiae*. *Cell. Microbiol.* *14*, 1010–1018.
- Everett, K.D., Bush, R.M., and Andersen, A.A. (1999a). 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *49*, 415–440.
- Everett, K.D., Hornung, L.J., and Andersen, A.A. (1999b). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *J. Clin. Microbiol.* *37*, 575–580.
- Flammer, K. (1997). In *Avian Medicine and Surgery*, (Philadelphia, PA), p.
- Flammer, K., Whitt-Smith, D., and Papich, M. (2001). Plasma Concentrations of Doxycycline in Selected Psittacine Birds When Administered in Water for Potential Treatment of *Chlamydophila psittaci* Infection. *J. Avian Med. Surg.* *15*, 276–282.
- Flammer, K., Trogdon, M.M., and Papich, M. (2003). Assessment of plasma concentrations of doxycycline in budgerigars fed medicated seed or water. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *223*, 993–998.
- Fowler, M.E., Schulz, T., Ardans, A., Reynolds, B., and Behymer, D. (1990). Chlamydiosis in Captive Raptors. *Avian Dis.* *34*, 657.
- Gaede, W., Reckling, K.-F., Dresenkamp, B., Kenklies, S., Schubert, E., Noack, U., Irmscher, H.-M., Ludwig, C., Hotzel, H., and Sachse, K. (2008). *Chlamydophila psittaci* Infections in Humans during an Outbreak of Psittacosis from Poultry in Germany. *Zoonoses Public Health* *55*, 184–188.
- Gartrell, B.D., French, N.P., Howe, L., Nelson, N.J., Houston, M., Burrows, E.A., Russell, J.C., and Anderson, S.H. (2013). First detection of *Chlamydia psittaci* from a wild native passerine bird in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* *61*, 174–176.

- Geens, T., Dewitte, A., Boon, N., and Vanrompay, D. (2005). Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet. Res.* *36*, 787–797.
- Gosbell, I.B., Ross, A.D., and Turner, I.B. (1999). *Chlamydia psittaci* infection and reinfection in a veterinarian. *Aust. Vet. J.* *77*.
- Goy, G., Croxatto, A., Posfay-Barbe, K.M., Gervaix, A., and Greub, G. (2009). Development of a real-time PCR for the specific detection of *Waddlia chondrophila* in clinical samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *28*, 1483–1486.
- Grogan, A., and Kelly, A. (2013). A review of RSPCA research into wildlife rehabilitation. *Vet. Rec.* *172*, 211–211.
- Gutierrez-Martin, C., Ojcius, D.M., Ru-Ching, H., Hellio, R., Bavoil, P.M., and Dautry-Varsat, A. (1997). Heparin-mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. 47–57.
- Hackstadt, T., Scidmore, M.A., and Rockey, D.D. (1995). Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 4877–4881.
- Hafez, H.M., and Sting, R. (1997). Über das Vorkommen von Chlamydien-Infektionen beim Mastegeflügel. *Tierärztl Umsch.* *52*, 281–285.
- Haider, S., Collingro, A., Walochnik, J., Wagner, M., and Horn, M. (2008). *Chlamydia*-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients: *Chlamydia*-like bacteria in CAP patients. *FEMS Microbiol. Lett.* *281*, 198–202.
- Harkinezhad, T., Verminnen, K., Van Droogenbroeck, C., and Vanrompay, D. (2007). *Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. *J. Med. Microbiol.* *56*, 1097–1100.
- Harkinezhad, T., Verminnen, K., De Buyzere, M., Rietzschel, E., Bekaert, S., and Vanrompay, D. (2009a). Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J. Med. Microbiol.* *58*, 1207–1212.
- Harkinezhad, T., Geens, T., and Vanrompay, D. (2009b). *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet. Microbiol.* *135*, 68–77.
- Harper, A., Pogson, C.I., Jones, M.L., and Pearce, J.H. (2000). Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect. Immun.* *68*, 1457–1464.
- Heddema, E.R., Van Hannen, E.J., Duim, B., Vandenbroucke-Grauls, C.M., and Pannekoek, Y. (2006a). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 1989.
- 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., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (2006b). An outbreak of psittacosis due

to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* *55*, 1571–1575.

Hein, W.R., and Griebel, P.J. (2003). A road less travelled : large animal models in immunological research. *Nat. Rev. Immunol.* *3*.

Henning, K., Reinhold, P., Hotzel, H., and Moser, I. (2008). Outbreak of a *Chlamydophila psittaci* infection in laboratory rats. *Bull Vet Inst Pulawy* *52*, 347–349.

Herring, A.J. (1993). Typing *Chlamydia psittaci*, a review of recent findings. *Br Vet Jourr* *149*.

Herrmann, B., Persson, H., Jensen, J.-K., Joensen, H.D., Klint, M., and Olsen, B. (2006). *Chlamydophila psittaci* in Fulmars, the Faroe Islands. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 330–332.

Heuer, D., Lipinski, A.R., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2009). *Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. *Nature* *457*, 731–735.

Hildes, J.A., Parker, W.L., Delaat, A., Stackiw, W., and Wilt, J.C. (1965). The elusive source of psittacosis in the Arctic. *Can. Med. Assoc. J.* *93*, 1154.

Hokynar, K., Sormunen, J., Vesterinen, E., Partio, E., Lilley, T., Timonen, V., Panelius, J., Ranki, A., and Puolakkainen, M. (2016). *Chlamydia*-Like Organisms (CLOs) in Finnish *Ixodes ricinus* Ticks and Human Skin. *Microorganisms* *4*, 28.

Hokynar, K., Vesterinen, E.J., Lilley, T.M., Pulliainen, A.T., Korhonen, S.J., Paavonen, J., and Puolakkainen, M. (2017). Molecular evidence of *Chlamydia*-like organisms in the feces of *Myotis daubentonii* bats. *Appl. Environ. Microbiol.* *83*, e02951–16.

Hsia, R., Ohayon, H., Gounon, P., Dautry-Varsat, A., and Bavoil, P.M. (2000). Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis. *Microbes Infect.* *2*, 761–772.

Jaton, K., Bille, J., and Greub, G. (2006). A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *J. Med. Microbiol.* *55*, 1667–1674.

Jones, H., Rake, G., and Stearns, B. (1945). Studies on Lymphogranuloma Venereum, the action of sulfonamides on the agent of Lymphogranuloma Venereum. *J. Infect. Dis.* *76*, 55–69.

Jouffroy, S.J., Schlueter, A.H., Bildfell, R.J., and Rockey, D.D. (2016). *Rhabdochlamydia* spp. in an Oregon raptor. *J. Vet. Diagn. Invest.* *28*, 473–476.

Kaleta, E.F., and Taday, E.M.A. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol. J. WVPA* *32*, 435–461.

Kalmar, I.D., Dicxk, V., Dossche, L., and Vanrompay, D. (2014). Zoonotic infection with *Chlamydia psittaci* at an avian refuge centre. *Vet. J. Lond. Engl.* *1997* *199*, 300–302.

- Kauffold, J., Melzer, F., Berndt, A., Hoffmann, G., Hotzel, H., and Sachse, K. (2006). Chlamydiae in oviducts and uteri of repeat breeder pigs. *Theriogenology* *66*, 1816–1823.
- Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H., and Melzer, F. (2007). The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Anim. Reprod. Sci.* *102*, 111–121.
- Kemmerling, K., Müller, U., Mielenz, M., and Sauerwein, H. (2009). Chlamydophila species in dairy farms: Polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *J. Dairy Sci.* *92*, 4347–4354.
- Knittler, M.R., and Sachse, K. (2015). Chlamydia psittaci: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathog. Dis.* *73*, 1–15.
- Koene, R., Hautvast, J., Züchner, L., Voorn, P., Rooyackers-Lemmen, E., Noel, H., and Swaan, C. (2007). Local cluster of psittacosis after bird show in the Netherlands, November 2007. *Euro Surveill* *12*, 3328.
- Kostanjsek, R., Strus, J., Drobne, D., and Avgustin, G. (2004). “Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis”, an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *54*, 543–549.
- Kutlin, A., Flegg, C., Stenzel, D., Reznik, T., Roblin, P.M., Mathews, S., Timms, P., and Hammerschlag, M.R. (2001). Ultrastructural Study of Chlamydia pneumoniae In a Continuous-Infection Model. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 3721–3723.
- Lagae, S., Kalmar, I., Laroucau, K., Vorimore, F., and Vanrompay, D. (2014). Emerging Chlamydia psittaci infections in chickens and examination of transmission to humans. *J. Med. Microbiol.* *63*, 399–407.
- Lamoth, F., Aeby, S., Schneider, A., Jatou-Ogay, K., Vaudaux, B., and Greub, G. (2009). Parachlamydia and Rhabdochlamydia in Premature Neonates. *Vet. Microbiol.* *15*, 2072–2074.
- Lamoth, F., Jatou, K., Vaudaux, B., and Greub, G. (2011). Parachlamydia and Rhabdochlamydia: emerging agents of community-acquired respiratory infections in children. *Clin. Infect. Dis.* *cir420*.
- Lenzko, H., Moog, U., Henning, K., Lederbach, R., Diller, R., Menge, C., Sachse, K., and Sprague, L.D. (2011). High frequency of chlamydial co-infections in clinically healthy sheep flocks. *BMC Vet. Res.* *7*, 29.
- Lienard, J., Croxatto, A., Aeby, S., Jatou, K., Posfay-Barbe, K., Gervaix, A., and Greub, G. (2011). Development of a New Chlamydiales-Specific Real-Time PCR and Its Application to Respiratory Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 2637–2642.
- Lienard, J., Croxatto, A., Gervaix, A., Lévi, Y., Loret, J.-F., Posfay-Barbe, K.M., and Greub, G. (2017). Prevalence and diversity of Chlamydiales and other amoeba-resisting bacteria in domestic drinking water systems. *New Microbes New Infect.* *15*.

- Longbottom, D., and Coulter, L.J. (2003). Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. *J. Comp. Pathol.* *128*, 217–244.
- Loock, M.V., Geens, T., Smit, L.D., Nauwynck, H., Empel, P.V., Naylor, C., Hafez, H.M., Goddeeris, B.M., and Vanrompay, D. (2005). Key role of *Chlamydia psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. *Vet. Microbiol.* *107*, 91–101.
- Magnino, S., Haag-Wackernagel, D., Geigenfeind, I., Helmecke, S., Dovč, A., Prukner-Radovčić, E., Residbegović, E., Ilieski, V., Laroucau, K., Donati, M., et al. (2009). Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Vet. Microbiol.* *135*, 54–67.
- Matsumoto, A., and Manire, G.P. (1970). Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J. Bacteriol.* *101*, 278–285.
- Maxted, A.M., Midla, J.W., Edling, T.M., Fish, P.H., Hyde, D., Kutty, P.K., Kobayashi, M., Bettina Helm, D.V.M., and others (2017). Compendium of Measures to Control *Chlamydia psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2017. *J. Avian Med. Surg.* *31*, 000–000.
- McGuigan, C.C., McIntyre, P.G., and Templeton, K. (2012). Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2011 to February 2012. *Euro Surveill* *17*, 20186.
- McKercher, D.G., Wada, E.M., Ault, S.K., and Theis, J.H. (1980). Preliminary studies of transmission of *Chlamydia* to cattle by ticks (*Ornithodoros coriaceus*).
- Meyer, K.F., and Eddie, B. (1933). Latent psittacosis infections in shell parakeets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *30*, 484–488.
- Miyairi, I., Laxton, J.D., Wang, X., Obert, C.A., Arva Tatireddigari, V.R.R., van Rooijen, N., Hatch, T.P., and Byrne, G.I. (2011). *Chlamydia psittaci* Genetic Variants Differ in Virulence by Modulation of Host Immunity. *J. Infect. Dis.* *204*, 654–663.
- Moulder, J.W. (1966). The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. *Annu Rev Microbiol* *20*, 107–130.
- Newman, C.P.S.J., Palmer, S.R., Kirby, F.D., and Caul, E.O. (1992). A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. *Epidemiol. Infect.* *108*, 203–210.
- Niemi, S., Greub, G., and Puolakkainen, M. (2011). *Chlamydia*-related bacteria in respiratory samples in Finland. *Microbes Infect.* *13*, 824–827.
- Olsen, B., Persson, K., and Broholm, K.-A. (1998). PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiol. Infect.* *121*, 481–484.
- Opota, O., Vanrompay, D., Greub, G., Branley, J., Longbottom, D., Erard, V., Jaton, K., and Borel, N. (2015). Improving the molecular diagnosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* infection with a species-specific duplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* *64*, 1174–1185.

- Ossewaarde, J.M., and Meijer, A. (1999). Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology* 145, 411–417.
- Ostermann, C., Schroedl, W., Schubert, E., Sachse, K., and Reinhold, P. (2013). Dose-dependent effects of *Chlamydia psittaci* infection on pulmonary gas exchange, innate immunity and acute-phase reaction in a bovine respiratory model. *Vet. J.* 196, 351–359.
- Page, L.A. (1959). Experimental Ornithosis in Turkeys. *Avian Dis.* 3, 51–66.
- Page, L.A. (1966). Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 16, 223–252.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., and Sachse, K. (2010). Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 473–484.
- Pantoja, L.G., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Molestina, R.E., and Summersgill, J.T. (2001). Characterization of *Chlamydia pneumoniae* Persistence in HEp-2 Cells Treated with Gamma Interferon. *Infect. Immun.* 69, 7927–7932.
- Papp, J.R., and Shewen, P.E. (1996). Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. *J. Infect. Dis.* 174, 1296–1302.
- Petrovay, F., and Balla, E. (2008). Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J. Med. Microbiol.* 57, 1296–1298.
- Pilloux, L., Aeby, S., Gaümann, R., Burri, C., Beuret, C., and Greub, G. (2015). The High Prevalence and Diversity of Chlamydiales DNA within *Ixodes ricinus* Ticks Suggest a Role for Ticks as Reservoirs and Vectors of Chlamydia-Related Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 8177–8182.
- Porrero, M.C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Garayzábal, J.-F., and Domínguez, L. (2014). Carriage of *Staphylococcus aureus* by Free-Living Wild Animals in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4865–4870.
- Pospischil, A., Borel, N., and Andersen, A.A. (2010). Chlamydia. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, (Ames, Iowa: Carlton L. Gyles, John F. Prescott, J. Glenn Songer, Charles O.Thoen), pp. 575–588.
- Radek, R. (2000). Light and Electron Microscopic Study of a Rickettsiella Species from the Cockroach *Blattella orientalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 249–256.
- Ramanathan, K., and Waidyasekara, P. (2015). Fulminant psittacosis in a traveller. *JMM Case Rep.* 2.
- Raso, T.F., Carrasco, A.O.T., Silva, J.C.R., Marvulo, M.F.V., and Pinto, A.A. (2010). Seroprevalence of Antibodies to *Chlamydophila psittaci* in Zoo Workers in Brazil: Human seroprevalence to *Chlamydophila psittaci*. *Zoonoses Public Health* 57, 411–416.

Raulston, J.E. (1997). Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infect. Immun.* *65*, 4539–4547.

Read, T.D., Joseph, S.J., Didelot, X., Liang, B., Patel, L., and Dean, D. (2013). Comparative Analysis of *Chlamydia psittaci* Genomes Reveals the Recent Emergence of a Pathogenic Lineage with a Broad Host Range. *mBio* *4*, e00604-12-e00604-12.

Rehn, M., Ringberg, H., Runehagen, A., Herrmann, B., Olsen, B., Petersson, A.C., Hjertqvist, M., Kühlmann-Berenzon, S., and Wallensten, A. (2013). Unusual increase of psittacosis in southern Sweden linked to wild bird exposure, January to April 2013. *Euro Surveill* *18*, 20478.

Reinhold, P., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Vogel, A., Lambertz, J., Rothe, M., Rüttger, A., Schubert, E., and Sachse, K. (2012). A Bovine Model of Respiratory *Chlamydia psittaci* Infection: Challenge Dose Titration. *PLoS ONE* *7*, e30125.

Riond, J.L., and Rivière, J.E. (1988). Pharmacology and toxicology of Doxycycline. *Vet. Hum. Toxicol.* *30*, 431–443.

Rivière, J.E., and Papich, M. (2009). Tetracycline Antibiotics. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, (Wiley-Blackwell), p.

Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H.H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., et al. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* *37*, 79–88.

Salamin, N., Bertelli, C., Greub, G., and Pillonel, T. (2015). Taxogenomics of the order Chlamydiales. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *65*, 1381–1393.

Schachter, J., Stephens, R.S., Timms, P., Kuo, C., Bavoil, P.M., Birkelund, S., Boman, J., Caldwell, H., Campbell, L.A., Chernesky, M., et al. (2001). Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 249–249.

Schettler, E., Fickel, J., Hotzel, H., Sachse, K., Streich, W.J., Wittstatt, U., and Frölich, K. (2003). Newcastle disease virus and *Chlamydia psittaci* in free-living raptors from eastern Germany. *J. Wildl. Dis.* *39*, 57–63.

Scidmore, M.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (2003). Restricted Fusion of *Chlamydia trachomatis* Vesicles with Endocytic Compartments during the Initial Stages of Infection. *Infect. Immun.* *71*, 973–984.

Sharples, E., and Baines, S.J. (2009). Prevalence of *Chlamydia psittaci*-positive cloacal PCR tests in wild avian casualties in the UK. *Vet. Rec.* *164*, 16–17.

Shewen, P.E. (1980). Chlamydial Infection in Animals: A Review. *Can. Vet. J.* *21*, 2–11.

Sivabalan, P., Saboo, A., Yew, J., and Norton, R. (2017). Q fever in an endemic region of North Queensland, Australia: A 10 year review. *One Health* *3*, 51–55.

- Smith, F.D., and Wall, L.E.R. (2013). Prevalence of Babesia and Anaplasma in ticks infesting dogs in Great Britain. *Vet. Parasitol.* *198*, 18–23.
- Smith, K.A., Campbell, C.T., Murphy, J., Stobierski, M.G., and Tengelsen, L.A. (2011). Compendium of measures to control Chlamydophila psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). *J. Exot. Pet Med.* *20*, 32–45.
- Song, L., Li, Y., Liu, G., He, J., Zhu, H., and Duan, Q. (2009). Genotyping of Chlamydophila psittaci strains derived from avian and mammalian species. *Vet. Res. Commun.* *33*, 577–580.
- Spoorenberg, S.M., Bos, W.J., van Hannen, E.J., Dijkstra, F., Heddema, E.R., van Velzen-Blad, H., Heijligenberg, R., Grutters, J.C., and de Jongh, B.M. (2016). Chlamydia psittaci: a relevant cause of community-acquired pneumonia in two Dutch hospitals. *Neth J Med* *74*, 75–81.
- Stephens, R.S., Myers, G., Eppinger, M., and Bavoil, P.M. (2009). Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *55*, 115–119.
- Stewardson, A.J., and Grayson, M.L. (2010). Psittacosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *24*, 7–25.
- STORZ, J., and 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *21*, 332–334.
- Szeredi, L., Hotzel, H., and Sachse, K. (2005). High prevalence of chlamydial (Chlamydophila psittaci) infection in fetal membranes of aborted equine fetuses. *Vet. Res. Commun.* *29*, 37–49.
- Taylor-Brown, A., and Polkinghorne, A. (2017). New and emerging chlamydial infections of creatures great and small. *New Microbes New Infect.* *18*, 28–33.
- Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., and Polkinghorne, A. (2015). Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathog. Dis.* *73*, 1–15.
- Taylor-Brown, A., Bachmann, N.L., Borel, N., and Polkinghorne, A. (2016). Culture-independent genomic characterisation of Candidatus Chlamydia sanzina, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. *BMC Genomics* *17*.
- Teankum, K., Pospischil, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Weilenmann, R., Zimmermann, D.R., Gerber, A., Polkinghorne, A., et al. (2007). Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* *67*, 303–310.
- Theegarten, D., Sachse, K., Mentrup, B., Fey, K., Hotzel, H., and Anhenn, O. (2008). Chlamydophila spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Respir. Res.* *9*.

- Thomas, V., Casson, N., and Greub, G. (2006). *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environ. Microbiol.* *8*, 2125–2135.
- TMOKO, P., Fukushi, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T., and HIRAI, K. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *47*, 425–431.
- Twomey, D.F., Griffiths, P.C., Horigan, M.W., Hignett, B.C., and Martin, T.P. (2006). An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease. *Vet. J.* *171*, 574–576.
- Vanrompay, D., Butaye, P., Sayala, C., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (1997a). Characterization of avian *Chlamydia Psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.* 327–333.
- Vanrompay, D., Butaye, P., Van Nerom, A., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F. (1997b). The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults. *Vet. Microbiol.* *54*, 85–93.
- Vanrompay, D., Geens, T., Desplanques, A., Hoang, T.Q., Vos, L.D., Loock, M.V., Huyck, E., Mirry, C., and Cox, E. (2004). Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms. *Vet. Microbiol.* *99*, 59–66.
- Vanrompay, D., Harkinezhad, T., Van de Walle, M., Beeckman, D., Van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A., and Cauwerts, K. (2007). *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 1108.
- Verminnen, K., Duquenne, B., De Keukeleire, D., Duim, B., Pannekoek, Y., Braeckman, L., and Vanrompay, D. (2008). Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* Infection Diagnostic Platform for Zoonotic Risk Assessment. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 281–285.
- Virginia Powers, L., Flammer, K., and Papich, M. (2000). Preliminary Investigation of Doxycycline Plasma Concentrations in Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) After Administration by Injection or in Water or Feed. *J. Avian Med. Surg.* *14*, 23–30.
- Vlahović, K., Matica, B., Bata, I., Pavlak, M., Pavičić, Ž., Popović, M., Nejedli, S., and Dovč, A. (2004). *Campylobacter*, *salmonella* and *chlamydia* in free-living birds of Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* *50*, 127–132.
- Vorimore, F., Hsia, R., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., and Laroucau, K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS ONE* *8*, e74823.
- Wallensten, A., Fredlund, H., and Runehagen, A. (2014). Multiple human-to-human transmission from a severe case of psittacosis, Sweden, January–February 2013. *Euro Surveill* *19*.

- Wannaratana, S., Thontiravong, A., Amonsin, A., and Pakpinyo, S. (2017). Persistence of *Chlamydia psittaci* in various temperatures and times. *Avian Dis.* *61*, 40–45.
- Ward, M.E. (1988). The chlamydial developmental cycle. In *Microbiology of Chlamydia*, (CRC Press), p.
- Wardyn, S.E., Kauffman, L.K., and Smith, T.C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Iowa wildlife. *J. Wildl. Dis.* *48*, 1069–1073.
- Welti, M., Jaton, K., Altwegg, M., Sahli, R., Wenger, A., and Bille, J. (2003). Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *45*, 85–95.
- Wheelhouse, N., Katzer, F., Wright, F., and Longbottom, D. (2010). Novel *Chlamydia*-like Organisms as Cause of Bovine Abortions, UK. *Emerg. Infect. Dis.* *16*.
- Wheelhouse, N., Sait, M., Gidlow, J., Deuchande, R., Borel, N., Baily, J., Caldwell, G., and Longbottom, D. (2011). Molecular detection of *Chlamydia*-like organisms in cattle drinking water. *Vet. Microbiol.* *152*, 196–199.
- Wicki, R., Sauter, P., Mettler, C., Natsch, A., Enzler, T., Pusterla, N., Kuhnert, P., Egli, G., Bernasconi, M., Lienhard, R., et al. (2000). Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *19*, 427–432.
- Williams, J., Tallis, G., Dalton, C., Sally, N., Beaton, S., Catton, M., Elliott, J., and Carnie, J. (1998). Community outbreak of psittacosis in a rural Australian town. *The Lancet* *351*.
- Wittenbrink, M.M., Mrozek, M., and Bisping, W. (1993). Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg: evidence of egg transmission. *J. Vet. Med.* 451–452.
- Wobeser, G., and Brand, C.J. (1982). Chlamydiosis in 2 biologists investigating disease occurrences in wild waterfowl. *Wildl. Soc. Bull.* *10*, 170–172.
- Wyrick, P.B., and Richmond, S.J. (1989). Biology of *Chlamydia*. *J. Am. Vet. Med.* *195*, 1507–1512.
- Zucca, E., and Bertoni, F. (2006). *Chlamydia* or Not *Chlamydia*, That Is the Question: Which Is the Microorganism Associated With MALT Lymphomas of the Ocular Adnexa? *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 1348–1349.

Annexe 1: Fiche accompagnant les prélèvements, à être complétées par les centres

Raptor Pathogen Survey

Facility _____

Date of intake and sampling _____

Identification for bird (facility records) _____

Location _____ bird
collected _____

Species _____

Gender (circle one) F M

Unknown

Age (circle one)

Adult

After hatch year

Hatch year


Unknown


Reason for presentation to facility _____

Sampling procedure:

Use one swab to sample oral cavity, especially along dorsal aspect (choanal area).

Use a different swab to sample cloaca.

Cut oral swab so it fits into plastic tube with **Red O**. Snap top closed. 

Cut cloacal swab so it fits into plastic tube with **Black C**. Snap top closed. 

Check circles above to confirm which samples have been taken (both preferred).

Place this sheet in the collection bag, along with tubes, and hold in freezer until transport to OSUVDL. If possible, use Sharpie to put bird identification on bag.

Oral/choanal swab

Cloacal swab



Follow-up. Please use this space to provide outcome on case if any is available before swabs are sent to OSU. (ie. bird released/died/euthanized/long term care).

Don't worry if this does not get completed, as we can phone you for the information if necessary.

Annexe 2 : Lettre d'explication pour les centres de la faune sauvage

Sophie Jouffroy
Veterinary student
857-303-0730
s.jouffroy_12@envt.fr
For: Raptor pathogen survey

Hello,

I may have contacted you by phone on June 25th. If not, let me introduce myself; I am a second year veterinary student and this summer I am working on a research project at the Oregon State University with Dr Bildfell and Dr Rockey. The project involves testing birds for bacteria that can transfer to humans (*Chlamydia psittaci*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*). We are especially focusing on raptors (Any hawk, eagle, owls or vulture is of interest).

In order to do this study, we need samples from the **oral cavity** and the **cloaca** of raptors.

One sampling kit is needed for each bird. One sampling kit consists of:

- 2 sterile swabs
- 2 tubes
- 1 collection bag (Whirl-Pak)
- 1 identification sheet (called "Raptor pathogen survey") with instructions.

We are interested in **live raptors of any age**, and dead birds if the corpse is not too old. The sampling should be done **during intake of the raptor to your facility**. **After collection the samples should be stored in a freezer until pick up.**

Thank you very much for your time and help,
I am available for further questions or comments,

Sophie Jouffroy

Annexe 3 : Article publié dans le Journal of Veterinary Diagnostic Investigation à la suite de l'étude

Rhabdochlamydia spp. in an Oregon raptor

Sophie J. Jouffroy, Andrew H. Schlueter, Robert J. Bildfell,
Daniel D. Rockey¹

Abstract. PCR-based approach was used to examine the rate of *Chlamydia* positivity in raptors from wild bird rehabilitation centers in Oregon. Three of 82 birds were identified as positive for *Chlamydia* with this PCR. Sequence analysis of 16S ribosomal DNA from 2 of these birds confirmed the presence of DNA from phylum Chlamydiae. One bird was positive for *Chlamydia psittaci* in both choanal and cloacal swabs. The second bird, a louse-infested red-tailed hawk, had evidence of choanal colonization by “*Candidatus Rhabdochlamydia*” spp. Our study describes evidence of this *Chlamydia*-like organism in the United States. This survey also suggests that the carriage rate of *C. psittaci* is low in raptors in Oregon wild bird rehabilitation centers, and that care must be taken in the design of PCR primers for phylum Chlamydiae such that colonization by insect endosymbionts is not mistaken for an infection by known chlamydial pathogens.

Key words: Raptors; *Rhabdochlamydia*.

Table 1. *Chlamydiales*-specific oligonucleotides used for polymerase chain reaction analysis of 16S and 18S ribosomal DNA (rDNA) sequences from raptor choanal and cloacal samples. The position in the 16S rDNA coding sequence is included, using the first base pair in the 16S rDNA transcript as position 1.

Name	Sequence	Position	Reference
Chlam16SF	GTGGATGAGGCATGCRAAGTCGA	44–65	10
Chlam16SR	CTCTCAATCCGCCTAGACGTC	295–315	10
16SIGF	CGGCGTGGATGAGGCAT	40–56	3
16SIGR	TCAGTCCCAGTGTGGC	321–337	3
18S2F	CCTGGTTGATCCTGCCAGTA	3–22	Current study
18S2R	ACCAGACTTGCCCTCCAATG	606–625	Current study

Phylum Chlamydiae is a group of obligate intracellular pathogens that infect many animals and humans. Different Chlamydiae also infect invertebrates, including mollusks, insects, and protozoans.¹ *Chlamydia psittaci* is a serious zoonotic pathogen that colonizes a variety of avian species.⁶ Birds of prey are a potential host for *C. psittaci*,⁶ and a previous study conducted on captive raptors in California indicated a high percentage of *C. psittaci*-infected birds.⁴ This study, as well as the zoonotic potential of wildlife rehabilitation birds, motivated our inquiry into the prevalence of *C. psittaci* in Oregon raptors.

Samples from 82 raptors, collected in 9 different Oregon wildlife centers, were used in the prevalence study. A total of 12 different species were sampled. The Oregon State University Animal Care and Use Committee approved all animal-handling procedures. On admission, polyester swabs^a were used to sample choanal and cloacal tissues by trained staff at the rehabilitation center. The swabs were then kept at –18°C prior to laboratory analysis. Total DNA was extracted from the dry swabs using a commercial kit^b with some modifications that led to the most efficient harvesting of chlamydial DNA. The most

significant modification involved the addition of 5 mM dithiothreitol (final concentration) to the lysis buffer, and following the steps for purification of DNA from gram-positive bacteria. Body lice were also collected from 14 raptors at one rehabilitation center in Oregon, and DNA was purified using the same commercial kit and protocol. The extracted DNA was quantified by spectrophotometry^c and stored at –18°C prior to use.

A PCR assay targeting the 5'-end of the *Chlamydia* spp. 16S ribosomal DNA (rDNA) sequence was used to evaluate the presence of *Chlamydiaceae* in the birds and lice. General *Chlamydiaceae* primers¹⁰ were initially used, and a set of similar primers³ were included to confirm and expand the results (Table 1). BLAST analysis confirmed that amplification of samples with these oligonucleotide pairs would yield an amplicon from the 16S rDNA of all known

College of Veterinary Medicine, Oregon State University, Corvallis, OR.

¹Corresponding Author: Daniel D. Rockey, College of Veterinary Medicine, Oregon State University, 211 Dryden Hall, Corvallis, OR 97331-4804. rockeyd@oregonstate.edu

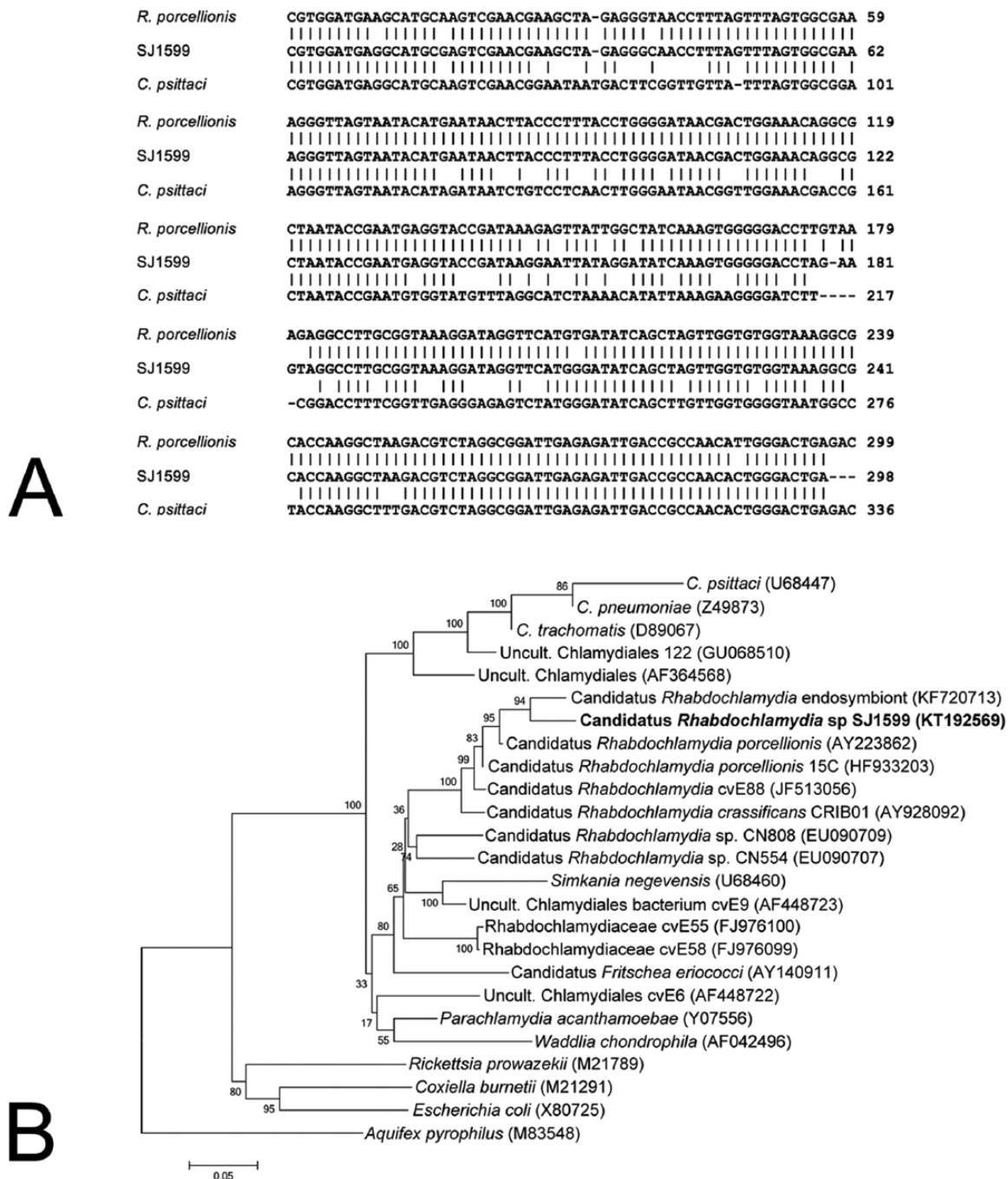


Figure 1. Taxonomic placement of the 16S ribosomal DNA (rDNA) sequence obtained from a captive red-tailed hawk. **A.** BLAST-based analysis of the 298-bp sequence obtained from the polymerase chain reaction assay. The compared 16S rDNA sequences are from *Chlamydia psittaci* strain 6BC, the red-tailed hawk sample described in the current study (SJ1599), and *Rhabdochlamydia porcellionis*. **B.** Neighbor-joining tree of Chlamydiales 16S rDNA sequences and selected outliers. The sequence identified in the current study is indicated with boldface. The scale bar at bottom left indicates the number of variable bases per nucleotide in the 298-bp sequence. Bootstrap values generated from the phylogenetic analysis program^c are indicated at each bifurcation.

C. trachomatis, *C. psittaci*, *C. avium*, *C. pecorum*, and *C. muridarum*. The PCR reaction mixtures consisted of 10 μ L of commercial master mix,^d 6 μ L of nuclease-free water, 2 μ L of template, and 1 μ L each of the forward and reverse primers (final primer concentration 5 pM). The PCR reac-

tions for amplifying louse 18S rDNA were conducted using identical methods, with the 18S rDNA-specific primers shown in Table 1. The extracted DNA was used as a positive control for the PCR targeting louse rDNA in the bird choanal samples.

After amplification, each reaction mixture was electrophoresed on a 1% agarose gel. For each assay, sterile and nuclease-free water was used as a negative control, and *Chlamydia caviae* DNA was used as a positive control. The DNA sequence was determined for PCR-amplified products in positive samples using Sanger sequencing at the Oregon State University Center for Genome Research and Biocomputing (Corvallis, Oregon).

The DNA collected from 3 different birds were PCR positive for chlamydial 16S DNA in the initial screening of choanal samples, prompting analysis of the cloacal samples as well. Cloacal samples from the other birds were not analyzed. The first of these PCR-positive birds, an osprey nestling (*Pandion haliaetus*) that presented with multiple fractures from a fall, was positive in both cloacal and choanal swabs. Sequence analysis showed that this bird was infected at both sites with *C. psittaci*. A second PCR-positive bird was an emaciated great horned owl (*Bubo virginianus*). Sequence analysis of PCR products from this bird was unsuccessful, and thus the diagnosis was incomplete. The third positive bird, a dehydrated and emaciated young red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*) with a heavy louse infestation, had a PCR-positive choanal sample but a PCR-negative cloacal sample. Nucleotide sequence analysis of PCR products from this bird, using 2 different primer pairs, demonstrated that the positive PCR did not result from *C. psittaci* infection. Clustal-based analysis of the fragment derived from the choanal sample showed clearly that this sequence was more closely related to *Rhabdochlamydia* spp. than to *C. psittaci*, or any other member of the genus *Chlamydia* (Fig. 1A, and data not shown). Phylogenetic positioning of this sequence was then analyzed using a neighbor-joining approach, conducted using a commercial package.^c These results indicated strong support for the relationship between the PCR product from our clinical sample and members of the genus *Rhabdochlamydia* (Fig. 1B). The results also confirm that sequences from *Chlamydia*-like organisms can be detected using generalized chlamydia primers, and that subsequent sequence analysis is required to confirm the actual nature of a 16S rDNA-based PCR-positive sample.

The bird that was colonized by *Rhabdochlamydia* spp. was heavily infested with lice. This observation led to the hypothesis that the bird was positive because it had been preening lice off its body, and the choana therefore became contaminated with an arthropod endosymbiont. This was not supported by our analyses, as louse-specific 18S rDNA was not amplified from the choanal swab sample, although raptor 18S DNA was amplified from the swab.

None of the 14 louse DNA preparations were positive for *Rhabdochlamydia*. These results suggest that neither birds nor lice within the geographic region serviced by these raptor centers (northwest Oregon) are routinely positive for *Rhabdochlamydia* spp. Also, because we were only able to demonstrate *C. psittaci* in 1 of 82 sampled birds, it appears that *C. psittaci* prevalence is not high in these bird populations. These data are in contrast to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-

based testing of California raptors published in 1990, in which more than 40% of animals were considered positive.⁴ As our techniques were quite different to those used in the California study (PCR vs. ELISA), and because of the lengthy time interval between the 2 studies, it is challenging to assess the meaning of the relatively high prevalence indicated in the previous study as it relates to the very low prevalence indicated in our work. A culture-based survey of wild birds in UK rehabilitation centers also reported a low percentage of positive raptors (1/9), although overall prevalence in all avian species sampled was 26%.⁷

Rhabdochlamydia is a genus currently represented by endosymbionts of arthropods in Europe,^{2,8,11} and by rDNA sequences in environmental samples obtained from a variety of sources.⁹ The presence of “*Candidatus Rhabdochlamydia*” spp. has also been documented in mammals, including cattle in Great Britain,¹² and in human respiratory specimens collected in Germany.⁵ Our study describes evidence of *Rhabdochlamydia* spp. in the United States. It is likely, however, that this is a result of the absence of directed testing and not because the organism is necessarily rare in this region of the world.

Acknowledgments

We thank the contributing raptor centers for their great help and cooperation.

Authors' contributions

SJ Jouffroy contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data; drafted the manuscript; and critically revised the manuscript. AH Schlueter contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data and critically revised the manuscript. RJ Bildfell and DD Rockey contributed to conception and design of the study; contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data; critically revised the manuscript; and gave final approval. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions relating to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Sources and manufacturers

- PurFlock Ultra, Puritan Medical Products, Guilford, ME.
- Qiagen GmBH, Hilden, Germany.
- NanoDrop Technology, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA.
- Phusion master mix, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA.
- www.megasoftware.net

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Oregon State University College of Veterinary Medicine Summer Student Research Program (VBS330 VBSR). We

also thank the National Veterinary College of Toulouse Alumni Fund for their financial support.

References

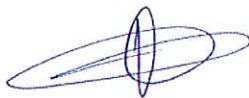
1. Corsaro D, Greub G. Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:283–297.
2. Corsaro D, et al. ‘Candidatus Rhabdochlamydia crassificans’, an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). *Syst Appl Microbiol* 2007;30:221–228.
3. Everett KD, et al. 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. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415–440.
4. Fowler ME, et al. Chlamydiosis in captive raptors. *Avian Dis* 1990;34:657–662.
5. Haider S, et al. *Chlamydia*-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients. *FEMS Microbiol Lett* 2008;281:198–202.
6. Kaleta EF, Taday EM. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol* 2003;32:435–461.
7. Kalmar ID, et al. Zoonotic infection with *Chlamydia psittaci* at an avian refuge centre. *Vet J* 2014;199:300–302.
8. Kostanjsek R, et al. ‘Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis’, an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:543–549.
9. Lagkouvardos I, et al. Integrating metagenomic and amplicon databases to resolve the phylogenetic and ecological diversity of the Chlamydiae. *ISME J* 2014;8:115–125.
10. Ossewaarde JM, Meijer A. Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology* 1999;145:411–417.
11. Sixt BS, et al. Developmental cycle and host interaction of *Rhabdochlamydia porcellionis*, an intracellular parasite of terrestrial isopods. *Environ Microbiol* 2013;15:2980–2993.
12. Wheelhouse N, et al. Evidence of members of the Chlamydiales in bovine abortions in England and Wales. *Vet Rec* 2015;176:465.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, DANIELS Hélène, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de JOUFFROY Sophie intitulée « Prévalence de *Chlamydiales* chez les rapaces de l'Oregon : identification d'une *Rhabdochlamydia* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 12 septembre 2017
Docteur DANIELS Hélène
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



H. DANIELS

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL



Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Toulouse, 2017

NOM : JOUFFROY

PRENOM : SOPHIE

TITRE : Prévalence des *Chlamydiales* chez les rapaces de l'Oregon : identification d'une *Rhabdochlamydia*

RESUME : En tant que prédateurs au sommet de la chaîne alimentaire, les oiseaux de proie sont des témoins importants de la présence de microorganismes pathogènes dans les écosystèmes. En captivité, ils représentent un risque pour la santé du personnel soignant et des vétérinaires. Deux agents pathogènes nous ont particulièrement intéressés au cours de cette étude : *Chlamydia psittaci* et *Staphylococcus aureus* résistant à la Métilcilline (SARM). Chez l'homme, toutes les souches de *C. psittaci* peuvent provoquer une psittacose. La présence de SARM chez la faune sauvage en général, et chez les oiseaux en particulier, n'est que peu décrite. Différentes études montrent cependant le potentiel zoonotique de cet agent.

L'objectif premier de cette étude était de mesurer la prévalence de *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de proie dans l'Oregon. Des écouvillons naso-buccaux ont été réalisés sur 82 oiseaux lors de leur admission dans l'un des neuf centres de faune sauvage participants à l'étude. La présence de *Chlamydia spp.* et de « *Chlamydia-like Organisms* » (CLO) a été déterminée par PCR 16S.

L'autre but de cette étude était de mesurer la prévalence du SARM chez des oiseaux ayant séjourné au moins deux jours dans des centres de la faune sauvage et de la comparer à la prévalence de l'agent pathogène à l'admission. Aucun SARM n'a été isolé parmi les 68 échantillons prélevés ; ainsi, seule l'étude concernant *Chlamydia psittaci* sera développée dans ce manuscrit.

MOTS-CLES : CHLAMYDIA PSITTACI – RHABDOCHLAMYDIA – PREVALENCE - RAPACES – OREGON

TITLE : Prevalence of *Chlamydiales* in Oregon raptors and identification of a *Rhabdochlamydia*

ABSTRACT : Raptors held in captivity are a potential health risk for caretakers and veterinarians that handle the birds. As apex predators, these birds are also valuable biological monitors of pathogenic microorganisms in the ecosystem. Two agents of particular interest are *Chlamydia psittaci* and Methicillin Resistant *Staphylococcus spp.* (MRS). All *C. psittaci* genotypes can be transmitted to humans in whom they cause a disease called psittacosis, or "parrot fever". The presence of MRS in wildlife in general and in birds in particular is poorly documented, however several studies document how MRS can be zoonotic.

The first aim of this study was to measure the prevalence of *Chlamydia psittaci* in Oregon raptors. Oral samples were collected from 82 birds upon intake in 9 in-state wildlife rehabilitation centers. The presence of *Chlamydia* and « *Chlamydia-like Organisms* » was evaluated using a PCR based on a genus-specific 16S ribosomal gene sequence.

The second aim of this study was to measure the prevalence of MRS in birds that have spent at least 2 days in a rehabilitation center, and eventually compare it to the prevalence of birds upon intake. No MRS was isolated from the 68 samples, therefore this document only describes in detail the survey concerning *Chlamydia psittaci*.

KEY WORDS : CHLAMYDIA PSITTACI – RHABDOCHLAMYDIA – PREVALENCE - RAPATORS - OREGON