

# ZOONOTSKI POTENCIJAL C. PSITTACI - PRIKAZ SLUČAJA

---

Krkljuš, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:392969>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Marija Krkljuš

ZOONOTSKI POTENCIJAL *C. PSITTACI* - PRIKAZ SLUČAJA

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Zavod za bolesti peradi s klinikom  
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
2. doc. dr. sc. Maja Lukač
3. izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
4. izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš (zamjena)

## ZAHVALA

*Posebnu zahvalu dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Horvatek Tomić na pruženoj mogućnosti za izradu rada, ukazanom strpljenju i susretljivošću, te podršci i pomoći tijekom pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem asistentici Liči Lozici, dr. med. vet. na pomoći oko sekvenciranja i filogenetske analize uzoraka.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na razumijevanju i podršci tijekom studiranja.*

## **POPIS PRILOGA:**

**Tablica 1.** Prikaz specifičnih početnica i proba za umnažanje klamidija.

**Tablica 2.** Prikaz referentnih sekvenci korištenih u filogenetskoj analizi.

**Tablica 3.** Prikaz Ct vrijednosti ispitanih uzoraka papiga i djeteta.

**Slika 1.** Mikroskopski prikaz *C. psittaci*, strelice prikazuju od vrha prema dnu: intermedijarno tjelešce, retikularno tjelešce, elementarno tjelešce (Izvor: ANONIMUS, 2021a., <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/hcp/disease-specifics.html>)

**Slika 2.** Građa *C. psittaci* (Izvor: RAVICHANDRAN i sur., 2021.)

**Slika 3.** Shematski prikaz razvojnog ciklusa bakterija roda *Chlamydia* (Izvor: ABDELRAHMAN i BELLAND, 2005.)

**Slika 4.** PCR u stvarnom vremenu: mreža sa dvostruko pripremljenim uzorcima (11 uzoraka, od kojih je jedan pozitivna kontrola, a jedan negativna kontrola, svi stavljeni u po dvije kolone); termalna krivulja; prikaz rezultata po kolonama i grafički prikaz rezultata (*amplification plot*).

**Slika 5.** Filogenetska analiza sekvenci ompA gena *C. psittaci* porijeklom od papiga (104/19) i djeteta (119/19) (Maximum Likelihood metoda i Kimura 2-parameter model s gama distribucijom).

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. Bakterije roda <i>Chlamydia</i> .....	2
2.2. Morfologija i građa .....	3
2.3. Razvojni ciklus .....	6
2.4. Najznačajnije vrste u rodu <i>Chlamydia</i> .....	8
2.4.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	8
2.4.2. <i>Chlamydia muridarum</i> .....	8
2.4.3. <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	9
2.4.4. <i>Chlamydia abortus</i> .....	9
2.4.5. <i>Chlamydia suis</i> .....	10
2.4.6. <i>Chlamydia pecorum</i> .....	10
2.4.7. <i>Chlamydia felis</i> .....	10
2.4.8. <i>Chlamydia caviae</i> .....	11
2.4.9. <i>Chlamydia avium</i> .....	11
2.4.10. <i>Chlamydia gallinaea</i> .....	11
2.5. Klamidioza ptica .....	12
2.5.1. Etiologija .....	13
2.5.2. Epizootiologija .....	14
2.5.3. Patogeneza .....	15
2.5.4. Klinička slika .....	16
2.5.5. Patomorfološke promjene .....	17
2.5.6. Dijagnostika .....	17
2.5.7. Liječenje .....	19
2.5.8. Profilaksa .....	20
2.5.9. Imunoprofilaksa .....	20
2.6. Zoonotski potencijal klamidija .....	21
2.6.1. Zoonotski potencijal <i>C. psittaci</i> .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	24

3.1. Opis kliničkog slučaja klamidioze u papige i djeteta.....	24
3.2. Izdvajanje DNK i dokaz klamidija iz uzoraka .....	24
3.3. Sekvencioniranje <i>C. psittaci</i> .....	26
4. REZULTATI.....	29
5. RASPRAVA .....	31
6. ZAKLJUČCI.....	34
7. LITERATURA .....	35
8. SAŽETAK .....	41
9. SUMMARY .....	42
10. ŽIVOTOPIS .....	43

## 1. UVOD

Klamidioza ptica emergentna je zoonoza različitih vrsta ptica i ljudi. Značajan problem u širenju ove bolesti predstavlja i pojava inaparentnih ili subkliničkih infekcija, bez vidljivih kliničkih znakova bolesti. Baš tako inficirane ptice vrlo često postaju izvor bolesti za ljude koji s njima dolaze u bliski kontakt, a najčešće su to vlasnici, uzgajivači, veterinari koji liječe ptice ili radnici u trgovinama kućnim ljubimcima, klaonicama ili farmama peradi. Klinički znakovi u ptica ovise o genotipu vrste *Chlamydia (C.) psittaci*, te su uglavnom vezani za dišni, probavni ili živčani sustav. U ljudi, bolest karakteriziraju dišni simptomi koji mogu dovesti i do teže kliničke slike i upale pluća.

Ptice su sve češći kućni ljubimci diljem svijeta, stoga je neophodno poznavati njihovo zdravstveno stanje, normalnu mikrofloru i mogući prijenos različitih patogenih mikroorganizama na ljude. U svrhu utvrđivanja zoonotskog potencijala bakterije *C. psittaci*, u ovom radu prikazat će se slučaj pojave psitakoze u djeteta nakon kontakta sa zaraženom papigom. Papiga je pregledana na Zavodu za bolesti peradi s klinikom, te je dokazana *C. psittaci* PCR metodom u stvarnom vremenu. Nakon što je oboljelo i dijete koje je živjelo u istom kućanstvu kao i zaražena ptica, uzet je uzorak djeteta na Klinici za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević u Zagrebu i proslijeđen u Laboratorij za klamidije Zavoda za bolesti peradi s klinikom Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je izolirana DNK iz uzorka i učinjen PCR u stvarnom vremenu koji je dokazao prisustvo *C. psittaci* u djeteta.

Kao dio istraživanja u okviru ovog diplomskog rada, sačuvani uzorci DNK su umnoženi specifičnim PCR-om za dokaz *C. psittaci* (dokaz *ompA* gena), te su umnošci sekvencirani radi usporedbe sekvenca DNK iz papige i djeteta.

U ovome radu ukratko su opisane bakterije roda *Chlamydia*, s naglaskom na bakteriju *C. psittaci* koja ima zoonotski potencijal, a najviše se javlja u papiga, koje su danas česti kućni ljubimci mnogih obitelji. Obzirom da *C. psittaci* predstavlja značajnu zoonotsku bakteriju, iznimno je bitno opisati slučajeve pojave same bolesti u ljudi i životinja, te posebice način prijenosa.



## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. BAKTERIJE RODA *CHLAMYDIA*

Bakterije roda *Chlamydia* su uzročnici značajnih bolesti koje se javljaju kod različitih vrsta životinja i ljudi, uglavnom su vrsno specifične, odnosno imaju manju ili veću specifičnost za nekog nositelja, dok pojedine posjeduju i zoonotski potencijal (HENG i sur., 2019.). Ove bakterije čine grupu obligatnih unutarstaničnih mikroorganizama, Gram su negativne bakterije, pleomorfne, okruglastog oblika, nisu pokretljive, a veličina i oblik ovise o stadiju razvojnog ciklusa u kojem se nalaze. Karakteristika koju dijele sve ove bakterije je njihov način unutarstaničnog razmnožavanja, koji predstavlja i infektivni ciklus (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

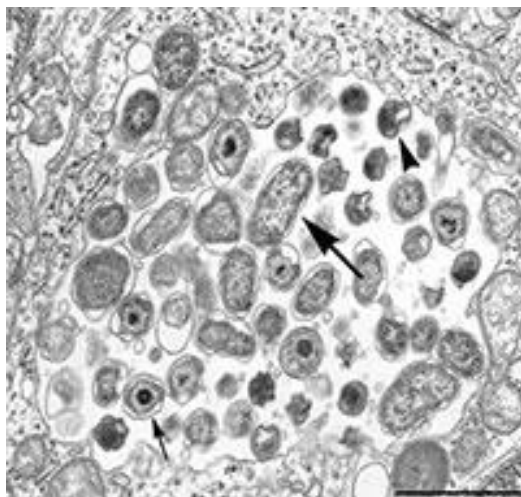
Bakterije roda *Chlamydia* imaju bogatu taksonomsku prošlost, od 1945. godine bile su poznate pod nazivom *Miyagawanella*, a od 1957. godine uveden je u porodicu *Chlamydiaceae* rod *Chlamydia* (BAVOIL i sur., 2013.). Prema klasifikaciji, pripadaju koljenu *Chlamydiae*, redu *Chlamydiales* i porodici *Chlamydiaceae*. Godine 1999. EVERETT i suradnici predložili su podjelu na dva roda: *Chlamydia* i *Chlamydophila* gen. nov. na temelju analize 16S i 23S rRNA.. Rod *Chlamydia* obuhvaćao je sljedeće vrste: *C. trachomatis*, *C. muridarum* i *C. suis*. Rod *Chlamydophila* gen. nov. predstavljen je kao novi rod porodice *Chlamydiaceae* koji je obuhvaćao sljedeće vrste: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* i *Chlamydophila caviae*. Kao kriteriji za podjelu, te nastanak novog roda *Chlamydophila* uzeti su sličnost 16S rRNA i 23SrRNA gena (>95% identični), prisutnost ekstrakromosalnog plazmida, antibiotska rezistencija (sulfadiazin), veličina genoma (1.2 Mbp), nemogućnost detekcije glikogena te broj ribosomskih operona (EVERETT i sur., 1999.). Nova podjela nikad u potpunosti nije prihvaćena, a daljnjim istraživanjima došlo se do zaključka postojanja samo jednog roda *Chlamydia*. Glavni razlozi povratka na jedan rod su spori rast ovih bakterija, izmjena genetskog materijala samo kod blisko povezanih mikroorganizama i samo u istoj unutarstaničnoj vakuoli. Isto tako, subpopulacije su izolirane te se ne mogu međusobno natjecati niti izmjenjivati genetski materijal. Stoga kriterij koji kod ostalih bakterija označava drugu vrstu, sličnost 16S rRNA gena (identičan <97%), ovdje nije primjenjiv (STEPHENS i sur., 2009.).

Internacionalno društvo za sistematiku prokariota (ICSP, *International Committee on the Systematics of Prokaryotes*) 2010. godine vratili su staru nomenklaturu, odnosno samo jedan rod *Chlamydia* (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Rodu *Chlamydia* danas službeno pripada 11 vrsta: *Chlamydia (C.) abortus* (ovca, koza, govedo), *C. avium* (ptice), *C. caviae* (zamorčić), *C. felis* (mačka), *C. gallinacea* (domaća perad), *C. muridarum* (miš, hrčak), *C. pecorum* (ovca, govedo), *C. pneumoniae* (čovjek), *C. psittaci* (ptice), *C. suis* (svinja) i *C. trachomatis* (čovjek) (LAROUCAU i sur., 2019.). Opisane su još neke vrste klamidija koje bi prema svojim osobinama pripadale ovome rodu, no još uvijek nisu prihvaćene kao nove vrste, točnije: *C. ibidis* (ibis), *C. buteonis* (ptice grabljivice-jastreb), *C. sanzinia* (zmije-madagaskar tree boa), *C. corallus* (zmije-amazon tree boa), *C. serpentis* (zmije) i *C. poikilothermis* (zmije) (LAROUCAU i sur., 2019.).

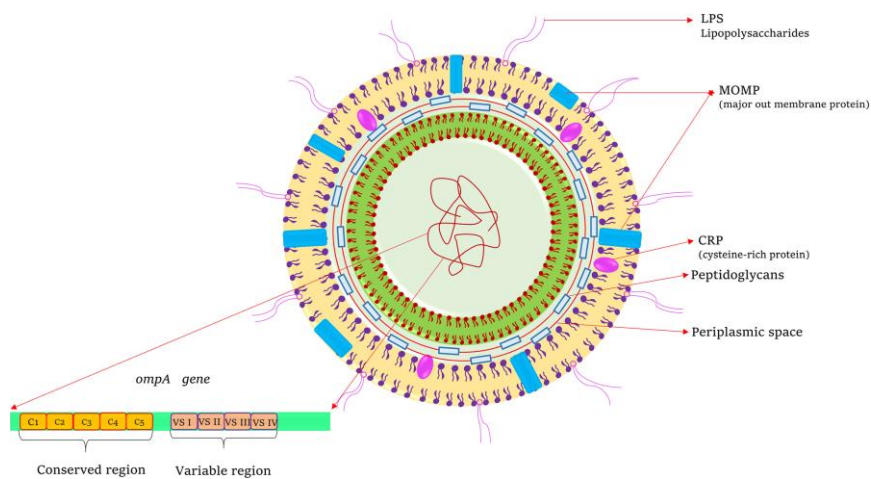
## 2.2. MORFOLOGIJA I GRAĐA

Bakterije roda *Chlamydia* su Gram negativne bakterije, pleomorfne, okruglastog oblika, veličine 0,2-2  $\mu\text{m}$ , nisu pokretljive, a veličina i oblik ovise o stadiju razvojnog ciklusa u kojem se nalaze. Tijekom razvojnog ciklusa nalaze se u tri morfološka oblika: elementarno tjelešće, intermedijarno tjelešće i retikularno tjelešće (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.) (Slika 1.). Elementarno tjelešće (ET) je veličine 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , okruglo, elektronski gusto tjelešće koje predstavlja infektivni oblik, nalazi se izvan stanice, metabolički je inaktivno, te otporno na promjene osmotskog tlaka. U unutrašnjosti bakterije nalazi se kompaktan nukleoid, gusto kondenziran djelovanjem histonu sličnog proteina (HctA, HctB), ekscentrično je položen, obavija ga citoplazma, a prisutno je i malo ribosoma. Citoplazmu obavija troslojna citoplazmatska membrana i troslojna vanjska membrana. Karakteristično za ove bakterije je izostanak peptidoglikana koji je inače prisutan kod Gram negativnih bakterija, a omogućuje čvrstoću i stabilnost vanjske membrane (ABDELRAHMAN i BELLAND, 2005.). Troslojna vanjska membrana sastoji se od lipopolisaharida i kompleksa proteina zvanih *chlamydial outer membrane complex* (COMC) koji čine mreža proteina koji su međusobno povezani disulfidnim vezama (Slika 2.). COMC se sastoji od više proteina, najvažniji i najzastupljeniji je *major outer membrane protein* (MOMP) koji zauzima više od 60% membrane, te nekih manjih kao što su OmcA i OmcB proteini koji su bogati cisteinom ili polimorfni membranski protein D (PmpD) čija je funkcija adhezija za stanicu domaćina. Prisutan je i sekrecijski sustav tip 3 (TTSS), inače prisutan u pojedinim Gram negativnih bakterija, koji luči

efektorne proteine direktno iz membrane bakterije u stanicu domaćina. Na taj način pomaže patogenu da pobijedi djelovanje imunskog odgovora domaćina, preživi te inficira stanicu domaćina. Ova gusta mreža proteina omogućava otpornost elementarnog tjelešca na promjenljive okolišne uvjete izvan stanice domaćina, te preživljavanje. Elementarno tjelešce još sadrži i hemaglutininski antigen koji je odgovoran za aglutinaciju eritrocita pojedinih ptica i glodavaca (COSSEE i sur., 2018.). Intermedijarno tjelešce je veličine 0,3-1  $\mu\text{m}$ , moguće ga je uočiti u stanici domaćina tijekom konverzije elementarnog tjelešca u retikularno tjelešce (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Retikularno tjelešce (RT) je okruglo, veće od elementarnog tjelešca (oko 1  $\mu\text{m}$ ) i predstavlja neinfektivni replikacijski oblik, nalazi se unutar stanice u vakuoli i metabolički je aktivno. Omjer DNA i RNA u RT je veći nego u ET (sadrži DNA i tri puta više RNA), citoplazma je granulirana i sadrži difuzne, fibrilarne nukleinske kiseline, za razliku od ET gdje su one gusto kondenzirane. Obavija ga troslojna citoplazmatska membrana i troslojna vanjska membrana, no u vanjskoj membrani nalazi se manje disulfidnih veza unutar kompleksa proteina COMC, što je bitno kod konverzije elementarnog tjelešca u retikularno tjelešce (ABDELRAHMAN i BELLAND, 2005.). Pod utjecajem čimbenika poput stresa, antibiotika i nestašice nutrijenata, retikularno tjelešce prelazi u stanje perzistencije, tzv. aberantno tjelešce (AT) koje nije infektivno i nema sposobnost replikacije. Uklanjanjem čimbenika koji uzrokuju stres dolazi do pojave elementarnog tjelešca i obnavljanja zaraznosti (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).



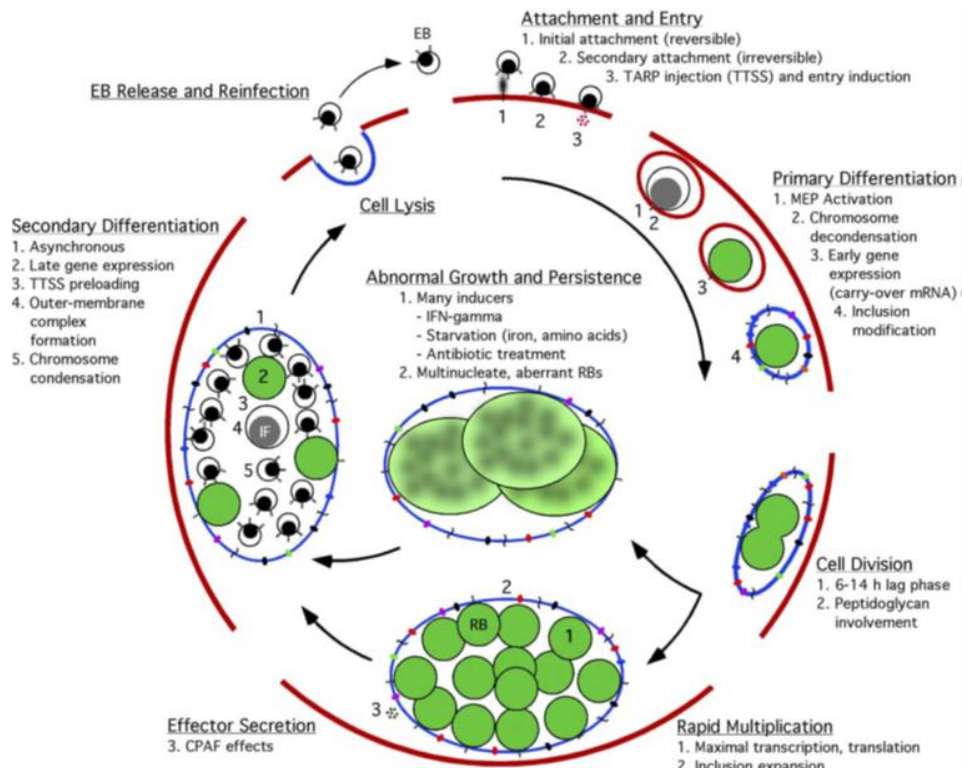
Slika 1. Mikroskopski prikaz *C. psittaci*, strelice prikazuju od vrha prema dnu: elementarno tjelešce, retikularno tjelešce, intermedijarno tjelešce (Izvor: ANONIMUS, 2021a., <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/hcp/disease-specifics.html>)



Slika 2. Građa *C. psittaci* (Izvor: RAVICHANDRAN i sur., 2021.)

### 2.3. RAZVOJNI CIKLUS

Unutarstanični parazitizam javlja se u nekih bakterijskih patogena i kompleksan je proces. Bakterije roda *Chlamydia* karakterizira njihov bifazični razvojni ciklus koji je ujedno i infektivni ciklus, a bakterija se javlja u više oblika: elementarno tjelešce koje je infektivno i nema sposobnost replikacije, te retikularno koje nije infektivno i ima sposobnost replikacije. Razvojni ciklus započinje prihvaćanjem elementarnog tjelešca za mikrovile apikalnog dijela polariziranih epitelnih stanica. Interakcija elementarnog tjelešca i stanice domaćina odvija se u dvije faze: prvu fazu čini inicijalno reverzibilno prihvaćanje bakterijskih adhezina (OmpA, OmcB, Hsp70, Pmp) za heparan sulfat koji sadrži glikozaminoglikan (GAG). Glikozaminoglikan je linearni glikozidni lanac, sastavljen od negativno nabijenih disaharidnih jedinica, u ovom slučaju heparan sulfata. Drugu fazu čini sekundarno ireverzibilno prihvaćanje bakterije za stanicu domaćina. Odmah nakon ove faze sekrecijski sustav tipa 3 (TTSS) luči protein TARP i time potiče ulazak bakterije u stanicu domaćina. Nakon ulaska elementarnog tjelešca u stanicu započinje njegova konverzija u metabolički aktivno i replikacijski sposobno retikularno tjelešce, slijedi binarna dioba i stvaranje inkluzija koje se nazivaju Levinthal-Cole-Lillie tjelešca (LCL tjelešca). Unutar inkluzija, retikularna tjelešca sazrijevaju u infektivna elementarna tjelešca koja se lizom otpuštaju iz ove stanice te ulaze u izvanstanični prostor i inficiraju ostale stanice domaćina (ABDELRAHMAN i BELLAND, 2005.) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz razvojnog ciklusa bakterija roda *Chlamydia* (Izvor: ABDELRAHMAN i BELLAND, 2005.)

## 2.4. NAJZNAČAJNIJE VRSTE U RODU *CHLAMYDIA*

### 2.4.1. *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

*Chlamydia trachomatis* je prva izolirana i identificirana bakterija iz roda *Chlamydia*. Godine 1907. HALBERSTAEDTER i VON PROWAZEK u konjunktivalnim strugotinama osoba sa trahomom našli su na intracitoplazmatske inkluzije koje su obavijale jezgru i imenovali ih *Chlamydozoa* (grč. chlamys= plašt). U početku su mislili da se radi o protozoi, zatim virusu zbog neobičnog razvojnog ciklusa, a zapravo se radilo o unutarstaničnoj bakteriji. Kod *C. trachomatis* razlikuje se biovar koji uzrokuje trahom oka; genitalni biovar koji uzrokuje upalnu bolest zdjelice, ektopičnu trudnoću i neplodnost, a u novorođenčadi konjunktivitis i infekciju donjeg respiratornog trakta; i biovar *lymphogranuloma venerum* koji je najpatogeniji te uzrokuje infekciju limfnih čvorova (ANONIMUS, 2021b.).

### 2.4.2. *CHLAMYDIA MURIDARUM*

Tijekom provođenja biološkog pokusa na miševima u svrhu istraživanja humanog virusa influence, 1942. godine iz pluća asimptomatskog albino švicarskog miša izoliran je novi patogen koji uzrokuje pneumoniju u miševa, *mouse pneumonitis agent* (MoPn). Primarni domaćini su miševi kod kojih ova bolest prolazi asimptomatski, ali prisutna je perzistentna infekcija. Uzročnik u organizam domaćina ulazi inhalacijom, uzrokuje infekciju respiratornog sustava i ulazi u pluća te uzrokuje pneumoniju. Rijetko se javljaju teži oblici bolesti, a njih karakteriziraju neuredna dlaka, pogrbljeno držanje i otežano disanje kao posljedica intersticijske pneumonije. Uginuće nastupa unutar 24 h. Kod kronične infekcije javlja se kaheksija i cijanoza uški i repa. BARRON i sur. 1981. godine opisali su MoPn infekciju urogenitalnog sustava u miševa i predložili je kao model za proučavanje humanih respiratornih i urogenitalnih infekcija koje su uzrokovane *C. trachomatis* (RAMSEY i sur., 2009.).

### **2.4.3. CHLAMYDIA PNEUMONIAE**

Vrsta *Chlamydia pneumoniae* je bakterija koja uzrokuje akutne respiratorne bolesti kao što su pneumonija, bronhitis, sinusitis i faringitis. Prirodni domaćin je čovjek, zatim konji i koale. Razlikuju se tri biovara: TWAR, Koala i Equine. Biovar TWAR izoliran je samo u ljudi, najčešće se javlja kod djece u školskoj dobi, rjeđe u odraslih osoba, češće kod muškaraca. Patogen se širi direktno kapljičnim putem, te indirektno dodirivanjem kontaminiranih površina i predmeta, nosa ili usta. Kod odraslih ova bolest prolazi asimptomatski ili s pojavom blage infekcije respiratornog sustava, dok se teža klinička slika očituje pojavom bronhitisa i pneumonije. Osim u respiratornom sustavu, mogu se javiti i promjene u obliku ateroskleroze, encefalitisa, miokarditisa, astme i artritisa (KUO i sur., 1995.).

### **2.4.4. CHLAMYDIA ABORTUS**

Vrsta *Chlamydia abortus* je bakterija koja uzrokuje enzootski pobačaj u ovaca (*ovine enzootic abortion*, OEA), jedan od najčešćih uzroka gubitka janjadi, a rasprostranjena je u područjima gdje se intenzivno uzgajaju ovce. Obično se javlja endemski u ovaca i koza, a sporadično u nekih drugih životinja kao što su goveda, konji, svinje i divlji preživači. Bakterija u organizam domaćina najčešće ulazi inhalacijom, ingestijom direktnim i/ili indirektnim dodirima sa pobačenim plodovima, posteljicom, plodnom tekućinom te vaginalnim iscjetkom. Kod ovaca ova bolest u početku prolazi asimptomatski, kasnije se javljaju simptomi kao što su vaginalni iscjedak te promjene u ponašanju nekoliko dana prije pobačaja. *Chlamydia abortus* ima zoonotski potencijal te se prenosi na ljude, stoga se preporuča da trudnice izbjegavaju izloženost ovcama i kozama (ESSIG i LONGBOTTOM, 2015.).



#### **2.4.5. CHLAMYDIA SUIS**

Vrsta *Chlamydia suis* uzrokuje klamidijske infekcije u svinja, u obliku pojedinačne infekcije ili češće miješane infekcije sa ostalim vrstama koje se javljaju u svinja: *C. pecorum*, *C. abortus*, *C. psittaci*. Javlja se kod svinja koje su prirodni domaćini, ali izolirana je i u nekih drugih vrsta životinja (goveda, konji, ovce, mačke, žabe). Uzročnik u organizam ulazi inhalacijom i/ili ingestijom. Promjene se očituju u obliku perikarditisa, infekcije gastrointestinalnog sustava, enteritisa, reproduktivnih poremećaja, rane embrionalne smrtnosti i ranijeg ulaska u estrus, pobačaja, smanjene kvalitete sjemena, konjunktivitisa i pneumonije (LI i sur., 2017.).

#### **2.4.6. CHLAMYDIA PECORUM**

*Chlamydia pecorum* je bakterija koja nije ograničena na jednu životinjsku vrstu, te se javlja u sisavaca. Izolirana je iz preživača (goveda, ovce, koze), svinja i tobolčara (koala), te uzrokuje velike ekonomske štete u uzgoju. U koala izaziva konjunktivitis, reproduktivne bolesti, neplodnost i bolesti mokraćnog sustava, a u ostalih životinjskih vrsta izaziva i pobačaj, mastitis, encefalomijelitis, enteritis, pneumoniju, poliartritis, pleuritis i perikarditis (FUKUSHI i HIRAI, 1992.).

#### **2.4.7. CHLAMYDIA FELIS**

*Chlamydia felis* je bakterija koja uzrokuje mačju klamidiozu, te je jedan od češćih uzroka pneumonije, akutnog i kroničnog konjunktivitisa. Obično se javlja u mačića, ali mogu oboljeti sve dobne kategorije. Uzročnik se prenosi direktnim i indirektnim kontaktom među mačkama, inhalacijom ili ingestijom iscjetka iz očiju inficirane mačke. Dokazana je i kod ljudi koji posjeduju ili su u doticaju s mačkama (veterinari, uzgajivači), stoga ima zoonotski potencijal (HALÁNOVÁ i sur., 2019.).

#### **2.4.8. CHLAMYDIA CAVIAE**

*Chlamydia caviae* je bakterija koja uzrokuje konjunktivitis (*guinea pig inclusion conjunctivitis*, GPIC) u zamorčića. Uzročnik se prenosi direktnim i/ili indirektnim dodirrom, inhalacijom, spolnim putem, a moguć je i prijenos s majke na plod. Konjunktivitis se uglavnom javlja u mladim zamorčića, kod ostalih uglavnom prolazi asimptomatski ili u obliku blage infekcije, a ponekad se razvije rinitis i infekcija donjeg dijela respiratornog sustava te genitalnog trakta i pobačaji (CHERIAN i MAGEE, 1990.).

#### **2.4.9. CHLAMYDIA AVIUM**

*Chlamydia avium* je bakterija koja se javlja samo u ptica, primarno u golubova i papigašica i nije dokazana u drugih vrsta životinja. Ova bakterija može se izolirati iz obriska kloake, fecesa te unutarnjih organa domaćina. Izolirana je i identificirana 2009. godine u golubova u Njemačkoj (SACHSE i sur., 2014.). Širenje je aerogeno, putem čestica prašine i aerosola (osušeni feces). Kod domaćina ova bolest prolazi asimptomatski, a zoonotski potencijal još nije dovoljno istražen (SACHSE i sur., 2014.).

#### **2.4.10. CHLAMYDIA GALLINACEA**

*Chlamydia gallinacea* je bakterija koja se javlja u domaće peradi, najčešće u kokoši, purana i biserke. Izolirana je 2005. godine u Njemačkoj na farmi peradi (SACHSE i sur., 2014.). Osim u Europi, ova bakterija nađena je i u Kini i u Australiji (SACHSE i sur., 2014.). Kao i kod prethodno opisane bakterije, može se izolirati iz obriska kloake, fecesa i unutarnjih organa domaćina, prenosi se aerogenim širenjem, putem prašine i aerosola. Bolest uglavnom prolazi asimptomatski, a česte su mješovite infekcije sa *C. psittaci* (SACHSE i sur., 2014.).

## 2.5. KLAMIDIOZA PTICA

Klamidioza ptica je akutna kontagiozna zarazna bolest koja pripada u zanemarene zarazne bolesti (*neglected zoonotic diseases*, NZDs), zbog svoje kompleksne etiologije, prijenosa te sposobnosti da isti uzročnici uzrokuju bolest u različitim domaćina (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Prirodni domaćini su ptice, odnosno domaća perad, divlje ptice te ptice kućni ljubimci. Osim ptica, vrsta *C. psittaci* koja je najčešći uzročnik klamidioze, javlja se u drugih životinja kao što su goveda, ovce, koze, konji, svinje, psi i lisice, te se javlja kod ljudi, što ovu bolest čini antropozoonozom (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Klamidioza ptica zabilježena je još u 19. stoljeću, švicarski liječnik Jakob Ritter prvi je prijavio psitakozu u ljudi 1879. godine, a svoj naziv bolest je dobila 1893. godine kada se pojavila infekcija sa simptomima sličnim gripi, ali se primijetilo da je bolest nastala zbog kontakta ljudi sa pticama (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Detaljnije istraživanja bakterija roda *Chlamydia* započelo je tek 1907. godine kada su znanstvenici HALBERSTAEDTER i VON PROWAZEK pronašli intracitoplazmatske inkluzije u konjunktivalnim strugotinama osoba sa trahomom, koje su obavijale jezgru i imenovali ih *Chlamydozoa*. Godina 1929.-1930. pojavila se prva pandemija psitakoze u zemljama Europe, Sjeverne i Južne Amerike, oboljelo je više od 700 ljudi u svijetu, a pretpostavlja se da je bolest uvezena sa zelenim amazonama iz Južne Amerike (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Nakon unosa bolesti u zemlje Europe i Amerike uzročnika se izoliralo i iz domaće peradi i ptica koje su živjele na tom području kao što su golubovi, patke i purani. Nerijetko je dolazilo do izbijanja bolesti u peradarskoj industriji 1950. godine te kasnije 1980., 1990. godine u Europi i SAD-u (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.). Danas je poznato oko 465 vrsta domaćih i slobodno-živućih ptica svrstanih u 30 redova, koje su nositelji klamidija, te mogu prenijeti bolest na čovjeka (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.).

### 2.5.1. ETIOLOGIJA

Uzočnik bolesti je bakterija *C. psittaci* koja pripada koljenu *Chlamydiae*, redu *Chlamydiales*, porodici *Chlamydiaceae* i rodu *Chlamydia*. Vrsta *C. psittaci*, kao i ostale klamidije, je obligatna unutarstanična, kokoidna, Gram negativna bakterija. Klamidije unutar citoplazme sadrže i DNA i RNA, okružene su troslojnom citoplazmatskom membranom i troslojnom vanjskom membranom koja se većinski sastoji od glavnog proteina MOMP (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Njihova karakteristika je nedostatak peptidoglikana i kiselina u rudimentarnoj staničnoj stijenci, stoga same mogu sintetizirati vrsno-specifične enzime, ali ovise o staničnoj energiji domaćina, koriste adenozin trifosfat i nikotinamid adenozin triptofan i moguće neke aminokiseline (BIĐIN, 2008.).

Razvojni ciklus započinje prihvaćanjem i prodorom elementarnog tjelešca u ciljne stanice, zatim slijedi pretvorba elementarnog tjelešca u retikularno tjelešce, nakon toga rast i dioba retikularnog tjelešca i stvaranje brojnih novih LCL-tjelešaca, odnosno inkluzija, dok na kraju retikularna tjelešca sazrijevaju u elementarna tjelešca i otpuštaju se iz stanice domaćina. Razvojne mikrokolonije mogu sadržavati od 100 do 500 potomaka. U slučaju *C. psittaci*, invadirana stanica domaćina je jako oštećena, a klamidiju otpušta lizom 48 sati nakon infekcije (BIĐIN, 2008.).

Kod *C. psittaci* razlikujemo nekoliko serovarova: A, B, C, D, E, F, E/B, M56 i WC (BEECKMAN i VANROMAPY, 2009.). Ove serovarove razlikujemo prema imunosnoj reakciji sa skupom monoklonskih protutijela koja prepoznaju specifične epitope glavnog proteina vanjske membrane (MOMP). Osim ove analize, serotipizacije, razlikujemo i genotipizaciju, odnosno kodiranje ompA gena koji se nalazi na vanjskoj membrani. Usporedbom ove dvije analize dokazano je da serovarovi odgovaraju genotipovima. Prednost genotipizacije je da se ovom metodom mogu razlikovati genotipovi E i B, dok serotipizacijom to nije moguće (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.). Do danas je utvrđeno barem 15 različitih genotipova, a uz već navedene serovarove razlikuje se još dodatnih 6 genotipova: 1V, 6N, Mat116, R54, YP84 i CPX0308 (SACHSE i sur., 2009.). Do sada poznati genotipovi su relativno vrsno specifični. Genotip A uglavnom je povezan sa papigama, te najčešće uzrokuje bolest u ljudi (RAVICHANDRAN i sur., 2021.); genotip B endemičan je kod golubova, ali izoliran je i iz purana, kokoši, pataka, papagaja i vrapčarki (SACHSE i sur., 2015.). Genotip C primarno se javlja u pataka i gusaka, a izoliran je još iz kokoši i golubova (ČECHOVÁ i sur., 2018.), a genotip D primarno se javlja u purana, a ponekad golubova i kokoši (VANROMPAY, 2013.). Genotip E/B izoliran je iz golubova, pataka, purana, gusaka i

sporadično ljudi (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.). Genotipovi se razlikuju s obzirom na virulentnost i antigenost. Pojedini sojevi luče toksin koji može biti različitog intenziteta, vezan je za vanjsku membranu elementarnog tjelešca te se smatra bitnim čimbenikom virulencije (BIĐIN, 2008.). Tijekom razvojnog ciklusa klamidija nastaju metaboličke i strukturne promjene koje mijenjaju virulenciju i antigenost, a intenzitet tih promjena ovisi o vrsti domaćina te broju umnoženih klamidija (BIĐIN, 2008.). Antigenost je kompleksna, a sastoji se od imunodominantnih, rodospecifičnih lipoglikoproteina i proteina različite molekularne mase. Lipoglikoprotein koji je zajednički svim klamidijama ima kiseli termostabilan polisaharid, otporan na 0,5% fenol (BIĐIN, 2008.). Klamidije su infektivne pri niskim temperaturama, liofilizirane ostaju infektivne godinama, pri -20°C infektivne su tijekom duljeg razdoblja, a pri temperaturi od 4°C infektivne su 50 dana (BIĐIN, 2008.). Rastom vrijednosti temperature smanjuje se njihova infektivnost, tako pri temperaturi od 22°C infektivnost traje 12 dana, a na temperaturi od 55° C bakterija je inaktivirana za pet minuta. Izvor infekcije mogu biti kontaminirani predmeti te osušeni izmet (i do nekoliko mjeseci, ovisno o vanjskim uvjetima). Klamidije su dosta osjetljive na kvarterne amonijeve spojeve ili otapala za mast kao što su eter, kloroform i formalin, zbog toga što oštećuju njihove stijenke, a manje su osjetljive na kiseline i alkohol (BIĐIN, 2008.).

### **2.5.2. EPIZOOTIOLOGIJA**

Klamidioza ptica prvi puta je zabilježena u 19. stoljeću, kada se kod ljudi pojavila bolest sa simptomima sličnim gripu. Dugo se smatralo da se ova bolest javlja samo u papiga, no 1940. godine opisana je u golubova, a 1950. godine i u domaće peradi poput purana i pataka. Do sada je klamidija izdvojena iz gotovo 45% ptica koje pripadaju redu Psittaciformes (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). U ptica koja većinom žive na moru, obalama ili drugim vodama, poput galebova, pataka, pingvina, gusaka itd., klamidije su izdvojene iz 20% vrsta, dok su u ptica iz reda Galliformes, poput kokoši, fazana i prepelica, izdvojene iz 5% vrsta (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Kod klamidija razlikuju se jako virulentni sojevi i slabo virulentni sojevi. Jako virulentni sojevi javljaju se najčešće u papiga i purana, a slabo virulentni u pataka i golubova, te drugih ptica. Jako virulentni sojevi nazivaju se još i toksogeni, uzrokuju naglu pojavu bolesti i mortalitet od 5% do 30%, dok slabo virulentni sojevi uzrokuju mortalitet manji od 5% (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Izvor infekcije za ptice su najčešće asimptomatske životinje, bolesne životinje sa izraženim

kliničkim znakovima i lešine uginulih životinja. Vektori su ptice, inaparentni nosioci ili sekundarno zaražene vrste koje šire bolest tijekom migracije, te ektoparaziti koji su samo mehanički vektori (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Način prijenosa je direktan, izravnim kontaktom sa oboljelom životinjom ili kliconošom. Zabilježeno je i vertikalno širenje u nekih vrsta, poput papiga, kokoši, galebova, pataka i gusaka (BIĐIN, 2008.). Bolest se u nezaraženo jato može unijeti i perzistentnim kliconošama, što je uobičajeno u nekih ptica poput papiga i golubova. Osim direktnog prijenosa, razlikujemo i indirektan, putem kontaminiranih predmeta, onečišćenom opremom, vodom i hranom (BIĐIN, 2008.). Bakterija se izlučuje sekretima i ekskretima, ponajviše fecesom, oralnim, nazalnim i ždrijelnim iscjetkom i „mlijekom“ iz voljke goluba. Čišćenjem perja, ptice iz ždrijela prenose uzročnika na perje, a zatim u okolinu. Kod perzistentne infekcije, do izlučivanja uzročnika dolazi djelovanjem vanjskim čimbenicima kao što su stres, prenapučenost, razmnožavanje, loši zoohigijenski i zootehnički uvjeti, hranjenje i liječenje. Na bolest su prijemljivije mlađe ptice (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

### **2.5.3. PATOGENEZA**

Bakterija *C. psittaci* u organizam domaćina najčešće ulazi inhalacijom. Nakon ulaska u domaćina, prodire u epitelne stanice gornjeg dijela respiratornog sustava te uzrokuje upalu gornjih dišnih puteva, odnosno sluznice nosa, konhi i sinusa. Nakon replikacije u epitelnim stanicama gornjeg respiratornog sustava, širi se u epitelne stanice i makrofage donjeg respiratornog sustava te uzrokuje upalu u dušniku, bronhama, bronhiolama, plućima te zračnim vrećicama (VANROMPAY i sur., 1995.). Ciljne stanice za replikaciju su epitelne stanice i mononuklearne stanice, odnosno monociti te makrofagi. Nakon 1 do 3 dana u respiratornom sustavu, bakterija se dalje širi u gastrointestinalni sustav, duodenum, jejunum, cekum, kolon i kloaku. Replikacija je najintenzivnija u cekumu. Osim u ova dva sustava, bakterija je prisutna i u konjunktivama, perikardu, jednom ili više parenhimskih organa poput jetre, gušterače, slezene, bubrega, u jajnicima, testisima, koštanoj srži, plazmi i monocitima (VANROMPAY i sur., 1995.).

#### 2.5.4. KLINIČKA SLIKA

Bakterija *C. psittaci* sposobna je inficirati sve vrste ptica, odnosno domaću perad, divlje ptice i egzotične ptice. Inkubacija ovisi o vrsti ptice, dobi domaćina, virulentnosti soja i ulaznim vratima bakterije. Kod mlađih jedinki inkubacija je kratka, obično oko 3 dana, dok kod starijih jedinki može trajati nekoliko mjeseci, pa i godina (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Po svome tijeku klamidioza može biti asimptomatska, akutna, subakutna i kronična infekcija, a manifestira se pojavom simptoma u respiratornom i gastrointestinalnom sustavu te kao sistemska infekcija. Težina kliničke slike ovisi o dobi i vrsti ptice te o soju koji uzrokuje infekciju. Na pojavu bolesti još utječu i neki čimbenici kao što su loša prehrana, prenapučenost i stres (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Akutna infekcija obično se javlja u mlađih ptica, dok kod odraslih jedinki bolest najčešće prolazi asimptomatski. U akutnom stadiju infekcije javljaju se simptomi gornjeg respiratornog sustava, kao što su iscjedak iz očiju i iscjedak iz nosa, letargija, anoreksija, hipotermija, nakostriješenost perja. Prisutan je proljev, najčešće žuto-zelene boje (BIĐIN, 2008.).

U subakutnom i kroničnom obliku bolesti obično se javlja loša opernaćenost te poremećaj u radu središnjeg živčanog sustava klonično-toničkog tipa (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Jako virulentni i slabo virulentni sojevi mogu uzrokovati asimptomatsku zarazu. Jako virulentni sojevi obično uzrokuju pneumoenteritis s respiratornim simptomima, mukopurulentni nosni iscjedak, nevoljkost, poliuriju i proljev, dok manje virulentni sojevi slične simptome, ali u blažem obliku (BIĐIN, 2008.).

Simptomi koji se javljaju u papiga su smanjeni apetit, letargija, nakostriješenost perja, iscjedak iz očiju i nosa, proljev zelene do žuto-zelene boje, a mogu se javiti i perikarditis, pneumonija, hepatitis, splenitis i upala zračnih vrećica (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Osim navedenih simptoma javljaju se još i tortikolis, opistotonus, tremor, prisilne kretnje i pareza ili paraliza nogu. Ovi poremećaji središnjeg živčanog sustava se uobičajeno javljaju u akutnom stadiju bolesti u papiga, pogotovo kod amazonskih papiga, crvenih ara, afričkih sivih papiga, kakadua i nimfa. Kod nimfi, uz navedene simptome, ponekad nalazimo unilateralni ili bilateralni konjunktivitis i keratokonjunktivitis, a u fecesu žute urate, dok kod tigrica nalazimo sinusitis (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.)

### **2.5.5. PATOMORFOLOŠKE PROMJENE**

Kod ptica kod kojih je utvrđena klamidioza, patoanatomski nalaz nije patognomičan te ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su osjetljivost nositelja, virulencija soja, ulazna vrata uzročnika i postojanje drugih bolesti (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Uz klamidiju često se mogu javiti sekundarne infekcije koje mogu utjecati na promjenu patoanatomskog nalaza uginulih jedinki. Sekundarne infekcije uzrokovane su bakterijama i gljivicama, najčešće *E. coli*, *Salmonella* spp., *Aspergillus* spp. i drugih (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Patoanatomski nalaz koji upućuje na klamidiozu je hepatomegalija, splenomegalija i fibrinska upala zračnih vrećica. Jetra su povećana, prhka, žučkaste ili zelene boje, ponekad uz prisutnost fokalne nekroze u kojima se nalaze intracitoplazmatske inkluzije te fibrinozni perihepatitis. Slezena je povećana, mekše konzistencije, a na površini se nalaze bijela nekrotična žarišta i petehijalna krvarenja. Kod zračnih vrećica membrane su zadebljale, zamucene, a ponekad prekrivene žučkastim, fibrinopurulentnim eksudatom. Pluća su difuzno kongestirana, a pleuralna šupljina ispunjena fibrinskim eksudatom. Kod kronične infekcije nalazi se izražena fibroza, mononuklearni infiltrati jetre i nekroza gušterače (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

### **2.5.6. DIJAGNOSTIKA**

Sumnja na klamidiozu postavlja se na temelju dobivene anamneze, kliničke slike te patoanatomskim nalazom, a potvrđuje izdvajanjem uzročnika i dokazom intracitoplazmatskih uklopina. Anamneza je bitna jer većina ptica oboli tri do četiri mjeseca nakon što su nabavljeni kao kućni ljubimci ili nakon kontakta novonabavljene ptice sa već postojećom (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Dijagnostika nije jednostavna jer se kod klamidioze nalazi više vrsta domaćina, zahvaćenost organa različitih organskih sustava i komplicirani tijek bolesti. Osim navedenih razloga, ova bakterija je unutarstanični parazit kojem je potrebna živa stanica za rast, razvoj i razmnožavanje, što znači da se ne može uzgojiti na agaru. Dijagnostika, kao i kod svake bolesti, temelji se na pronalasku i dokazivanju ili antigena ili protutijela u dobivenom uzorku (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).



Za uspješnu dijagnostiku osnovni preduvjet je pravilan odabir materijala za pretragu, način uzorkovanja, skladištenje i transport uzoraka do laboratorija. Uzorci koji se uzimaju za života su feces, obrisak kloake, ždrijela, nosnih otvora i sluznice vjeđe, te iscjedak iz nosa (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Najčešće za citološke preparate uzimaju se tzv. trojni otisni preparati: obrisak konjunktiva, obrisak ždrijela i obrisak kloake. U uzorcima je bitna prisutnost epitelnih stanica u kojim nalazimo intracitoplazmatska tjelešca (LCL-tjelešca). Postmortalno uzimaju se otisni preparati unutrašnjih organa: slezene, jetre, zračnih vrećica, perikarda, te pluća (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Metode koje se najčešće koriste su ELISA, Clearview-test, PCR, PCR u stvarnom vremenu (realtime PCR), histološko i imunohistokemijsko bojenje obrisaka ili otisaka zahvaćenih organa i bojenje citoloških preparata (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Citološki preparati boje se metodama po Giemsi, Gimenezu, modificiranom Gimenezu, Ziehl–Neelsenu, i Macchiavellu, a ovim metodama boje se isključivo infektivna, odnosno elementarna tjelešca, stoga negativan rezultat ne isključuje klamidiozu (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Uzročnik se može uzgojiti na embrioniranim kokošjim jajima (zametcima), ubrizgavanjem uzročnika u laboratorijske, pokusne životinje ili uzgojem na kulturama stanica (najčešće McCoy, L cells, Vero, BGM), no ta metoda nije preporučena jer je dugotrajna, naporna te potencijalno opasna za osoblje laboratorija (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Metode amplifikacije nukleinskih kiselina (NAAT- *nucleic acid amplification test*) su preporučene metode za dijagnostiku klamidioze zbog toga što su brze, osjetljive i specifične (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Molekularne metode koje se koriste u dijagnostici su konvencionalni PCR i PCR u stvarnom vremenu, DNA-microarray test i sekvencioniranje (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Te metode su brze i pouzdane, a specifičnim početnicama se umnažaju geni klamidija, najčešće *ompA*, *incA*, *enoA* ili 23S rRNA (SACHSE i sur., 2009.).

Od seroloških metoda preporučene su ELISA za dokaz protutijela (IgA, IgG, IgM), reakcija vezanja komplemenata (RVK), imunodifuzija u gelu, lateks-aglutinacijski test (LA), aglutinacija elementarnih tjelešca (*elementary body agglutination-EBA*) te direktna i indirektna imunoflorescencija (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Kod ljudi koristi se još

mikroimunoflorescentni test (*micro-immunofluorescence test*-MIFT) (RAVICHANDRAN i sur., 2021).

Diferencijalno dijagnostički trebaju se isključiti virusne bolesti koje uzrokuju poremećaje središnjeg živčanog sustava, cirkovirusne infekcije, herpesvirusne infekcije, neke bakterijske infekcije uzrokovane enterobakterijama, pasterelama, mikoplazmama i gljivične bolesti, poput aspergiloze (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Patoanatomski nalaz nije patognomičan ni u slučaju nalaza splenomegalije, hepatomegalije, upale zračnih vrećica i fibrinoznog perikarditisa, jer se u slučaju latentne infekcije ne nalaze ove patomorfološke promjene (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

### **2.5.7. LIJEČENJE**

Klamidije su osjetljive na pojedine antibiotike kao što su tetraciklini, kinoloni i makrolidi.

U liječenju ptičje klamidioze uobičajeni su tetraciklini i fluorokinoloni (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Od tetraciklina najčešće se koriste doksiciklin, klortetraciklin i oksitetraciklin. Lijek se primjenjuje minimalno 45 dana, peroralnim putem, u hrani, vodi ili izravno u kljun te intramuskularno (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Kod perzistentnih infekcija, eksperimentalni modeli predlažu primjenu tetraciklina ili rifampicina (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Kod primjene oksitetraciklina i doksiciklina prisutne su rezidue u jajima 9 do 26 dana od primjene (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Rezistencija na antibiotike kod *C. psittaci* nije zabilježena (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Od fluorokinolona primjenjuje se enrofloksacin koji se pokazao kao učinkovit u liječenju ptičje klamidioze. Enrofloksacin primjenjuje se prva 3-4 dana intramuskularno u pektoralno mišićje, a nakon toga u hrani ili vodi. Liječenje ne bi trebalo trajati kraće od 14 dana, a najsigurnije 21 dan (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Prije primjene terapije, pticu je potrebno zaštititi od štetnih vanjskih utjecaja koji prouzrokuju stres, poput transporta, hladnoće, loše prehrane, loših zoohigijenskih i zootehničkih uvjeta, a preporučeno je nadziranje te vaganje životinja u slučaju primjene lijeka u hrani. Preporučeno je izbjegavati visoku koncentraciju kalcija poput sipine kosti, drobljenih školjki i mineralnih

dodataka hrani, te ostalih kationa, jer oni inhibiraju resorpciju tetraciklina. Preporučena je redovita dezinfekcija, te čišćenje, čista voda i vitamini kao dodatak prehrani (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

### **2.5.8. PROFILAKSA**

Nakon nabave i prije ulaska nove jedinke u uzgoj ili zajednicu potrebno je provesti karantenu, najmanje 45 dana, a u nekim zemljama provodi se i preventivno liječenje ptica tijekom karantene (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Potrebno je postići te održavati optimalne uvjete za uzgoj ptica, a bitna je i kvaliteta zraka s optimalnom vlagom i temperaturom. Važno je redovito provođenje dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije. U peradarstvu, u svrhu suzbijanja bolesti, primjenjuju se opće preventivne mjere, sprječavanje kontakta domaće peradi sa divljim pticama. Za dezinfekciju koriste se uobičajeni dezinficijensi jer oni nepovoljno utječu na membranu bakterije koja je bogata lipidima, tako će se infektivnost klamidija brzo uništiti primjenom kvarternih amonijevih spojeva u omjeru 1:1000, 70% izopropilnim alkoholom, 1% Lysolom, 3% hidrogenim peroksidom, benzalkolijevim kloridom, alkoholnom otopinom joda i srebrnim nitratom (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Biosigurnosne mjere u peradarstvu obuhvaćaju nošenje maski na farmama i izvršavanje obdukcije sa odgovarajućom zaštitnom opremom (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

### **2.5.9. IMUNOPROFILAKSA**

Za ptičju klamidiozu ne postoji učinkovito komercijalno cjepivo (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Prvi pokušaji razvoja cjepiva započeli su 1978. godine u obliku celularnog (cjelostaničnog) cjepiva, no nije postignuta potpuna zaštita. Pokušan je i razvoj cjepiva namijenjenog puranima, na temelju DNA plazmida, no imunosni odgovor i stvaranje protutijela u domaćina nije bilo uspješno (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). Od tada se nastavlja potraga za odgovarajućim i učinkovitim cjepivom (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

## 2.6. ZONOTSKI POTENCIJAL KLAMIDIJA

Zoonotske bolesti ili zoonoze predstavljaju skupinu bolesti koje su prisutne u ljudi i u životinja, te dolazi do prijenosa uzročnika sa životinje na ljude i obratno (ANONIMUS, 2021c.). Uzročnici su patogeni poput virusa, bakterija, parazita i gljivica, a isti uzrokuju različite oblike bolesti od blagih pa do težih, ponekad i smrt.

Bakterije roda *Chlamydia* su već odavno prepoznate kao jedne od bitnih patogena koje imaju zoonotski potencijal (HALÁNOVÁ i sur., 2019.). Jedan od bitnijih patogena je upravo *C. psittaci* koja je prisutna u ptica, najviše u papiga, a u ljudi uzrokuje psitakozu. Osim *C. psittaci*, zoonotski potencijal ima i *C. felis* koja se javlja u mačaka (HALÁNOVÁ i sur., 2019.). Ove dvije bakterije javljaju se kod životinja koje ljudi drže zbog društva, odnosno kao kućne ljubimce, stoga veterinari u maloj praksi kod respiratornih problema u papiga, te konjunktivitisa kod mačaka, trebaju uzeti u obzir ove bolesti. Osim kod kućnih ljubimaca, klamidije se javljaju i kod drugih domaćih životinja. Tako i *C. abortus* ima zoonotski potencijal, uglavnom je prisutna u malih preživača, a opasna je za trudnice kod kojih može uzrokovati pobačaj. Ovakvi slučajevi su rjeđi, iako i dalje prisutni u nekim ruralnim područjima (ESSIG i LONGBOTTOM, 2015.).

### 2.6.1. ZONOTSKI POTENCIJAL *C. PSITTACI*

Bakterija *C. psittaci* uzrokuje ptičju klamidiozu, primarni domaćini ove bakterije su ptice, odnosno papigašice kao kućni ljubimci, slobodnoživuće ptice i domaća perad, a ostale životinje, kao i ljudi, su slučajni domaćini. Do prijenosa infekcije s ptica na ljude dolazi kada su ljudi izloženi patogenu, odnosno dolaze u direktan ili indirektan kontakt sa inficiranim pticama (ANONIMUS, 2021b.). Bitno je naglasiti da je ova bolest često asimptomatska u ptica, te one ne pokazuju kliničke znakove bolesti, ali su i dalje izvor infekcije (ANONIMUS, 2021c.). Patogen se širi kapljičnim putem ili česticama prašine, rjeđe se prenosi ugrizom papige ili kontaktom kljuna i nosa/usta čovjeka. Uzročnik se ne prenosi sa čovjeka na čovjeka, odnosno takvi slučajevi su vrlo rijetki (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.), niti se ne prenosi konzumacijom mesa ili jaja peradi u prehrani ljudi. Oboljeti mogu ljudi svih dobi, ali učestalija je u odraslih. Povećan rizik od oboljenja imaju ljudi koji su u stalnom doticaju sa pticama, bilo kućnim ljubimcima ili peradi, odnosno ljudi

poput vlasnika papiga, uzgajivača, veterinarskih djelatnika, radnika u peradarskoj industriji, radnika u klaonicama i radnika u trgovinama s pticama (RAVICHANDRAN i sur., 2021.).

Psitakoza u ljudi se javlja sporadično ili epidemijski, može biti lakšeg ili težeg oblika sa smrtnosti od 0,5 do 1%. Inkubacija traje od 5 do 14 dana, no može i dulje. Psitakoza u ljudi je uglavnom blaga bolest, te može proći inaparentno (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Uobičajeni simptomi su glavobolja, grlobolja, bol u mišićima, slabost, mijalgija, vrućica, drhtanje i suhi kašalj, rijetko uzrokuje pneumoniju koja zahtjeva hospitalizaciju, još rjeđe smrt u ljudi. Osim navedenih simptoma mogu se pojaviti svrbež i gastrointestinalni simptomi poput mučnine, povraćanja, proljeva; rijetko se javlja sustavna bolest koja uključuje endokarditis, miokarditis, hepatitis, akutni respiratorni distres sindrom, višestruko zatajenje organa, bubrežne komplikacije i neurološke simptome (WEYGAERDEA i sur., 2018.). Ukoliko dođe do pogoršanja općeg stanja i razvoja pneumonije, potrebna je hospitalizacija. Tijekom hospitalizacije rade se pretrage, uzimaju uzorci krvi, bris nosa i grla i rendgen. Na plućima su prisutne promjene u obliku infiltrata.

Psitakoza se potvrđuje izolacijom bakterije *C. psittaci* putem PCR pretrage, dokazom specifičnog antigena ili protutijela (WEYGAERDEA i sur., 2018.).

Prognoza je povoljna uz pravilnu terapiju. Kod ljudi u liječenju psitakoze primjenjuju se tetraciklini, odnosno doksiciklin peroralno ili intravenski, u trajanju od 10 do 14 dana. Kod djece i trudnica kod kojih je kontraindicirana primjena tetraciklina, primjenjuju se makrolidni antibiotici poput eritromicina i azitromicina, peroralno, tijekom 7 dana (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.)

Pošto se psitakoza bitno ne razlikuje od ostalih respiratornih bolesti u ljudi, prilikom dolaska liječniku pacijenti bi trebali naglasiti da su bili u doticaju sa pticama. Upravo zbog toga potrebno je educirati vlasnike ptica, uzgajivače, veterinarske djelatnike i radnike u peradarskoj industriji o ovoj bolesti.

Jedan od najčešćih prijenosa bakterije *C. psittaci* je kontaktom između ptice kućnog ljubimca i vlasnika. Do prijenosa bakterije sa papige na vlasnika obično dolazi u vlastitom domu, ali opisani su slučajevi prijenosa u trgovini sa kućnim ljubimcima (DE BOECK i sur., 2016.).

Osim vlasnika papiga, rizik od oboljenja imaju i veterinari. Opisani su slučajevi psitakoze u veterinaru koji su bili u kontaktu sa inficiranim pticama tijekom kliničkog pregleda i razudbe

(GOSBELL i sur., 1999.), ali i u onih koji su bili u kontaktu sa pticama u svrhu istraživanja (VAN DROOGENBROECK i sur., 2009.). Kod nekih veterinarâ bolest je bila asimptomatska ili se javila u blagom obliku, kod ostalih su se javili uobičajeni simptomi poput vrućice, glavobolje i kašlja. Nakon pretraga i potvrde psitakoze, uslijedila je terapija antibioticima i poboljšanje općeg stanja. Kod veterinarâ koji često rade sa pticama moguća je i reinfekcija (GOSBELL i sur., 1999.).

Infekcija *C. psittaci* često se javlja i u peradarskoj industriji, osim što uzrokuje ekonomske štete, predstavlja rizik za sve radnike koji dolaze u doticaj sa inficiranom peradi (GAEDE i sur., 2008.). Opisani su slučajevi kada je *C. psittaci* uzrokovala bolest i kod radnika na farmama. Simptomi koji su se javili bili su slični gripi; vrućica, glavobolja, bol u mišićima i kašalj. Osim blagih, zabilježeni su slučajevi težih oblika bolesti kojima je bila potrebna hospitalizacija. Dijagnostikom je utvrđeno da teži oblik bolesti uzrokuje genotip A (GAEDE i sur., 2008.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. OPIS KLINIČKOG SLUČAJA KLAMDIOZE U PAPIGE I DJETETA

Dana 22. kolovoza 2019. u Kliniku Zavoda za bolesti peradi zaprimljena je uginula papiga nimfa, stara nekoliko mjeseci radi razudbe. Također, kako se u istom domaćinstvu nalaze i dvije papige tigrice, vlasnica donosi skupni uzorak izmeta tih ptica. Temeljem patoanatomskog nalaza postavljena je sumnja na klamidiozu, te su uzorci organa nimfe i dostavljeni izmet tigrica proslijeđeni u Laboratorij za klamidije (CHLAMlab) Zavoda za bolesti peradi s klinikom Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi dokaza bakterija roda *Chlamydia*.

Dana 19. rujna 2019. godine u djeteta dobi 6 godina razvili su se dišni simptomi, radi čega je potražena liječnička pomoć u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. U epidemiološkoj anamnezi navodi se kako je dijete bilo u kontaktu sa papigom u koje je utvrđena infekcija sa *C. psittaci*. Kliničkim statusom vidljivo je da je dijete subfebrilno, uredne svijesti, dobrog općeg stanja, a na plućima se nalazi normalni šum disanja, stoga je postavljena dijagnoza *Catarrhus respiratorius febrilis* i provedena je terapija azitromicinom per os kroz 5 dana. U isto vrijeme uzeti su uzorci seruma radi dokaza specifičnih protutijela protiv *M. pneumoniae* i *C. psittaci*, te bris nosa radi dokaza *M. pneumoniae* i *C. psittaci*. Bris nosa i uzorak seruma proslijeđeni su u CHLAMlab radi dokaza *C. psittaci* PCR metodom u stvarnom vremenu.

#### 3.2. IZDVAJANJE DNK I DOKAZ KLAMIDIJA IZ UZORAKA

Iz uzoraka organa papige nimfe, skupnog uzorka izmeta papiga tigrica, te obriska nosa i uzorka seruma djeteta izdvojena je DNK korištenjem GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kita (Sigma-Aldrich, SAD), prema uputama proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je u hladnjaku pri -20 °C do pretrage.

Identifikacija klamidija obavljena je pomoću PCR u stvarnom vremenu, korištenjem specifičnih početnica za dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae*, umnažanjem 23S rRNA gena (EHRICHT i sur., 2006.) i specifičnih početnica za dokaz vrste *C. psittaci* umnažanjem incA gena (MENARD, 2006.) (Tablica 1.).

Tablica 1. Prikaz specifičnih početnica i proba za umnažanje klamidija.

Gen	Početnice	Proba
23S rRNA	F: 5'-CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT-3' R: 5'-ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC-3'	FAM 5'-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG-3'- TAMRA
incA	F: 5'-GCC ATC ATG CTT GTT TCG TTT-3' R: 5'-CGG CGT GCC ACTT GAG A-3'	FAM-TCATTGTCATTATGGTGATTGAGGA- BHQ1

Svaka reakcijska smjesa, tzv. mastermix sadržavala je:

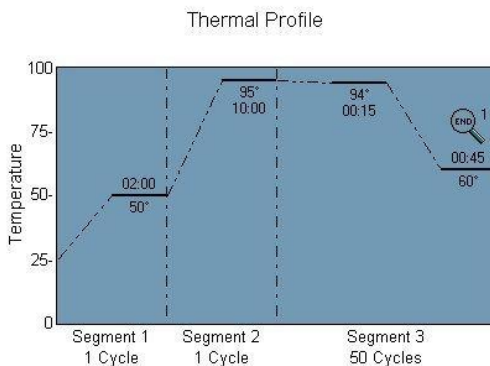
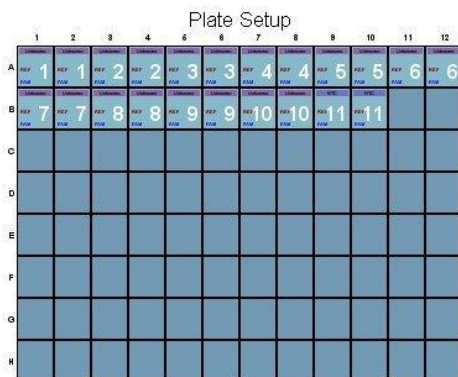
- 10 µl Universal Mastermix 2X (Promega, Njemačka)
- 0,5 µl svake početnice(25µM) (Sigma, Njemačka)
- 2 µl probe (1µM) (Sigma, Njemačka)
- 1,8 µl deionizirane vode
- 0,2 µl ROX
- 5 µl DNA

Svaki uzorak rađen je u duplikatu, uz pozitivnu (*C. psittaci*) i negativnu kontrolu (ultračista voda), također u duplikatu.

Uzorci su analizirani uređajem Mx3005P (Stratagene, SAD) s TaqMan sustavom identifikacije umnoženih odsječaka, pri sljedećim uvjetima: 95 °C 10 minuta, umnažanje tijekom 50 ciklusa s denaturacijom pri 95 °C tijekom 15 sekundi, sparivanje početnica pri 60 °C tijekom 60 sekundi kada se očitava fluorescencija. Krivulja taljenja očitana je u sljedećem segmentu, nakon umnažanja, kontinuiranim očitavanjem fluorescencije u rasponu od 60 °C do 95 °C.

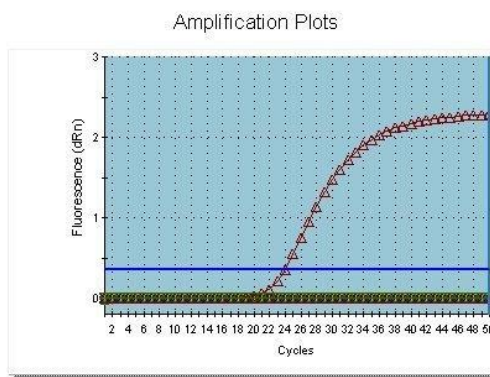
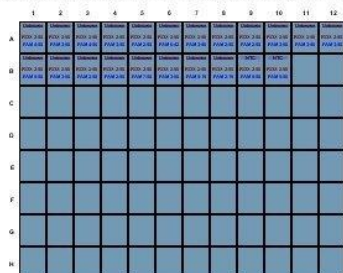
Prema dobivenim podacima (Slika 4.), određeni su pozitivni, tj. negativni uzroci na prisutnost *Chlamydiacea* i *C. psittaci*. Pozitivni su oni uzorci koji u oba ponavljanja imaju Ct vrijednost (Ct vrijednost = točka umnažanja prema graničnoj vrijednosti) od 38 do 40.





#### Analysis Sel./Setup-Term Settings View

Amplification-based threshold using search range of 5 to 60 percent.  
 Moving average points for amplification = 3, dissociation = 3.  
 Dissociation graphical temperature separation = 0.60.  
 Baseline Settings Plate: \* indicates manual baseline cycle range settings.



**Slika 4.** PCR u stvarnom vremenu: mreža sa dvostruko pripremljenim uzorcima (11 uzoraka, od kojih je jedan pozitivna kontrola, a jedan negativna kontrola, svi stavljeni u po dvije kolone); termalna krivulja; prikaz rezultata po kolonama i grafički prikaz rezultata (*amplification plot*).

### 3.3. SEKVENCIJIRANJE *C. PSITTACI*

Djelomični ompA gen vrste *C. psittaci* umnožen je radi sekvenciranja i genotipizacije. Korištene početnice bile su:

- CTU-F - TCGATGGCACTATGTGGGAA
- CTL-R - GTGCACCYAYGCTCCAAGA (ZOCEVIC i sur., 2012).

Reakcijska smjesa, tzv. mastermix sadržavala je:

-25 µL GoTag Green Master Mix 2X (Promega, SAD),

- 2  $\mu$ l svake početnice (10  $\mu$ M) (Sigma, Njemačka)

- 16  $\mu$ l deionizirane vode

- 5  $\mu$ l DNA

Uzorci su analizirani uređajem Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD), pri slijedećim uvjetima: 95 °C 2 minute, umnažanje tijekom 35 ciklusa s denaturacijom pri 94 °C tijekom 30 sekundi, sparivanje početnica pri 60 °C tijekom 60 sekundi, 72 °C tijekom 60 sekundi i 72 °C tijekom 5 minuta. Dobiveni umnošci vizualizirani su na 1% agaroznom gelu. Veličina ulomaka iznosila je otprilike 1200-1400 parova baza.

Izolacija i pročišćavanje DNK odsječaka iz agaroznog gela izvedeno je prema uputama proizvođača, korištenjem ReliaPrep™ DNA Clean-up Concentration System kita (Promega, SAD). Koncentracija DNK u oba uzorka određena je korištenjem BioDrop uređaja (Biodrop Ltd., Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), nakon čega su uzorci sekvencirani Sangerovom metodom (Macrogen Inc., Amsterdam, Nizozemska).

Dobivene sekvence analizirane su korištenjem programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) 10.0.5. (KUMAR i sur., 2018.). Filogenetska analiza sekvenci izvedena je Maximum Likelihood metodom i Kimura 2-parameter modelom s gama distribucijom (KIMURA, 1980.). U analizi su korištene referentne sekvence (Tablica 2.) različitih genotipova dostupnih u bazi podataka GenBank- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Tablica 2. Prikaz referentnih sekvenci korištenih u filogenetskoj analizi.

Vrsta	Podrijetlo	Država	Genotip	Referentna oznaka
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Nymphus hollandicus</i>	Poljska	A	MH507065.1
	<i>Ara macao</i>	Poljska	A	MH507063.1
	<i>Amazona aestiva</i>	Brazil	A	MH138292.1
	<i>Agapornis roseicollis</i>	Tajvan	A	MK032057.1
	<i>Pionites melanocephalus</i>	Tajvan	A	MK032055.1
	<i>Psittacus erithacus</i>	Nizozemska	A	HQ845547.1
	<i>Streptopelia tranquebarica</i>	Tajvan	B	MK032065.1
	<i>Columba livia</i>	Tajvan	B	MK032062.1
	<i>Columba livia</i>	Tajvan	B	MK032063.1
	<i>Anas platyrhynchos</i>	Njemačka	C	AF269261.1
	<i>Meleagris gallopavo</i>	SAD	C	AF269260.1
	<i>Columba livia</i>	Italija	D	AY762610.1
	<i>Meleagris gallopavo</i>	SAD	D	AF269266.1
	<i>Anas sp.</i>	Njemačka	E/B	EU019091.1
	<i>Anas platyrhynchos</i>	Belgija	E/B	AY762613.1
	<i>Columba livia</i>	Italija	E	AY762611.1
<i>Meleagris gallopavo</i>	Belgija	F	AY762612.1	
<i>Chlamydia gallinacea</i>	<i>Gallus domesticus</i>	Kina	-	KT692977.1

#### 4. REZULTATI

Razudbom papige nimfe uočene su promjene koje su upućivale na klamidiozu, stoga su uzorci organa proslijeđeni u laboratorij radi dokaza bakterija roda *Chlamydiaceae*. Kako su u istom domaćinstvu boravile i dvije papige tigrice, vlasnici su dostavili i skupni uzorak izmeta radi dokaza istih bakterija. PCR-om u stvarnom vremenu u svih ispitanih uzoraka dokazana je prisutnost bakterija roda *Chlamydiaceae* i vrste *C. psittaci*.

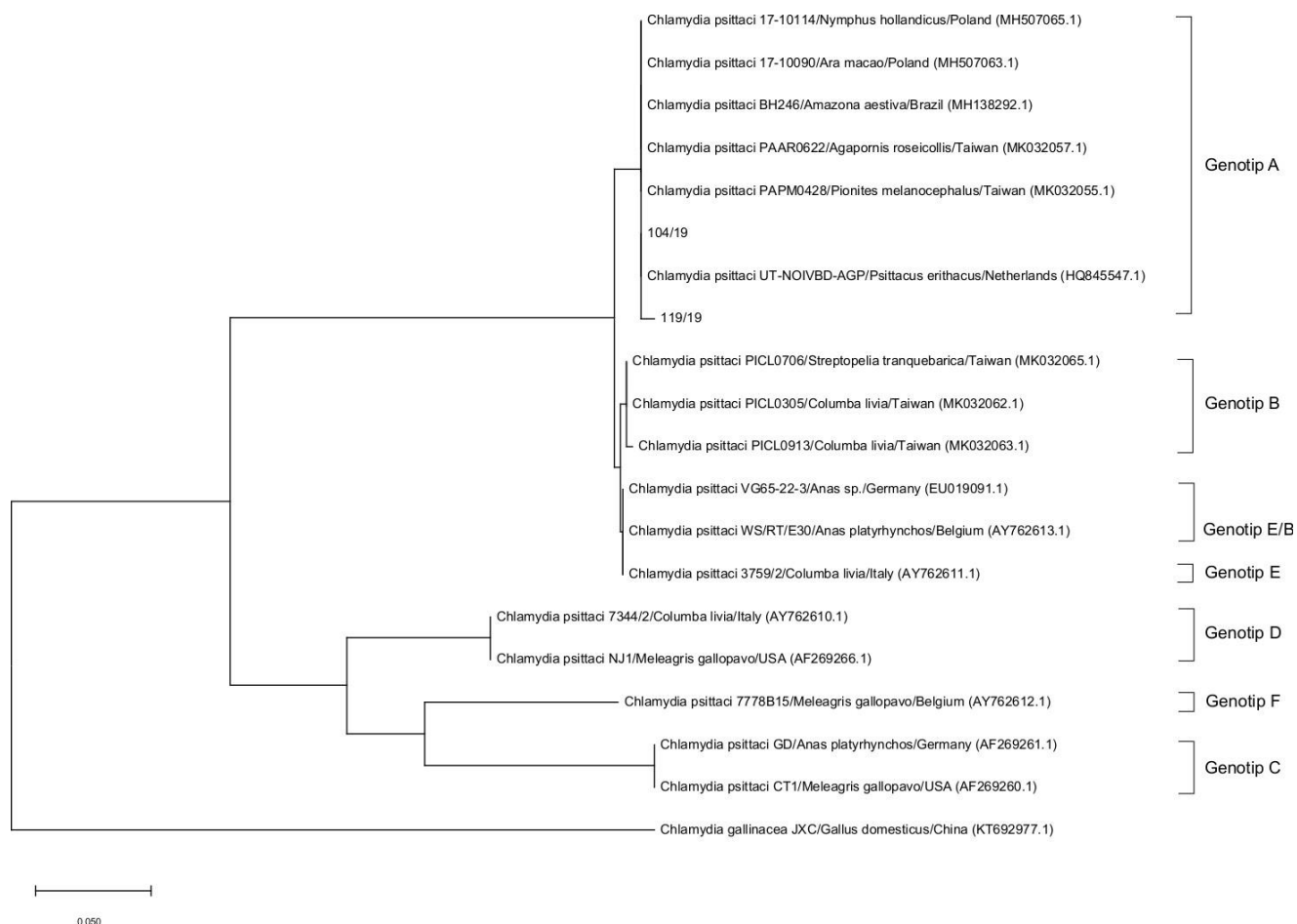
Otprilike tri tjedna od pozitivnog nalaza klamidija u papiga, u djeteta koje je boravilo u istom kućanstvu uočeni su dišni simptomi (hroptanje, subfebrilnost). Pregledom u Klinici „Dr. Fran Mihaljević“ postavljena je sumnja na psitakozu, te su uzorci seruma i brisa nosa poslani u CHLAMlab radi dokaza klamidija. U brisu nosa metodom PCR u stvarnom vremenu dokazana je prisutnost bakterija roda *Chlamydiaceae* i vrste *C. psittaci*, dok je uzorak seruma bio negativan. Nalazi Ct vrijednosti ispitanih uzoraka prikazani su u Tablici 3.

Radi usporedbe dokazanih klamidija i određivanja genotipa *C. psittaci*, urađeno je sekvenciranje ompA gena. Analizom dobivenih sekvenci i usporedbom sa referentnim sekvencama različitih genotipova dostupnih u bazi podataka NCBI, utvrđena je velika podudarnost uzoraka porijeklom od papiga i djeteta, te je dokazan genotip A u svim pretražujućim uzorcima (oznaka uzorka ptica 104/19 i uzorka djeteta (119/19) (Slika 5.).

Papige tigrice u kućanstvu liječene su sukladno propisima i pod nadzorom veterinarske inspekcije (enrofloksacin kroz 21 dan), a dijete je liječeno azitromicinom kroz 5 dana. Ponovljeno testiranje papiga tigrice dalo je negativne rezultate, a negativan nalaz potvrđen je i 10 mjeseci kasnije, točnije u lipnju 2020. godine, kada su iste papige ponovo pretražene na klamidiozu i bile negativne. Podatci o izlječenju djeteta nisu bili dostupni.

Tablica 3. Prikaz Ct vrijednosti ispitanih uzoraka papiga i djeteta.

Oznaka i vrsta uzorka	Ct vrijednost <i>Chlamydiaceae</i>	Ct vrijednost <i>C. psittaci</i>
104/19	15,53/15,16	18,80/19,28
119/19	39,04/39,04	38,49/38,44



Slika 5. Filogenetska analiza sekvenci ompA gena *C. psittaci* porijeklom od papiga (104/19) i djeteta (119/19) (Maximum Likelihood metoda i Kimura 2-parameter model s gama distribucijom).

## 5. RASPRAVA

Bakterija *C. psittaci*, uzročnik klamidioze, važne zoonotske bolesti, inficira brojne i različite vrste ptica. Zaražene ptice, bilo simptomatski ili asimptomatski, povremeno izlučuju uzročnika kroz respiratorni i gastrointestinalni sustav, te su iscjedak iz oka i nosnica odnosno izmet, glavni izvor zaraze za druge ptice ili ljude (LIU i sur., 2019.).

Psitakoza je zoonotska zarazna bolest koju, kao i u ptica, uzrokuje *C. psittaci*. Prijenos bolesti obično se događa tijekom bliskog kontakta sa zaraženim pticama, najčešće u kontekstu peradarske proizvodnje ili zbog kontakta sa različitim vrstama papiga (BEECKMAN i VANROMPAY, 2009.). Zbog niske svijesti o samoj bolesti i promjenjive kliničke slike, liječnici često ne prepoznaju psitakozu. Stoga je neophodno prilikom pregleda, a u slučaju pojave dišnih znakova, napomenuti kako postoji mogućnost zaraze sa *C. psittaci* zbog bliskog kontakta za pticama. U posljednje vrijeme, pregledom dostupne literature i provedbom istraživanja, sve su više vidljivi dokazi o prijenosu klamidija s purana, pilića i pataka na ljude, uz tradicionalno poznate izvore bolesti kao što su ptice iz reda Psittaciformes. Papige se ne smiju zanemariti kao važan izvor psitakoze za ljudi, no liječnici bi također trebali uključiti perad u povijest bolesti i smatrati ih mogućim izvorom psitakoze (HOGERWERF i sur., 2020.).

1930-ih godina diljem svijeta dogodile su se velike epidemije psitakoze, uzrokovane trgovinom papigama i drugim tropskim pticama (RAMSAY, 2003.). Danas su slučajevi psitakoze obično ograničeni na lokalna izbijanja, manje skupine zaraženih ili izolirane slučajeve (HAAS i sur., 2006.; KAIBU i sur., 2006.; GAEDE i sur., 2008.). Zbog nespecifičnih simptoma i činjenice da se često samo teško bolesni pacijenti testiraju na *C. psittaci*, bolest je vjerojatno nedovoljno dijagnosticirana i nedovoljno prijavljivana (HOGERWERF i sur., 2020.).

Molekularne metode preporučene su metode za dijagnostiku klamidioze zbog toga što su brze, osjetljive i specifične (RAVICHANDRAN i sur., 2021.). U epidemiološke svrhe, karakterizacija *C. psittaci* pruža znanje o najčešćim genotipovima u povezanim infekcijama ptica i ljudi, potvrđuje vjerojatne izvore i pomaže u procesu prijavljivanja, nadzora i upravljanja epidemijom (HOGERWERF i sur., 2020.).

U ovom prikazu slučaja klamidioze/psitakoze u papiga i djeteta, uzorci organa i skupni uzorak izmeta prikupljeni su od uginule papige nimfe odnosno dvije papige tigrice, te od djeteta (uzorak

seruma i bris nosa) koje je živjelo u istom kućanstvu kao i pozitivne ptice. Iz svih pretraženih uzoraka, osim uzorka seruma djeteta, izdvojena je *C. psittaci* PCR-om u stvarnom vremenu. Kako su uzorci uginule papige nimfe pretraženi zajedno sa skupnim uzorkom izmeta papiga tigrica, nemoguće je utvrditi da li je glavni izvor bolesti bila papiga nimfa, koja je onda i uginula zbog posljedica klamidioze, ili novonabavljene papige tigrice, koje su prenijele bolest na nimfu i same bile pozitivne, ali asimptomatske, bez kliničkih znakova bolesti.

Temeljem sekvenciranja *ompA* gena dokazana je velika sličnost izolata *C. psittaci* iz papiga i djeteta, a i svi su uzorci identificirani kao genotip A. Ti se nalazi poklapaju sa onima koje su prikazali HEDDEMA i sur. (2015), koji su u istraživanju dokazali kako su genotipovi A i B vrste *C. psittaci* bili najčešći uzročnici psitakoze u Nizozemskoj. Slično istraživanje proveli su GEDYE i sur. (2018.) koji su također utvrdili kako su dva genotipa (A i C) vrste *C. psittaci* najčešće prisutni u domaćih i uvezenih ptica na Novom Zelandu, te da su oba ova genotipa globalno povezana sa značajnom bolešću kod ptica i ljudi.

Kada se postavi sumnja na klamidiozu/psitakozu, važno je dobiti informacije o izvoru infekcije kako bi se izbjeglo daljnje širenje zaraze, bilo na životinje ili ljude. Nažalost, često je teško odrediti podrijetlo infekcije ili obiteljski kontekst, s jasnom i identificiranom izloženošću pticama. Također, mala količina klamidijske DNK u ljudskim uzorcima, osobito kada se kao uzorci za dokaz klamidija koriste oni uzeti neinvazivnim načinom (bris grla, nazofaringealni aspirati), otežava sekvenciranje i genotipizaciju (VORIMORE i sur., 2021.). Stoga je iznimno korisno prikazati ovakav klinički slučaj, gdje se iz brisa nosa djeteta uspjelo izdvojiti *C. psittaci*, genotipizirati isti i usporediti ga s onim izdvojenim iz papiga.

I klamidioza u ptica i psitakoza u ljudi su bolesti koje se liječe antibiotiskim pripravcima. Tako su papige tigrice u kućanstvu liječene sukladno propisima i pod nadzorom veterinarske inspekcije (enrofloksacin kroz 21 dan), a dijete je liječeno azitromicinom kroz 5 dana. Ponovljeno testiranje papiga tigrica dalo je negativne rezultate, a negativan nalaz potvrđen je i 10 mjeseci kasnije, točnije u lipnju 2020. godine, kada su iste papige ponovo pretražene na klamidiozu i bile negativne.

Kako bi se spriječilo širenje klamidioze na druge ptice ili ljude, neophodno je nabavljati ptice iz provjerenih izvora, pridržavati se biosigurnosnih mjera, održavati higijenu krletki i redovito uklanjati izmet. Ukoliko se bolesti u ptica ipak pojavi, neophodno je poštovati sve propisane zakonske mjere, prijaviti sumnju ili potvrdu same bolesti, te provoditi liječenje i dezinfekciju. U

slučaju pojave psitakoze, neophodno je liječniku spomenuti kontakt sa bilo kojom vrstom ptice, posebice ako su se u njih također pojavili znakovi klamidioze.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Uzročnik klamidioze, bakterija *C. psittaci*, inficira različite vrste ptica i ljude. Zaražene ptice povremeno izlučuju uzročnika kroz respiratorni i gastrointestinalni sustav, te su iscjedak iz oka i nosnica odnosno izmet, glavni izvor zaraze za druge ptice ili ljude.
2. Ljudi se najčešće zaraze bliskim kontaktom sa pozitivnim papigama, ali sve češće i preko zaražene peradi (purani, pilići, patke).
3. Iz uzoraka organa i izmeta papiga nimfe i tigrica izdvojena je *C. psittaci*, kao i iz brisa nosa djeteta koje je živjelo u istom kućanstvu. Genotipizacijom je utvrđen genotip A, a i sekvence izdvojene *C. psittaci* iznimno su slične, čime se potvrđuje da su papige bile izvor bolesti za dijete.
4. Kako bi se spriječilo širenje klamidioze/psitakoze, neophodno je nabavljati ptice iz provjerenih izvora, pratiti znakove bolesti u papiga i ljudi, te se strogo pridržavati biosigurnosnih mjera kako bi se spriječilo daljnje širenje bolesti.

## 7. LITERATURA

1. ABDELRAHMAN, Y. M., R. J. BELLAND (2005.): The chlamydial developmental cycle. FEMS Microbiol. Rev. 29, 949–959.
2. ANONIMUS (2021a.): Psittacosis, <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/psittacosis/about/causes.html> (pristupljeno 3.12.2021.)
3. ANONIMUS (2021b.): Chlamydia trachomatis. [https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia\\_trachomatis](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia_trachomatis) (pristupljeno 14.09.2021.).
4. ANONIMUS (2021c.): Zoonotic diseases, <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html> (pristupljeno 3.12.2021.)
5. BARRON, A. L., H. J. WHITE, R. G. RANK, B. L. SOLOFF, E. B. MOSES (1981.): A New Animal Model for the Study of *Chlamydia trachomatis* Genital Infections: Infection of Mice with the Agent of Mouse Pneumonitis. J. Infect. Dis. 143(1), 63-66. <https://doi.org/10.1093/infdis/143.1.63>
6. BAVOIL, P., B. KALTENBOECK, G. GREUB (2013.): In Chlamydia veritas. Path. Dis. 67, 89–90. DOI:10.1111/2049-632X.12026
7. BEECKMAN, D. S. A., D. C. G. VANROMPAY (2009.): Zoonotic Chlamydophila psittaci infections from a clinical perspective. Clin. Microbiol. Infect. 15(1), 11-17. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02669.x>
8. BIĐIN, Z. (2008.): Bolesti peradi. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
9. CHERIAN P.V., W. E. MAGEE (1990.): Monoclonal antibodies to *Chlamydia psittaci* guinea pig inclusion conjunctivitis (GPIC) strain. Vet. Microbiol. 22, 43-51.
10. COSSEE, M. M., R. D. HAYWARD, A. SUBTIL (2018.): One Face of *Chlamydia trachomatis*: The Infectious Elementary Body. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 412, 35-58. DOI: 10.1007/82\_2016\_12

11. ČECHOVÁ, L., M. HALÁNOVÁ, I. BABINSKÁ, O. DANIŠOVÁ, M. BARTKOVSKÝ, S. MARCINČÁK, D. MARCINČÁKOVÁ, A. VALENČÁKOVÁ, L. ČISLÁKOVÁ (2018.): Chlamydiosis in farmed chickens in Slovakia and zoonotic risk for humans. *Ann. Agric. Environ. Med.* 25 (2), 320-325. doi: 10.26444/aaem/82948.
12. DE BOECK, C., C. DEHOLLOGNE, A. DUMONT, M. SPIERENBURG, M. HEIJNE, I. GYSSENS, J. VAN DER HILST, D. VANROMPAY (2016.): Managing a cluster outbreak of psittacosis in Belgium linked to a pet shop visit in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 144(8), 1710-1716. DOI: 10.1017/S0950268815003106
13. EHRICHT, R., P. SLICKERS, S. GOELLNER, H. HOTZEL, K. SACHSE (2006.): Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell. Prob.* 20, 60-63.
14. ESSIG, A., D. LONGBOTTOM (2015.): Chlamydia abortus: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 2, 22–34. DOI 10.1007/s40588-015-0014-2
15. EVERETT, K. D. E., R. M. BUSH, A. A. ANDERSEN (1999.): Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 415-440. DOI: 10.1099/00207713-49-2-415
16. FUKUSHI, H., K. HIRAI (1992.): Proposal of Chlamydia pecorum sp. nov. for Chlamydia Strains Derived from Ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 306-308. DOI: [10.1099/00207713-42-2-306](https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-306)
17. GAEDE, W., K.-F. RECKLING, B. DRESENKAMP, S. KENKLIE, E. SCHUBERT, U. NOACKL, H.-M. IRMSCHER, C. LUDWIG, H. HOTZEL, K. SACHSE (2008.): Chlamydophila psittaci Infections in Humans during an Outbreak of Psittacosis from Poultry in Germany. *Zoonoses Public Health.* 55(4), 184–188. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01108.x>

18. GEDYE, K. R., M. FREMAUX, J. C. GARCIA-RAMIREZ, B. D. GARTRELL (2018.): A preliminary survey of *Chlamydia psittaci* genotypes from native and introduced birds in New Zealand. *New Zealand Vet. J.* 66, 3, 162-165. DOI: 10.1080/00480169.2018.1439779
19. GOSBELL, I., A. ROSS, I. TURNER (1999.): *Chlamydia psittaci* infection and reinfection in a veterinarian. *Aust. Vet. J.* 77, 8, 511-513. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb12121.x>
20. HAAS, L. E., D. H. TJAN, M. A. SCHOUTEN, A. R. VAN ZANTEN (2006): Severe pneumonia from psittacosis in a bird-keeper. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 150 (3), 117–121.
21. HALÁNOVÁ, M., L. PETROVÁ, M. HALÁN, A. TRBOLOVÁ, I. BABINSKÁ, T. WEISSOVÁ (2019.): Impact of way of life and environment on the prevalence of *Chlamydia felis* in cats as potential sources of infection for humans. *Ann. Agric. Environ. Med.* 26 (2), 222-226. <https://doi.org/10.26444/aaem/100655>
22. HEDDEMA, E. R., E. J. VAN HANNEN, M. BONGAERTS, F. DIJKSTRA, R. J. TEN HOVE, B. DE WEVER, D. VANROMPAY (2015.): Typing of *Chlamydia psittaci* to monitor epidemiology of psittacosis and aid disease control in the Netherlands, 2008 to 2013. *Euro Surveill.* 20(5), pii=21026. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.5.21026>
23. HENG, C. C., C. Y. Q. LEE, Y. Y. CHEOK, G. M. Y. TAN, C. Y. LOOI, W. F. WONG (2019.): Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms* 24, 7 (5), 146.[doi.org/10.3390/microorganisms7050146](https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146)
24. HOGERWERF, L., I. ROOF, M. J. K. DE JONG, F. DIJKSTRA, FREDERIKA, W. VAN DER HOEK (2020.): Animal sources for zoonotic transmission of psittacosis: a systematic review. *BMC Infect Dis* 20, 192. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4918-y>
25. KAIBU, H., K. IIDA, S. UEKI, H. EHARA, Y. SHIMASAKI, S. WATANABE (2006.): Psittacosis in all four members of a family in Nagasaki, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59 (5), 349–350.

26. KIMURA, M. (1980.): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
27. KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ, K. TAMURA (2018.): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
28. KUO, C.C., L. A. JACKSON, L. A. CAMPBELL, J. T. GRAYSTON (1995.): *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* 8 (4), 451-461. DOI: [10.1128/CMR.8.4.451](https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.451)
29. LI, M., M. JELOCNIK, F. YANG, J. GONG, B. KALTENBOECK, A. POLKINGHORNE, Z. FENG, Y. PANNEKOEK, N. BOREL, C. SONG, P. JIANG, J. LI, J. ZHANG, Y. WANG, J. WANG, X. ZHOU, C. WANG (2017.): Asymptomatic infections with highly polymorphic *Chlamydia suis* are ubiquitous in pigs. *BMC Vet. Res.* 13(1), 370. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1295-x>
30. LIU, S. Y., K. P. LI, M. K. HSIEH, P. C. CHANG, J. H. SHIEN, S. C. OU (2019.): Prevalence and Genotyping of *Chlamydia psittaci* from Domestic Waterfowl, Companion Birds, and Wild Birds in Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 19 (9), 666-673. doi: 10.1089/vbz.2018.2403.
31. MENARD, A. (2006): Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J. Med. Microbiol.* 55, 471–473.
32. PRUKNER-RADOVČIĆ, E. (2010.): Bolesti ptica kućnih ljubimaca. Medicinska naklada. Zagreb, Hrvatska.
33. RAMSAY, E.C. (2003.): The psittacosis outbreak of 1929-1930. *J. Avian Med. Surg.* 17, 235–237.
34. RAMSEY, K. H., I. M. SIGAR, J. H. SCHRIPEMA, C. J. DENMAN, A. K. BOWLIN, G. A. MYERS, R. G. RANK (2009.): Strain and virulence diversity in the mouse pathogen *Chlamydia muridarum*. *Infect. Immun.* 77 (8), 3284-3293.
35. RAVICHANDRAN, K., S. ANBAZHAGAN, K. KARTIH, M. ANGAPPAN, B. DHAYANANTH (2021.): A comprehensive review on avian chlamydiosis: a neglected

zoonotic disease. Trop. Anim. Health Prod. 27, 53 (4), 414. doi.org/10.1007/s11250-021-02859-0

36. SACHSE, K., E. VRETOU, M. LIVINGSTONE, N. BOREL, A. POSPISCHIL, D. LONGBOTTOM (2009.): Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet. Microbiol. 135, 2-21. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.040
37. SACHSE, K., K. LAROUCAU, K. RIEGE, S. WEHNER, M. DILCHER, H. H. CREAMY, M. WEIDMANN, G. MYERS, F. VORIMORE, N. VICARI, S. MAGNINO, E. LIEBLER-TENORIO, A. RUETTGER, P. M. BAVOIL, F. T. HUFERT, R. ROSSELLÓ-MÓRA, M. MARZ (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 (2), 79-88. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.004.
38. SACHSE, K., K. LAROUCAU, D. VANROMPAY (2015.): Avian Chlamydiosis. Curr Clin Micro Rpt. 2, 10-21. doi 10. 1007/s40588-014-0010-y.
39. STEPHENS, R. S., G. MYERS, M. EPPINGER, P. M. BAVOIL (2009.): Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. FEMS Immun. Med. Microbiol. 55, 115–119. DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00516.x
40. VAN DROOGENBROECK, C., D. S. A. BEECKMAN, K. VERMINNEN, M. MARIEN, H. NAUWYNCK, L. DE THIBAUT DE BOESINGHE, D. VANROMPAY (2009.): Simultaneous zoonotic transmission of *Chlamydophila psittaci* genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist. Vet. Microbiol. 16, 135 (1-2), 78-81. DOI:10.1016/j.vetmic.2008.09.047
41. VANROMPAY, D., J. MAST, R. DUCATELLE, F. HAESEBROUCK, B. GODDEERIS (1995.): *Chlamydia psittaci* in turkeys: pathogenesis of infections in avian serovars A, B and D. Vet. Microbiol. 47 (3-4), 245-256. doi.org/10.1016/0378-1135(95)00125-5
42. VANROMPAY, D. (2013.): Avian Chlamydiosis. U: Diseases of Poultry, 13th edition (Swayne, D., ur.). Ames: Wiley- Blackwell Publishing, SAD.
43. VORIMORE, F., R. AAZIZ, B. DE BARBEYRAC, O. PEUCHANT, M. SZYMANSKA-CZERWINSKA, B. HERRMANN, C. SCHNEE, K. LAROUCAU (2021.): A New SNP-

Based Genotyping Method for *C. psittaci*: Application to Field Samples for Quick Identification. *Microorganisms* 9, 625.

44. WEYGAERDEA, Y. V., C. VERSTEELEB, E. THIJSA, A. D. SPIEGELEERA, J. BOELENSC, D. VANROMPAY, E. VAN BRAECKELA, K. VERMAELENA (2018.): An unusual presentation of a case of human psittacosis. *Respir. Med. Case Rep.* 23, 138–142. [doi.org/10.1016/j.rmcr.2018.01.010](https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2018.01.010)
45. ZOCEVIC, A., F. VORIMORE, C. MARHOLD, D. HORVATEK, D. WANG, B. SLAVEC, Z. PRENTZA, G. STAVIANIS, E. PRUKNER-RADOVCIC, A. DOVC, V. I. SIARKOU, K. LAROUCAU (2012): Molecular characterization of atypical *Chlamydia* and evidence of their dissemination in different European and Asian chicken flocks by specific real-time PCR. *Environ. Microbiol.* 14, 2212–2222.

## 8. SAŽETAK

Uzročnik klamidioze, bakterija *C. psittaci*, inficira različite vrste ptica i ljude. Zaražene ptice povremeno izlučuju uzročnika kroz respiratorni i probavni sustav, te su iscjedak iz oka i nosnica odnosno izmet, glavni izvor zaraze za druge ptice ili ljude. Ljudi se najčešće zaraze bliskim kontaktom sa pozitivnim papigama, ali sve češće i preko zaražene peradi (purani, pilići, patke). U ovom prikazu slučaja klamidioze/psitakoze u papiga i djeteta, uzorci organa i skupni uzorak izmeta prikupljeni su od uginule papige nimfe odnosno dvije papige tigrice, te od djeteta (uzorak seruma i bris nosa) koje je živjelo u istom kućanstvu kao i pozitivne ptice. Iz svih pretraženih uzoraka, osim uzorka seruma djeteta, izdvojena je *C. psittaci* PCR-om u stvarnom vremenu. Sekvenciranjem *ompA* gena dokazana je velika sličnost izolata *C. psittaci* iz papiga i djeteta, te su svi uzorci identificirani kao genotip A, čime se potvrđuje da su papige bile izvor bolesti za dijete. Kako bi se spriječilo širenje klamidioze/psitakoze, neophodno je nabavljati ptice iz provjerenih izvora, pratiti znakove bolesti u papiga i ljudi, te se strogo pridržavati biosigurnosnih mjera kako bi se spriječilo daljnje širenje bolesti.

Ključne riječi: *C. psittaci*, klamidioza, psitakoza, genotip A



## 9. SUMMARY

### **Zoonotic potential of *C. psittaci* – a case report**

The causative agent of chlamydiosis/psittacosis, the bacterium *C. psittaci*, infects various species of birds and humans. Infected birds occasionally excrete the pathogen through the respiratory and digestive systems, so nasal and ocular discharge as well as feces are the main source of infection for other birds or humans. Humans are most often infected through close contact with positive parrots, but more and more often through infected poultry (turkeys, chickens, ducks). In this case report of avian chlamydiosis/psittacosis in parrots and child, organ and pooled fecal samples were collected from a dead cockatiel and two budgerigar, and from a child (serum and nasal swab) living in the same household as positive birds. Of all the samples examined, except the child serum, *C. psittaci* was isolated by real-time PCR. Sequencing of the *ompA* gene demonstrated great similarity of *C. psittaci* isolates from parrots and children, and all samples were identified as genotype A, confirming that parrots were a source of disease for the child. In order to prevent the spread of avian chlamydiosis/psittacosis, it is necessary to procure birds from verified sources, monitor the signs of disease in parrots and humans, and strictly adhere to biosecurity measures to prevent further spread of the disease.

Key words: *C. psittaci*, avian chlamydiosis, psittacosis, genotype A

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. lipnja 1994. godine u Karlovcu. Osnovnu školu pohađala sam u Karlovcu, nakon završetka osnovne škole, 2009. godine upisala sam srednju školu Gimnazija Karlovac, smjer opća gimnazija. Usporedno sam još pohađala Glazbenu školu Karlovac. Maturirala sam 2013. godine, iste godine sam upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija bila sam član studentske udruge IVSA, volontirala sam na Klinici za unutarnje bolesti, a stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici grada Zagreba, ambulanta Špansko.