



federale overheidsdienst

**VOLKSGEZONDHEID,  
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN  
EN LEEFMILIEU**

## *Chlamydophila psittaci* infecties in kalkoenen:

zoönose en optimalisatie van de productieparameters  
op kalkoenbedrijven door toediening van een  
natuurlijk anti-microbieel eiwit

D. S. A. Beeckman, C. Van Droogenbroeck, T. Wauman, L. Dossche,  
K. Verminnen, V. Dickx, K. Schautteet, D. Vanrompay

Universiteit Gent

2010







federale overheidsdienst

**VOLKSGEZONDHEID,  
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN  
EN LEEFMILIEU**

## *Chlamydophila psittaci* infecties in kalkoenen:

zoönose en optimalisatie van de productieparameters  
op kalkoenbedrijven door toediening van een  
natuurlijk anti-microbieel eiwit

D. S. A. Beeckman, C. Van Droogenbroeck, T. Wauman, L. Dossche,  
K. Verminnen, V. Dickx, K. Schautteet, D. Vanrompay

Universiteit Gent

2010



Universiteit Gent  
Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen  
Vakgroep Moleculaire Biotechnologie  
Laboratorium voor Immunologie en Biotechnologie van de Dierlijke Cel  
Prof. dr. Daisy Vanrompay  
Coupure Links 653  
B 9000 Gent

Deze publicatie is een synthese van het project RT/05/08/Minspec-7 over de periode 01-02-2006 tot 31-01-2010 en werd opgesteld in opdracht van:

FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu  
Dienst Contractueel Onderzoek  
Zelfbestuursstraat 4  
1070 Brussel

ISBN nummer:

Overname van gegevens van deze publicatie voor persoonlijk gebruik is toegestaan mits duidelijke bronvermelding. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht en hiervoor is de schriftelijke toestemming van de auteurs vereist.

## Woord vooraf



# Inhoudstafel

<b>Inhoudstafel .....</b>	<b>I</b>
<b>Objectieven van het onderzoek .....</b>	<b>1</b>
<b><u>HOOFDSTUK 1: INLEIDING .....</u></b>	<b><u>3</u></b>
1. <i>CHLAMYDIACEAE</i> .....	5
1.1. Situering .....	5
1.2. Taxonomie .....	5
1.3. Morfologie .....	6
1.4. Chlamydiale levenscyclus .....	7
1.5. Het chlamydiale Type III secretiesysteem .....	9
2. HET MULTIFACTORIEEL RESPIRATOIR COMPLEX IN DE PLUIMVEE-INDUSTRIE .....	12
2.1. Inleiding .....	12
2.2. <i>Chlamydophila psittaci</i> .....	12
2.3. <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> .....	15
2.4. Aviair metapneumovirus .....	16
2.5. Interactie tussen <i>Cp. psittaci</i> , ORT en aMPV .....	17
3. LACTOFERRINE INTERFEREERT MET TYPE III SECRETIE IN GRAM-NEGATIEVE BACTERIËN .....	20
<b><u>HOOFDSTUK 2: ZOËNOTISCHE TRANSMISSIE VAN CHLAMYDOPHILA PSITTACI.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
1. INLEIDING .....	23
2. MATERIAAL EN METHODEN .....	23
2.1. Gevalsbeschrijving en staalname .....	23
2.2. <i>Cp. psittaci</i> detectie en karakterisatie .....	24
3. RESULTATEN .....	24
4. DISCUSSIE .....	25
5. CONCLUSIE .....	27
<b><u>HOOFDSTUK 3: PROFYLAXIS TEGEN CHLAMYDOPHILA PSITTACI DOOR MIDDEL VAN EEN</u></b>	
<b><u>NATUURLIJK ANTI-MICROBIEEL EIWIT .....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b><u>A. Anti <i>Cp. psittaci</i> effect van transferrines – in vitro studie .....</u></b>	<b><u>31</u></b>
1. INLEIDING .....	31
2. MATERIAAL EN METHODEN .....	32
2.1. Organisme en celcultuur .....	32
2.2. Transferrines .....	32
2.3. <i>In vitro</i> toxiciteit van transferrines voor gastheercellen .....	32
2.4. Effect van transferrines op extracellulaire <i>Cp. psittaci</i> .....	33
2.5. Effect van transferrines op chlamydiale aanhechting en intrede .....	33

2.6. Effect van transferrines op de intracellulaire vermeerdering .....	34
2.7. Immunofluorescentiekleuring .....	34
3. RESULTATEN .....	35
3.1. Toxiciteit van transferrines voor <i>in vitro</i> gastheercellen.....	35
3.2. Effect van transferrines op extracellulaire <i>Cp. psittaci</i> .....	35
3.3. Effect van transferrines op chlamydiale aanhechting en intrede.....	35
3.4. Effect van transferrines op de intracellulaire vermeerdering .....	36
4. DISCUSSIE .....	36
5. CONCLUSIE .....	38
<b><u>B. Anti <i>Cp. psittaci</i> effect van transferrines – <i>in vivo</i> studie .....</u></b>	<b>39</b>
1. INLEIDING.....	39
2. MATERIAAL EN METHODEN.....	39
2.1. Organisme en celcultuur .....	39
2.2. Ovotransferrine .....	39
2.3. Proefopzet .....	39
2.4. Klinische symptomen en macroscopische letsels .....	40
2.5. <i>Cp. psittaci</i> replicatie en excretie .....	41
2.6. Statistische analyse .....	41
3. RESULTATEN .....	41
3.1. Klinische symptomen.....	41
3.2. Macroscopische letsels.....	42
3.3. <i>Cp. psittaci</i> replicatie en excretie .....	43
4. DISCUSSIE .....	44
5. CONCLUSIE .....	45
<b><u>C. Anti <i>Cp. psittaci</i> effect van transferrines – evaluatie op een kalkoenbedrijf.....</u></b>	<b>46</b>
1. INLEIDING.....	46
2. MATERIAAL EN METHODEN.....	46
2.1. Bedrijfsmanagement .....	46
2.2. Experimentele opzet van beide klinische studies .....	47
2.3. Stalen .....	49
2.4. <i>Cp. psittaci</i> isolatie en moleculaire karakterisatie.....	51
2.5. Antistofrespons .....	51
2.6. ORT en aMPV detectie met PCR .....	51
3. RESULTATEN .....	52
3.1. Eerste klinische studie.....	52
3.1.1. Verloop van de kweekronde .....	52



---

3.1.2. <i>Chlamydophila psittaci</i> .....	53
3.1.3. aMPV en ORT .....	54
3.2. Tweede klinische studie .....	56
3.2.1. Verloop van de kweekronde .....	56
3.2.2. <i>Chlamydophila psittaci</i> .....	56
3.2.3. aMPV en ORT .....	57
4. DISCUSSIE .....	59
5. CONCLUSIE .....	62
<b><u>HOOFDSTUK 4: ALGEMENE DISCUSSIE EN BESLUIT.....</u></b>	<b>63</b>
<b><u>SAMENVATTING.....</u></b>	<b>71</b>
<b><u>RESUME .....</u></b>	<b>77</b>
<b><u>SUMMARY .....</u></b>	<b>83</b>
<b>References .....</b>	<b>89</b>
<b>Publicaties.....</b>	<b>101</b>
<b>Presentaties.....</b>	<b>104</b>



## Objectieven van het onderzoek

Chlamydirose is een belangrijke ademhalingsinfectie bij kalkoenen die veroorzaakt wordt door de obligaat intracellulaire bacterie *Chlamydophila (Cp.) psittaci*. Na inhalatie van gecontamineerde aerosolen treedt er een infectie op van de bovenste ademhalingswegen wat uiteindelijk leidt tot een systemische infectie.

De hoge prevalentie van *Cp. psittaci* infecties in Belgische kalkoenbedrijven (Vanrompay *et al.*, 1995a; 1997b) heeft belangrijke economische verliezen tot gevolg. Het is noodzakelijk om maatregelen te ontwikkelen ter preventie van *Cp. psittaci* infecties om 1) de economische verliezen te reduceren, 2) het risico op besmetting van dierenartsen, werknemers op de bedrijven en slachthuispersoneel te voorkomen, 3) het toenemende risico op het ontstaan van antibioticumresistente zoönotische stammen te verminderen en om 4) de aanwezigheid van antibiotica in kalkoenvlees te voorkomen.

Het onderzoek streeft naar een innovatieve bestrijding van ademhalingsinfecties bij kalkoenen door gebruik van een natuurlijk antimicrobieel eiwit met name lactoferrine of ovotransferrine.



## Hoofdstuk 1: Inleiding



## 1. *CHLAMYDIACEAE*

### 1.1. Situering

Micro-organismen die behoren tot de familie van de *Chlamydiaceae* zijn obligaat intracellulaire Gram-negatieve pathogenen van zoogdieren en vogels. De verschillende species in deze familie infecteren zeer diverse gastheren, met verschillende weefselvoorkeuren, en veroorzaken een brede waaier aan acute en chronische ziekten.

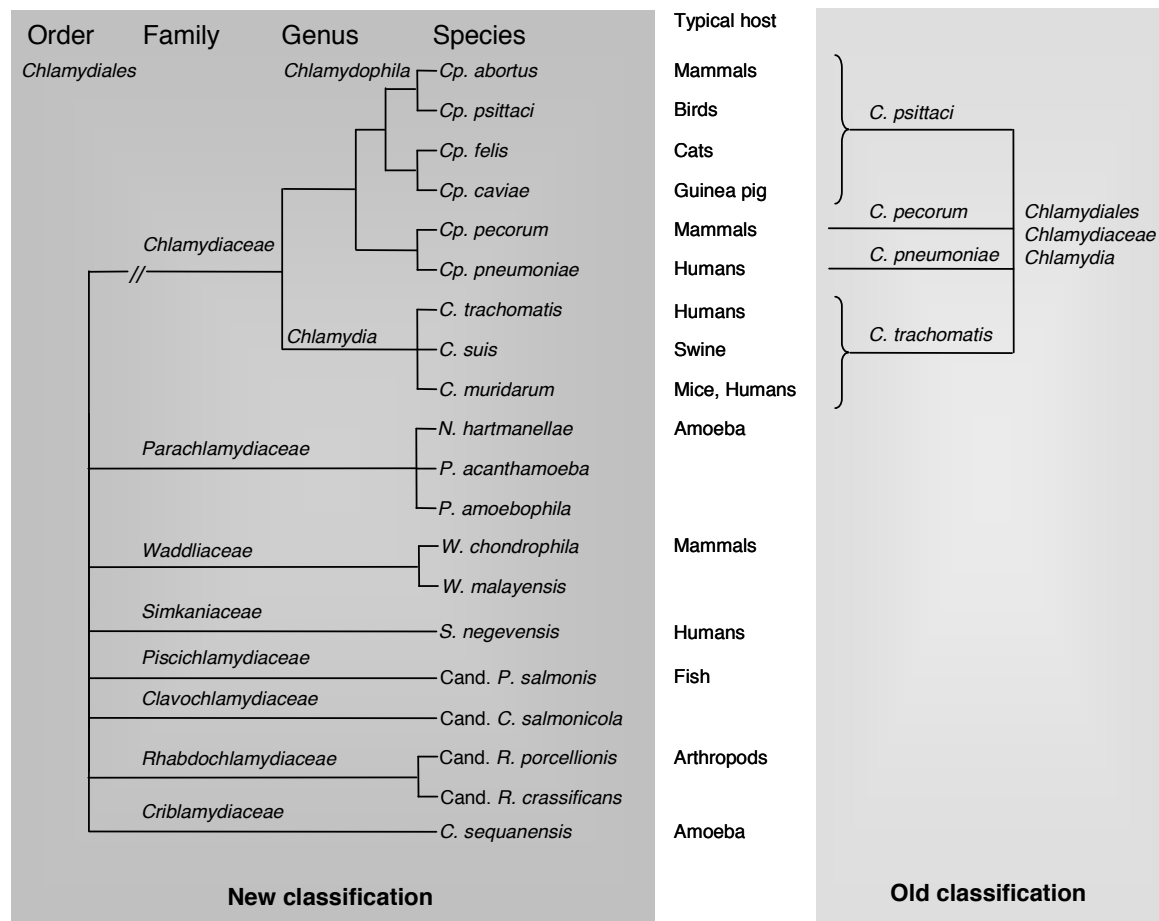
De belangrijkste humane pathogenen zijn *Chlamydia (C.) trachomatis* en *Chlamydophila (Cp.) pneumoniae*. In de Westerse wereld is *C. trachomatis* de oorzaak van de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoening (SOA) en kan bij vrouwen leiden tot ontsteking van het genitaalstelsel, onvruchtbaarheid en mogelijk buitenbaarmoederlijke zwangerschap. Bepaalde varianten van *C. trachomatis* zijn verantwoordelijk voor trachoma, de belangrijkste oorzaak van infectieuze blindheid in ontwikkelingslanden. Wereldwijd zijn zo'n 8 miljoen mensen permanent blind als gevolg van trachoma. *Cp. pneumoniae* is dan weer verantwoordelijk voor naar schatting 10% van de longontstekingen en 5% van de bronchitis en sinusitis gevallen bij volwassenen. Uit onderzoek blijkt bovendien dat een chronische infectie met deze pathogeen zou kunnen leiden tot hart- en vaatziekten (Campbell & Kuo, 2004; Belland *et al.*, 2004).

Infecties met *Chlamydiaceae* bij huis- en landbouwdieren en in het wild levende dieren kunnen leiden tot onvruchtbaarheid, abortus, rhinitis, conjunctivitis, arthritis, enteritis, encefalomyelitis en pneumonie of andere ademhalingsproblemen (Everett, 2000). *Cp. psittaci* is een primair pathogeen voor pluimvee en kan een grote nadelige economische impact hebben op voornamelijk de kalkoenen- en eendensector. Omdat *Cp. psittaci* een zoönose is lopen werknemers van pluimveebedrijven en slachthuizen, bedrijfsdierenartsen en dierenartsenkeurders alsook vogelliefhebbers gevaar om besmet te worden (Andersen & Vanrompay, 2000).

### 1.2. Taxonomie

Oorspronkelijk omvatte het genus *Chlamydia* (orde *Chlamydiales*, familie *Chlamydiaceae*) slechts twee species: *C. trachomatis* (Capponi & Haider, 1969) en *C. psittaci* (Tamura *et al.*, 1971), later aangevuld met *C. pneumoniae* (Grayston *et al.*, 1989) en *C. pecorum* (Fukushi & Hirai, 1992). Deze onderverdeling staat bekend als de oude taxonomie. Everett *et al.* stelden in 1999 een nieuwe classificatie voor na analyse van voornamelijk 16S en 23S rRNA genen, maar ook van fenotypische, morfologische en genetische informatie (DNA-DNA hybridisatie) (Everett & Andersen, 1997; Everett *et al.*, 1999). De orde van de *Chlamydiales* werd

uitgebreid met drie extra families van chlamydia-achtige bacteriën (*Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* en *Simkaniaceae*), terwijl de *Chlamydiaceae* zelf werden opgesplitst in twee genera, *Chlamydia* en *Chlamydophila*, die samen negen species omvatten. Alle organismen binnen de orde van de *Chlamydiales* zijn obligaat intracellulaire Gram-negatieve bacteriën, met een chlamydia-achtige levenscyclus, waarvan de 16S en 23S rRNA sequenties voor meer dan 80% identiek zijn (Everett *et al.*, 1999). In de voorbije 10 jaar werd de orde van de *Chlamydiales* verder uitgebreid met vier nieuwe families van *Chlamydia*-like bacteriën [overzicht in Figuur 1 en in Horn (2008)].



**Figuur 1** Huidige taxonomische classificatie van de *Chlamydiales* versus deze voorgesteld door Everett *et al.* (1999). Aangepast uit Bush & Everett (2001).

### 1.3. Morfologie

*Chlamydiaceae* hebben een unieke bifasische levenscyclus, waarbij ze enkel kunnen vermenigvuldigen in een eukaryote gastheercel. Tijdens de normale levenscyclus kunnen drie vormen onderscheiden worden, die van elkaar verschillen in morfologische en biologische eigenschappen. Het infectieuze **elementaire lichaampje** (EB, elementary body) is klein en



metabool inactief, terwijl het metabool actieve **reticulair lichaampje** (RB, reticulate body) niet in staat is een gastheercel te infecteren. De overgangsfase tussen beide wordt aangeduid met de term **intermediair lichaampje** (IB, intermediate body).

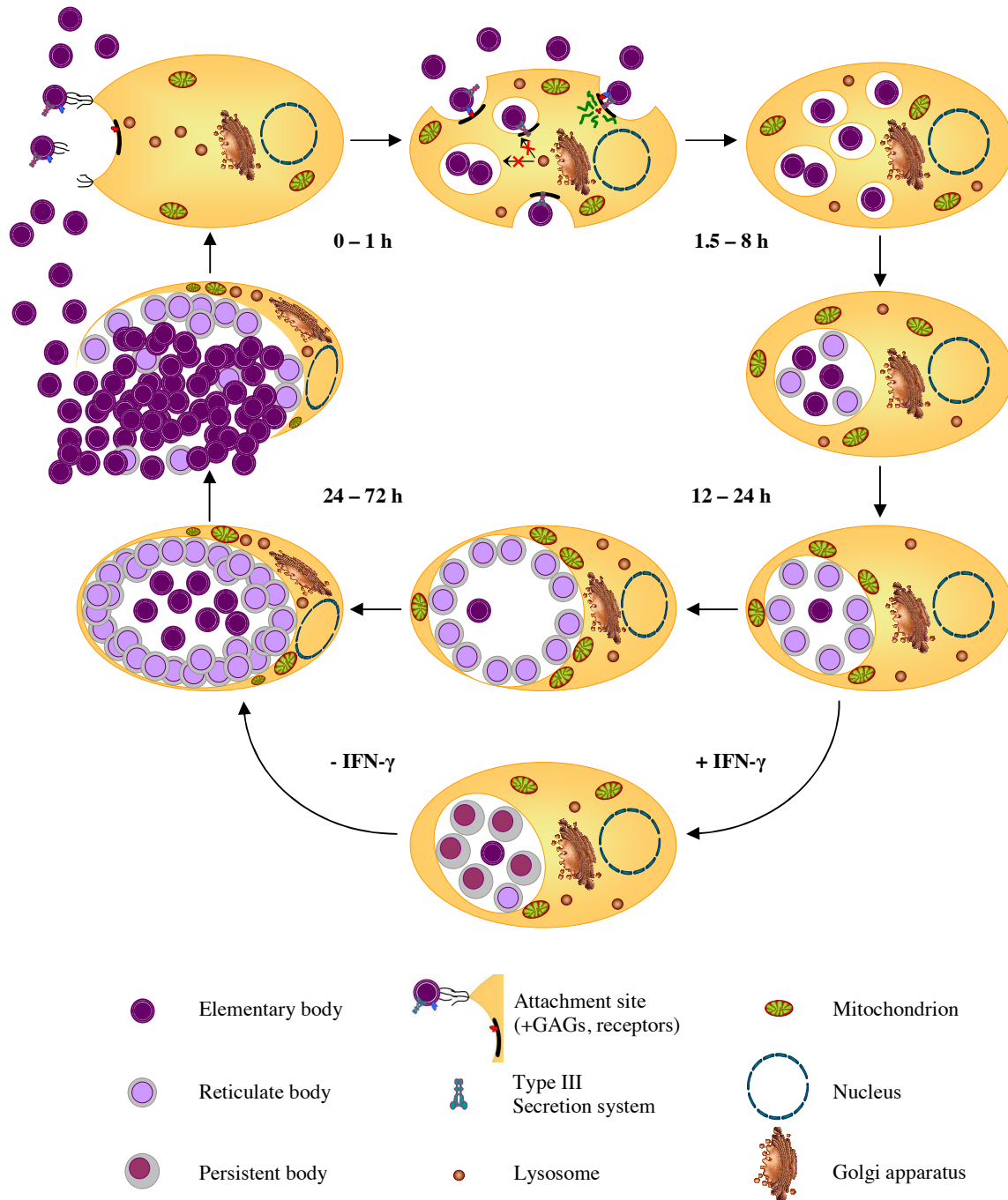
**Elementaire lichaampjes** (EB's) zijn kleine, ronde, elektronendense structuren met een diameter van 0.2 tot 0.3  $\mu\text{m}$ . De celwand is versterkt met een stevig netwerk van disulfidebruggen tussen MOMP en andere buitenste membraan eiwitten (Newhall & Jones, 1983). Dankzij hun versterkte celwand kunnen ze overleven buiten de gastheercel.

**Reticulair lichaampjes** (RB's, metabool actief) zijn groter (0.5-1.6  $\mu\text{m}$  diameter), minder elektronendens en zorgen voor de intracellulaire replicatie. Dit houdt in dat hun cytoplasma rijk is aan RNA en ribosomen, nodig voor de eiwitsynthese. Om het transport van nutriënten door de celwand te vergemakkelijken, grijpt een reductie van de disulfidebruggen plaats, resulterend in een minder stevige celwand (Newhall & Jones, 1983).

**Intermediaire lichaampjes** hebben een diameter van 0.3 tot 1.0  $\mu\text{m}$  en vormen een tussenstadium van EB's en RB's. Net zoals EB's zijn ze, althans *in vitro*, in staat om gastheercellen te infecteren (Vanrompay *et al.*, 1996).

#### 1.4. Chlamydiale levenscyclus

*Chlamydiales* onderscheiden zich duidelijk van andere eubacteria door hun unieke bifasische intracellulaire vermeerderingscyclus (Figuur 2). Een metabool inactief, infectieus elementair lichaampje wordt via endocytose opgenomen in een eukaryote cel (mucosale epitheelcel en/of macrofaag) en differentieert zich tot een metabool actief, binair delend reticulair lichaampje. De vermeerdering gebeurt in een intracytoplasmatische vacuole of inclusie. In de initiële fase van de vermeerderingscyclus worden tot dusver grotendeels onbekende bacteriële eiwitten aangemaakt. Deze eiwitten zonderen de inclusie af van de endosomale/lysosomale routes. Tijdens de vermeerderingscyclus neemt het volume van de inclusie toe tot zij een groot gedeelte van het cytosol van de gastheercel inneemt. Een deel van de lipiden noodzakelijk voor deze uitbouw van de inclusiemembraan is afkomstig van de gastheercel. Hiervoor worden de inclusies naar de peri-Golgi regio gebracht waar de inclusiemembraan kan versmelten met sfigomyeline-bevattende exocytotische vesikels. De sfigomyeline bevattende vesikels worden op hun weg van het Golgi apparaat naar de plasma membraan als het ware 'onderschept' en vervolgens ingebouwd in de inclusiemembraan. De verplaatsing van de bacteriële inclusies naar de peri-Golgi regio zou gebeuren onder invloed van bacteriële eiwitten.



**Figuur 2 Schematisch overzicht van de chlamydiale levenscyclus.** De bacteriën hechten preferentieel aan de basis van de microvilli en treden vervolgens de gastheercel binnen door middel van parasiet-specifieke endocytose. Binnenin de aldus gevormde inclusie, vormen elementaire lichaampjes (EB's) zich om tot reticulair lichaampjes (RB's) waarbij fusie met gastheercellysosomen wordt vermeden. De RB's vermeerderen zich aan de periferie van de inclusie door binaire fissie. Wanneer ze loskomen van de inclusiemembraan, vormen ze zich terug om tot EB's. Deze migreren naar het lumen van de inclusie en worden vrijgesteld door lyse of reverse endocytose (Beeckman, 2009).

De initiële bacteriële eiwitten zorgen er tevens voor dat de inclusies in de buurt komen te liggen van mitochondria alwaar zij via een ATP-translocase de bacterie kunnen voorzien van de nodige energie. In een *C. trachomatis* geïnfecteerde cel gaan de bacteriële inclusies zich begeven naar de perinucleaire regio, waar het Golgi-apparaat en de meeste mitochondria aanwezig zijn. In een *Cp. psittaci* geïnfecteerde cel daarentegen gaan de mitochondria als het ware ‘aangetrokken’ worden door de bacteriële inclusie die vooral in de beginfase van de cyclus in de perinucleaire regio te vinden is. Later worden de inclusies meer in het perifere cytoplasma van de gastheercel aangetroffen. De mitochondria leggen zich tegen de inclusiemembraan en gaan een ring vormen rond de inclusie (Matsumoto *et al.*, 1991; Vanrompay *et al.*, 1996; Escalante-Ochoa *et al.*, 1999). Na ongeveer 20 uur beginnen de delende reticulair lichaampjes zich om te vormen tot nieuwe elementaire lichaampjes. Uiteindelijk zullen de inclusies van *C. trachomatis* toch fusioneren met lysosomen, waarna de cellen gelyseerd worden en de bacteriën in het extracellulair milieu terecht komen. Inclusies van bepaalde *C. trachomatis* serovars fusioneren niet met lysosomen, maar fusioneren met de plasmamembraan en zullen op deze manier hun ‘nakomelingen’ vrijstellen in het extracellulair milieu (reverse endocytose) (Hybiske & Stephens, 2007). Het is nog onduidelijk hoe de nieuw gevormde *Cp. psittaci* organismen vrijgesteld worden in het extracellulair milieu. Cellyse evenals versmelting met de plasmamembraan werden *in vitro* waargenomen (Vanrompay *et al.*, 1996).

De moleculaire mechanismen die aan de basis liggen van 1) de opname van de bacterie in de gastheercel, 2) de fusie-eigenschappen van de inclusie en 3) de regulatie van de verplaatsing van de inclusie naar gebieden die ‘interessant’ zijn voor de bacterie, zijn onvoldoende of niet gekend. Eén van de belangrijkste redenen hiervoor is dat het genoom (met uitzondering van *Cp. psittaci* en *C. suis*, waarvan de genoomsequentie nog steeds niet gekend is) nog maar enkele jaren geleden in kaart gebracht werd en dat we nog steeds niet bij machte zijn deze bacteriën te transformeren. Mogelijks speelt het Type III secretiesysteem van de *Chlamydiales* een rol in de hierboven vermelde dynamische cellulaire veranderingen.

### 1.5. Het chlamydiale Type III secretiesysteem

Een groot aantal Gram-negatieve bacteriën gebruiken Type III secretiesystemen (T3SS'n) om gespecialiseerde eiwitten te transloceren naar het cytoplasma van een eukaryote gastheercel of het lumen van een intracellulair organel. Het gaat hierbij om pathogenen zoals o.a. *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Bordetella* en *Pseudomonas* [overzicht in Beeckman & Vanrompay (2010a)].

De eerste aanwijzing voor het bestaan van een chlamydiaal T3SS werd door Hsia *et al.* (1997) geleverd met de ontdekking van de genen coderend voor de structurele componenten SctU, SctV, SctW en het chaperone Scc1. Vervolgens stelden Bavoil & Hsia (1998) dat de in de jaren '80 door Matsumoto geobserveerde projecties op het oppervlak van *Cp. psittaci* (Matsumoto, 1973; Matsumoto *et al.*, 1976; 1982) mogelijk een T3SS voorstelden. Tijdens de daaropvolgende genomanalyse van *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *Cp. pneumoniae* en *Cp. caviae* werden genen gevonden die een grote homologie vertoonden met deze coderend voor het T3SS in andere Gram-negatieve bacteriën [overzicht in Peters *et al.* (2007)]. Vervolgens werd door middel van Reverse Transcriptase PCR op *Cp. pneumoniae* (Subtil *et al.*, 2001; Lugert *et al.*, 2004), *C. trachomatis* (Fields *et al.*, 2003) en *Cp. psittaci* T3SS genen (Beeckman *et al.*, 2008; Beeckman & Vanrompay, 2010b) en met behulp van heterologe expressie van chlamydiale T3S effector eiwitten (Subtil *et al.*, 2001) de aanwezigheid van een functioneel T3SS aangetoond. Gelijktijdig kon door middel van genomanalyse aangetoond worden dat alle *Chlamydiaceae* en een aantal *Chlamydia*-like bacteriën een complete set van T3SS coderende genen bevatten [overzicht in (Beeckman & Vanrompay, 2010a)].

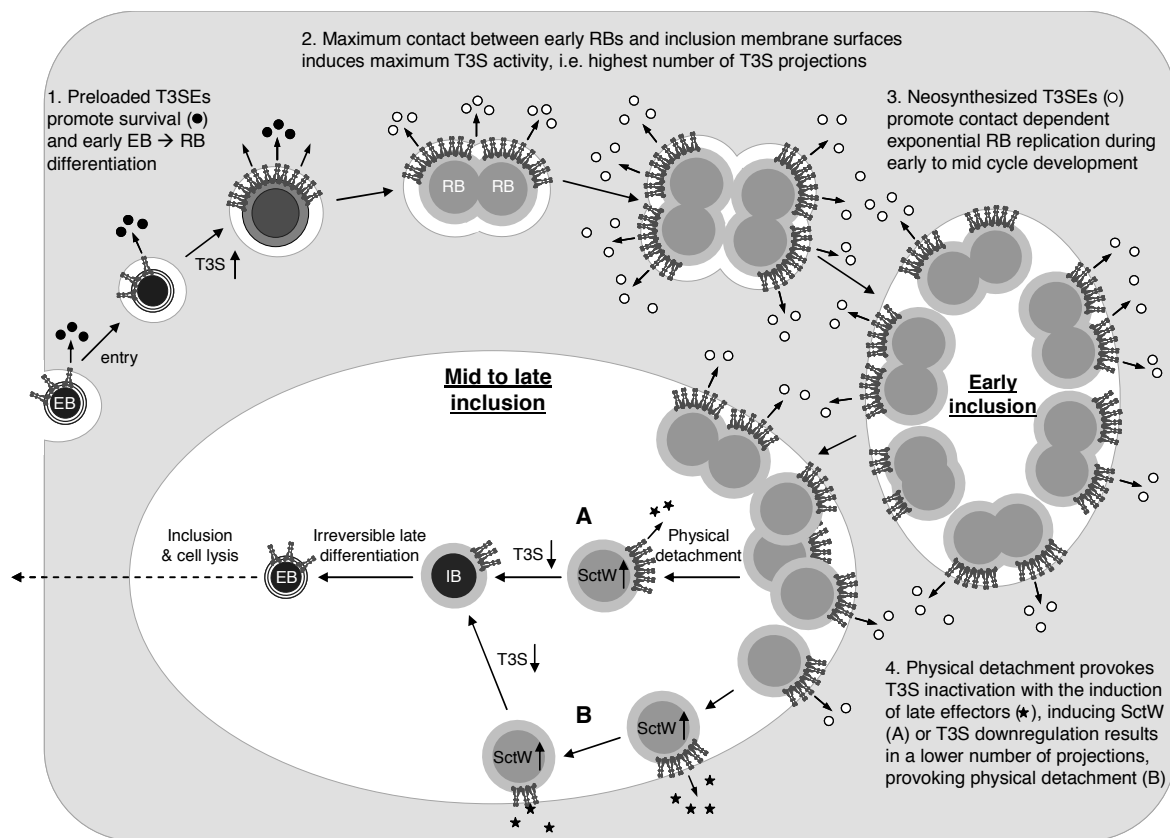
Het T3SS speelt een essentiële rol tijdens alle fasen van de chlamydiale levenscyclus. Zo is het T3SS essentieel voor de opname van *Chlamydiales* in de gastheercel. De initiële binding aan de gastheercel wordt bewerkstelligd door elektrostatische interacties met heparaan sulfaat groepen op de celmembraan van de gastheercel gevolgd door een irreversibele binding aan een tot dusver onbekende tweede receptor. Deze tweede binding zorgt voor de mobilisatie van actine en de vorming van een actinevoetstuk onder de vastgehechte bacterie, die daarna in de cel wordt opgenomen. Het T3SS van *Chlamydiales* transloceert hiervoor het eiwit Tarp ('Translocated Actin-Recruiting Protein') dat actinefilamenten aantrekt en polymeriseert ter hoogte van de vasthechtingsplaats (Clifton *et al.*, 2004; Engel, 2004).

Zowel in professionele als niet-professionele fagocyten ontstaat een fusie van fagosomen, die de pathogeen bevatten, met lysosomen. De hieruit resulterende fagolysosomen produceren lysosomale zure hydrolasen om de ziekteverwekkers uit te schakelen. *Chlamydiaceae* hebben echter een mechanisme ontwikkeld waardoor ze de fagolysosomale fusie verhinderen. De inclusie verzuurt niet en dit wordt hoogstwaarschijnlijk aangevuld met een actieve modificatie van de inclusiemembraan (Scidmore *et al.*, 2003). T3SS effector eiwitten die hierin betrokken zijn zijn de inclusiemembraaneiwitten of Inc's (Hackstadt *et al.*, 1997; Wyrick, 2000).

Eens gevormd migreren de inclusies naar de microtubuli organizing centre – Golgi region waar ze fuseren met sfigomyeline- en lipide- bevattende blaasjes van de gastheercel. Op deze manier onderscheppen *Chlamydiaceae* nutriënten en andere essentiële moleculen in de

normale eukaryote transportpathways, waardoor de samenstelling van de inclusiemembraan zeer gelijkaardig wordt aan deze van de gastheercelmembranen (Hatch & McClarty, 1998). Hoogstwaarschijnlijk is het inclusiemembraaneiwit IncA hierbij betrokken (Delevoeye *et al.*, 2008).

Reticulaire lichaampjes vermeerderen steeds terwijl ze in contact zijn met de inclusiemembraan. Er zijn aanwijzingen dat dit contact gemedieerd wordt door het T3SS. Het loskomen van de RB's van de inclusiemembraan en de daarmee gekoppelde T3SS inactivatie is het signaal voor redifferentiatie naar EB's, ook gekend als de 'contact-dependent development hypothesis' (Hackstadt *et al.*, 1997; Bavoil & Hsia, 1998; Bavoil *et al.*, 2000). Dit wordt ondersteund door verschillende modellen die het aantal T3SS'n per bacterie linken met de verschillende fasen van de chlamydiale levenscyclus (Wilson *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007; Hoare *et al.*, 2008). Een schematisch overzicht hiervan wordt weergegeven in Figuur 3.



**Figuur 3** Schematisch overzicht van de 'contact-dependent chlamydial development hypothesis'. Voorgevormde T3SS effectoreiwitten van EB's mediëren intrede en vroege overleving in de gastheercel, terwijl nieuw gesynthetiseerde effectoreiwitten belangrijk zijn bij de vermeerdering van de bacterie. Figuur aangepast uit Wilson *et al.* (2006).

## 2. HET MULTIFACTORIEEL RESPIRATOIR COMPLEX IN DE PLUIMVEE-INDUSTRIE

### 2.1. Inleiding

Reeds decennia lang kampt de Europese kalkoenindustrie met ademhalingsinfecties, resulterend in grote economische verliezen. Op vele bedrijven komen meerdere infectiegolven voor, waarbij meerdere pathogenen kunnen aangetoond worden. Het gaat hierbij om influenza virus type A subtypes H6 en H9, aviaire paramyxovirus 1, 2 en 3 (PMV-1, PMV-2, PMV-3), aviaire metapneumovirus (aMPV), aviaire *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *Mycoplasma* species en *Cp. psittaci* (Macpherson *et al.*, 1983; Redmann *et al.*, 1991; Stipkovits & Kempf, 1996; Vanrompay *et al.*, 1997b; Van de Zande *et al.*, 1998; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Een gelijktijdige infectie met verschillende van deze pathogenen leidt vaak tot een verergering van de ademhalingsproblemen. Dit werd eerder al aangetoond voor aMPV en *E. coli* (Van de Zande *et al.*, 2001) of *Mycoplasma gallisepticum* en aMPV (Naylor *et al.*, 1992; Ganapathy *et al.*, 1998).

### 2.2. *Chlamydophila psittaci*

Vogels worden geïnfecteerd door inhalatie van *Cp. psittaci* gecontamineerde aerosols. Na kieminhalatie vindt er een primaire kiemvermeerdering plaats in de epitheelcellen van de bovenste delen van het ademhalingsstelsel. Vervolgens breidt de infectie zich uit naar de dieper gelegen delen van het ademhalingsstelsel waar de kiemen intracellulair vermeerderen in epitheelcellen en macrofagen. Tijdens deze intense vermeerdering in het ademhalingsstelsel verschijnen ook de eerste kiemen in het plasma en in bloedmonocyten wijzend op een verspreiding via septicemie. Vervolgens kan kiemvermeerdering worden waargenomen in epitheelcellen en macrofagen van diverse organen van het lichaam, waarbij een intermitterende fecale excretie optreedt (Vanrompay *et al.*, 1995b).

Transmissie kan gebeuren als een geïnfecteerde vogel zich in de onmiddellijke nabijheid van een gevoelige vogel bevindt. *Cp. psittaci* wordt geëxcreteerd in de feces en in nasale substanties. De belangrijkste bron van transmissie is de inhalatie van aerosolen van fecaal materiaal of verenstof gecontamineerd met *Cp. psittaci*. Verder kan de transmissie ook door een orale opname van gecontamineerd materiaal, maar deze infectieweg is minder belangrijk. Ook verticale transmissie komt voor via de eieren, hoewel de meeste geïnfecteerde eieren niet uitkomen. Verticale transmissie werd reeds aangetoond bij kippen, eenden, parkieten, zeemeeuwen en sneeuwganzen. Hoewel men aanneemt dat *Cp. psittaci* minder vaak doorbreekt bij wilde vogels, is het mogelijk dat wilde vogels een natuurlijk reservoir vormen

voor de bacterie en zo gedomesticeerde vogels kunnen infecteren. Ook wilde knaagdieren en bloedzuigende insecten worden als mogelijk infectiereservoir aangeduid [overzicht in Andersen & Vanrompay (2003)].

De incubatieperiode is afhankelijk van verschillende factoren: de virulentie van de *Cp. psittaci* stam voor de gastheer, het aantal organismen dat zich in de gastheer bevindt en de leeftijd van de vogels (hoe jonger, hoe gevoeliger). De incubatieperiode kan variëren van drie dagen tot verschillende weken, maanden of zelfs jaren. In het vroege stadium van infectie komen vooral ademhalings symptomen voor zoals dyspnee (ademnood), coryza (neusverkoudheid) en sinusitis, unilaterale conjunctivitis, diarree en polyurie. In de acute fase van de infectie is er dan ook nog een verminderde lichaamstemperatuur mogelijk, lethargie, verlies van de eetlust, gewichtsverlies, dehydratie en een verminderde eileg. Bij een infectie met een zeer virulente stam, kan de morbiditeit 50 tot 80% bedragen en de mortaliteit 10 tot 30%. In de chronische fase van infectie kunnen er centrale zenuwstoornissen voorkomen of conjunctivitis. Post mortem vindt men veelal conjunctivitis, rhinitis, een sereuze tot fibrineus adhesieve luchtzakontsteking en/of pericarditis, pneumonie en hepatosplenomegalie [overzicht in Andersen & Vanrompay (2003)].

De economische impact is moeilijk in te schatten aangezien deze bacterie moeilijk te detecteren is en niet ingesloten wordt in de routinediagnostiek. Toch is *Cp. psittaci* endemisch bij kalkoenen. Bovendien is de primaire pathogeniciteit in het verleden reeds duidelijk bewezen bij zowel kippen als kalkoenen (Bevan & Bracewell, 1986; Bracewell & Bevan, 1986; Takahashi *et al.*, 1988; Arzey & Arzey, 1990; Suwa *et al.*, 1990; Vanrompay *et al.*, 1993b) en hebben wij kunnen aantonen dat deze bacterie een belangrijke, zometer cruciale rol speelt in het multifactorieel respiratoir complex bij kalkoenen (Van Loock *et al.*, 2005a). De economische verliezen zijn te wijten aan mortaliteit, hoge onkosten voor de behandeling van de infectie, afkeuring aan de slachtlijn, daling in eileg en lagere eindgewichten.

*Chlamydochila psittaci* kan ook worden overgedragen naar de mens waar het humane psittacose veroorzaakt. Meestal gaat het om los van elkaar staande infecties waarvoor in ongeveer 75% van de gevallen een contact met vogels kan worden aangetoond. In de Verenigde Staten worden sedert 1990 jaarlijks tussen de 100 en 150 gevallen gerapporteerd (Gregory & Schaffner, 1997). In België gaat het om een vijf- tot tiental meldingen per jaar (<http://www.iph.fgov.be>), maar de infectie wordt vermoedelijk ondergediagnosticeerd. De transmissie verloopt klassiek via inhalatie van besmette aerosolen afkomstig van een ziek dier of van een asymptomatische drager. De aerosol kan bestaan uit sputum (speeksel), feces, nasale of conjunctivale excreties of uit stofdeeltjes van gecontamineerde veren of vervuild

zand. Uitzonderlijk kan ook direct contact (bek-mond) of manipulatie van de vogels aan de basis liggen van de infectie. Ook het schoonmaken van de kooien of verblijven, of zelfs slapen in dezelfde ruimte als waar een vogelkooi opgesteld is, zijn risicoactiviteiten (Holst, 1987). Secundaire verspreiding van de ziekte tussen mensen is reeds beschreven (Hughes *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2002), maar blijkt geen significant probleem te zijn (Andersen & Vanrompay, 2000). De ziekte kan bij de mens variëren van een licht grieperige aandoening tot een ernstige atypische pneumonie en mogelijk encefalitis. De incubatieperiode kan variëren van 7 tot 15 dagen met een gemiddelde van 10 dagen, maar ook periodes van één maand zijn mogelijk (Beeckman & Vanrompay, 2009). De klachten kunnen plots beginnen met rilkooitsen boven de 38 °C (tot 40.5 °C) en een vrij onvoorspelbaar verloop hebben. Geïnfecteerde personen vertonen typische symptomen zoals moeheid, koorts, rillingen, hoofdpijn, algemene malaise, anorexie, myalgie of spierpijn (rug en nek), artralgie (gewrichtspijn), ademhalingsproblemen en een niet-productieve hoest. Verder kunnen neurologische symptomen zoals slaperigheid, verwardheid, stupor (bewustzijnsstoornis) of coma, maag-darmklachten (nausea of misselijkheid, braken en diarree) en keelpijn het beeld vervolledigen. *Cp. psittaci* kan ook andere organen dan het ademhalingsstelsel aantasten, leidend tot myocarditis (ontsteking van de hartspier), endocarditis (ontsteking van de binnenwand van het hart), icterus (geelzucht), adult respiratory distress syndrome (ARDS) en multi-orgaan falen. Bij zwangere vrouwen kon in het verleden atypische pneumonie, hepatitis, nierinsufficiëntie, sepsis, vroeggeboorte en foetale dood geobserveerd worden [overzicht in Beeckman & Vanrompay (2009)]. Patiënten worden voornamelijk met tetracyclines en macroliden (erythromycine) behandeld. Deze worden oraal of parenteraal toegediend, afhankelijk van de ernst van de ziekte. De symptomen verdwijnen gewoonlijk vanaf 48 uur na de start van de behandeling en de behandeling moet minstens 10 tot 14 dagen volgehouden worden (Senn *et al.*, 2005; NASPHV, 2008). Chlamydiale infecties zijn goed behandelbaar met antibiotica en het verwerven van antibiotica-resistentiegenen is beperkt door hun obligaat intracellulaire levenswijze. Onderzoek bij de nauw verwante *C. suis* toonde echter aan dat stabiele tetracycline-resistentie kan verworven worden door middel van horizontale getransfer (Dugan *et al.*, 2004; 2007). Daarnaast kan antibioticumresistentie ook ontstaan door het optreden van puntmutaties die de expressie of functionaliteit van de targetmolecule veranderen (Roshick *et al.*, 2000; Dreses-Werringloer *et al.*, 2003). Gezien het feit dat antibiotica, en dan vooral tetracyclines, frequent toegepast worden in de pluimvee- en hobbyvogelindustrie, is het niet ondenkbeeldig dat ook bij *Cp. psittaci* tetracyclineresistentie optreedt.



### 2.3. *Ornithobacterium rhinotracheale*

Een ORT infectie wordt gekarakteriseerd door relatief milde respiratoire symptomen bij jonge vogels, doch bij kalkoenen kan de infectie ook op latere leeftijd voorkomen. De symptomen starten met niezen en gaan gepaard met een geleidelijke toename van de mortaliteit en een geleidelijke negatieve beïnvloeding van de productieparameters. Bij een lijkschouwing wordt schuimig, wit, yoghurt-achtig exudaat gevonden in de luchtzakken, meestal gepaard gaande met unilaterale pneumonie. Regelmatig worden ook pericarditis, hepatitis (met witte vlekken) en zwelling van de milt waargenomen. De symptomen kunnen binnen één week verdwijnen, doch kunnen ook verergeren door bijkomende infecties, waardoor de onderliggende ORT infectie vaak niet meer herkend wordt. ORT kan ook plotse sterfte veroorzaken bij jonge dieren door infectie van de hersenen en de schedel. Deze infectievorm kan voorkomen zonder of met de hierboven vermelde ademhalingsymptomen. In andere gevallen ontstaat paralyse door arthritis, osteïtis en osteomyelitis met de aanwezigheid van purulent, slijmerig exudaat in de gewrichten van de verlamde vogels. Bij kalkoenen-reproductiedieren veroorzaakt ORT een lichte toename van de mortaliteit en een daling van de eileg en de eikwaliteit. Deze infecties worden echter vaak niet herkend als zijnde een ORT infectie. In het verleden konden tijdens experimentele infecties bij SPF kippen en kalkoenen ademhalingsymptomen gereproduceerd worden, doch enkel na een voorafgaande virale infectie (aviar metapneumovirus, Newcastle Disease virus). Bovendien kon worden aangetoond dat bepaalde bacteriën, zoals *E. coli* en *Bordetella avium*, verantwoordelijk kunnen zijn voor een ORT doorbraak. Bepaalde ORT stammen zouden echter primair pathogeen zijn. In feite is het zo dat ORT, net als *Cp. psittaci*, deel uit maakt van het multifactorieel respiratoir complex. Diverse studies hebben aangetoond dat ORT, net als *Cp. psittaci*, verticaal kan overgedragen worden via de eieren en horizontaal via de lucht (Zaini *et al.*, 2008).

ORT infecties veroorzaken een verhoogde mortaliteit, verhoogde medicatiekosten (antibiotica), groeiachterstand en afkeuringen aan de slachtlijn. Doch de werkelijke economische impact van ORT infecties is, net als voor *Cp. psittaci* infecties, ongekend omdat de diagnose moeilijk is. Bij vleeskippen werden echter reeds afkeuringpercentages van 90% gemeld. Het voorkomen van een dergelijke erge infectie is onvoorspelbaar. Schijnbaar gezonde tomen kunnen plotseling één week later ernstig geïnfecteerd zijn. Anderzijds is het tevens mogelijk dat bij ernstig geïnfecteerde tomen, één of twee weken later nagenoeg geen post mortem lesies meer worden waargenomen. ORT kan ook plotse sterfte veroorzaken bij jonge dieren door aantasting van de hersenen en de schedel, met of zonder respiratoire

symptomen. Meestal blijft de mortaliteit dan beperkt, doch dit kan op enkele dagen tijd toenemen tot 20%. Bij oudere dieren is de economische impact groter. Bij 12 weken oude kalkoenen kan ernstige pneumonie ontstaan met 50% mortaliteit. Bij oudere kippen en kalkoenen komen ook vaak gewrichtontstekingen voor gevolgd door pootverlamming. Bij leghennen en reproductiedieren veroorzaakt ORT een lichte toename in mortaliteit en een daling van de eiproductie en eikwaliteit [overzicht in Van Veen (2000)].

#### **2.4. Aviair metapneumovirus**

Bij kalkoenen wordt de infectie gekarakteriseerd door niezen, tracheaal 'geruis', gezwollen infraorbitale sinussen en neusvloeit. De nasale uitscheiding is veelal sereus doch kan mucopurulent worden door secundaire bacteriële infecties. Kuchen en schudden met de kop worden vaak opgemerkt. De symptomen verschijnen zeer snel na de infectie en binnen de 24 uur verspreidt het virus zich in heel de stalruimte (Stuart, 1989). Indien er geen complicaties bijkomen, zullen de symptomen snel verdwijnen en zullen de vogels snel herstellen zodat er binnen de 14 dagen na de infectie geen klinische symptomen meer aanwezig zijn. Doch slecht management en/of secundaire infecties leiden vaak tot luchtzakontsteking, pneumonie, pericarditis of perihepatitis met een toename in morbiditeit en mortaliteit (Cook *et al.*, 1991).

De situatie bij kippen is minder duidelijk. Kippen worden geïnfecteerd door aMPV en kunnen een antistofrespons opbouwen, doch deze infectie is niet altijd geassocieerd met ziekte. AMPV werd reeds bij kippen van alle leeftijden geïsoleerd en wordt geassocieerd met het 'swollen head syndrome' (SHS) bij kippen, een multifactoriële aandoening gekarakteriseerd door zwelling van de kop en de infra-orbitale sinussen, vaak gevolgd door cerebrale desoriëntatie, torticollis en opisthotonus (Pattison *et al.*, 1989; Hafez & Lohren, 1990). De mortaliteit overschrijdt zelden 2%, doch de morbiditeit kan tot 10% bedragen. Bij de reproductiedieren daalt de eileg. SHS komt voor bij vleeskippen en reproductiedieren. Bij reproductiedieren is er een sterkere indicatie voor de primaire rol van aMPV in het SHS. Doch het SHS is een multifactoriële aandoening en infectieuze bronchitis (IB) en *E. coli* werden ook reeds geassocieerd met het SHS. Bij vleeskippen wordt aMPV eerder aanzien als één van de oorzakelijke agentia van multifactoriële respiratoire aandoeningen. Wat de situatie ook moge wezen, de vermenigvuldiging en weefseldistributie van aMPV is gelijkaardig voor kalkoenen en kippen. Net als bij kalkoenen kan het virus aangetoond worden in de neus en de sinussen, doch dit slechts gedurende een beperkte tijd van de infectie (Catelli *et al.*, 1998).

Een goed management en een goede 'biosecurity' zijn essentieel voor de preventie. In geval van een infectie worden antibiotica gegeven voor de behandeling van secundaire bacteriële

infecties. Vaccins zijn commercieel beschikbaar voor zowel kippen als kalkoenen (o.a. Poulvac<sup>®</sup>, Fort Dodge; Aviffa RTI<sup>®</sup>, Merial; Nobilis<sup>®</sup> RTV, Intervet). Legkippen worden in overleg met de dierenarts tijdens de tweede helft van de opfokperiode 1 of 2 maal gevaccineerd met een levend verzwakt aMPV vaccin. Hetzelfde geldt voor reproductiekippen die dan tijdens de tweede helft van de opfokperiode gevaccineerd worden. Vleeskalkoenen en reproductiekalkoenen worden op de eerste dag en 4 weken later gevaccineerd. Het entschema voor kalkoenen werd de laatste jaren aangepast naar aanleiding van de resultaten van een onderzoeksproject financieel gesteund door de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu (H. Nauwynck en S. van de Zande, Fac. Diergeneeskunde, Lab. Virologie, UGent). Referentienummer?

### 2.5. Interactie tussen *Cp. psittaci*, ORT en aMPV

In de herfst van 2001 werden 200 sera van kalkoenen gecollecteerd, afkomstig van 10 verschillende commerciële bedrijven in België en Noord-Frankrijk. Alle kalkoenen werden getest op de aanwezigheid van *Cp. psittaci*, aMPV, ORT, *M. gallisepticum* en *M. meleagridis* specifieke antistoffen. Alle kalkoenen werden gevaccineerd tegen Newcastle disease (NCD). Alle kalkoenenbedrijven die vaccineerden tegen aMPV gebruikten het Nobilis<sup>®</sup> RTV vaccin. In de winter van 2001-2002, werden tevens drie Belgische kalkoenenbedrijven opgevolgd voor de aanwezigheid van *Cp. psittaci*, aMPV en ORT. Alle drie de bedrijven bevonden zich West-Vlaanderen, nabij de Franse grens en hadden in het verleden reeds te kampen gehad met ademhalingsproblemen. Op alle bedrijven werden BUT/T9/Webster kalkoenen opgekweekt. Gedurende de eerste twee weken werden alle dieren in groepen van 20 gehouden, hanen en hennen gescheiden. Tussen twee verschillende rondes in werden de stallen gedurende twee weken gereinigd en gedesinfecteerd. Tijdens onze studie werden enkel de hennen opgevolgd en deze werden geslacht op een leeftijd van 15 weken op bedrijf B en op een leeftijd van 14 weken op bedrijven A en C. Alle kalkoenen waren gevaccineerd tegen NCD. Bedrijf A vaccineerde niet tegen aMPV, bedrijf B vaccineerde eenmalig tegen aMPV op een leeftijd van 19 dagen. De kalkoenen van bedrijf C werden op dag 10 en 24 gevaccineerd met het Nobilis<sup>®</sup> RTV vaccin.

De hoge seroprevalentie van *Cp. psittaci* (94%) bij Belgische kalkoenen bevestigde de resultaten van een voorgaande studie van Vanrompay *et al.* (1997b), waarbij tot 90% prevalentie werd vastgesteld. Gelijkaardige percentages (81-100%) werden ook door Ryll *et al.* (1994) waargenomen bij Duitse commerciële kalkoenen. Alle kalkoenen hadden hoge maternale antistoftiters op dag 1, die geleidelijk afnamen naar week 3-4 toe. Op alle bedrijven

waren twee *Cp. psittaci* infectiegolven aanwezig. Isolatie en *ompA* sequencing van *Cp. psittaci* uit de verschillende infectiegolven resulteerde in de identificatie van verschillende stammen. Op bedrijf A werd de initiële infectiegolf veroorzaakt door een genotype A stam, een genotype waartoe stammen behoren die zeer pathogeen zijn voor kalkoenen. Na primaire infectie werd een zeer trage daling van de antistoffentiter vastgesteld, mogelijks veroorzaakt door continue stimulatie van het immuunsysteem. Nog weken na de initiële infectie (week 12 van de opzet) kon een *Cp. psittaci* genotype B stam aangetoond worden. Op bedrijf B werden drie verschillende genotypes teruggevonden: A, B en F. Dit was slechts de tweede melding van de isolatie van een genotype F stam en de eerste keer dat de stam geïsoleerd wordt bij kalkoenen. Het eerste isolaat werd gevonden bij een Amerikaanse parkiet (Andersen, 1997). Op bedrijf C zorgde een *Cp. psittaci* genotype E/B stam voor een infectie en later ook voor een herinfectie of opflakking van de latente E/B infectie. Dit ondanks de behandeling met doxycycline, een chlamydiostatisch antibioticum. *Cp. psittaci* is een primair pathogeen agens (Vanrompay *et al.*, 1993b) en door de hoge prevalentie en de resultaten omtrent de infectiekinetica op de bedrijven moeten we besluiten dat *Cp. psittaci* een belangrijke rol speelt in het multifactorieel respiratoir complex.

Om de seroprevalentie van aMPV te analyseren is het belangrijk een onderscheid te kunnen maken tussen vaccinatie-geïnduceerde antistoffen en infectie-geïnduceerde antistoffen. De sera werden infectie-positief bevonden indien de seroneutralisatietiter  $> 6 \log_2$ . Immers, vaccinatie met levend verzwakte subtype A en B stammen genereert nooit een hogere titer dan  $6 \log_2$  (Van de *et al.*, 2002). Zeven van de 10 bedrijven waren positief voor aMPV, met een gemiddelde van 34% anti-aMPV positieve sera. Op het eerste zicht was er geen directe correlatie tussen aMPV vaccinatie en het uitblijven van een aMPV infectie, daar 57% van de gevaccineerde aMPV bedrijven een aMPV infectie doormaakten en één van de drie niet-gevaccineerde bedrijven aMPV vrij was op het moment van de slacht. In Duitse commerciële bedrijven waren meer kalkoenen (54.3%) aMPV seropositief (Redmann *et al.*, 1993). In de longitudinale studie vertoonden alle kalkoenen maternale antistoffen tegenover aMPV, welke geleidelijk daalden tot 3 weken ouderdom. Op bedrijf A werd er niet tegen aMPV gevaccineerd en de seroconversie in het begin van de opzet kon worden toegeschreven aan een subtype B infectie. Op bedrijf B werd de seroconversie waargenomen op het einde van de opzet, eveneens als gevolg van een subtype B infectie. Niettegenstaande de duidelijke seroconversie tegenover aMPV op het einde van de opzet op bedrijf C, kon hier geen aMPV gedetecteerd worden met behulp van de RT-PCR. Mogelijks heeft de aMPV infectie plaatsgevonden tussen de twee-wekelijkse staalnames, en aangezien aMPV tot maximaal 10

dagen na infectie detecteerbaar is kunnen wij het optimale detectie tijdstip 'gemist' hebben (Van de Zande *et al.*, 1999). Ondanks een subtype A vaccinatie op de bedrijven B en C, werd een subtype B infectie vastgesteld. Andere studies hebben ook melding gemaakt van subtype A of B doorbraken na een subtype A vaccinatie (Naylor *et al.*, 1997; Van de Zande *et al.*, 2000). Dus ondanks het relatief lage prevalentiepercentage van 34% bij de slachthuis-kalkoenen, zijn alle drie de bedrijven onderhevig geweest aan minstens één aMPV infectie. Dit wijst er mogelijk op dat de aMPV infecties weken voor de slacht plaatsvinden en de titers reeds gedaald zijn bij de slacht.

De seroprevalentie van ORT bij Belgische kalkoenen, bepaald bij slachting, was zeer laag met slechts 6% positieve sera op twee bedrijven. Dit is laag in vergelijking met kalkoenen uit de USA waar in 43% van de faryngeale swabs van de kalkoenen tussen 5 en 7 weken oud ORT kon gedetecteerd worden (Roepke *et al.*, 1998). In andere serologische studies kon in 55% en 96.6% van de vleeskalkoenen anti-ORT antistoffen gedetecteerd worden door respectievelijk Hafez & Sting (1996) en Ryll *et al.* (1997). Lage antistoftiters op het moment van de slacht geven echter maar een idee over de laatste 4 weken voor slacht, aangezien ORT antistoftiters immers pieken 1 tot 4 weken na infectie en daarna zeer snel verdwijnen (Van Empel & Hafez, 1999). We kunnen dus aan de hand van de slachthuissera niets zeggen over de prevalentie van ORT op onze bedrijven. Het dan ook aangewezen om op verschillende tijdstippen tijdens de opzet bloedstalen te nemen, zoals voor de longitudinale studie. Alle onderzochte bedrijven maakten een ORT infectie door rond 6 tot 8 weken ouderdom (Van Loock *et al.*, 2005a), zoals ook werd waargenomen door Roepke *et al.* (1998). Geen van de kalkoenen had maternale antistoftiters tegenover ORT.

*Cp. psittaci* speelt een belangrijke rol in het multifactorieel complex in Belgische kalkoenenbedrijven, daar *Cp. psittaci* infecties op alle bedrijven voorkomen tussen 3 en 4 weken ouderdom, vergezeld van een aMPV infectie op niet-aMPV gevaccineerde bedrijven. Deze infecties, gedurende 3 en 6 weken ouderdom, kunnen de gezondheid van de kalkoenen verzwakken waardoor ze gevoeliger worden voor een ORT infectie tussen 6 en 8 weken ouderdom. Op zijn beurt kan de ORT infectie ook als predisponerende factor functioneren voor een tweede golf van *Cp. psittaci* en aMPV infecties op het einde van de opzet. Daar waar Hafez *et al.* (1998) aantoonde dat in 80% van de tomen seroconversie tegenover aMPV en/of ORT gevolgd werd door een stijging in anti- *Cp. psittaci* antistoffentiter, konden wij aantonen dat *Cp. psittaci* infecties op jonge leeftijd kunnen voorkomen, zonder een predisponerende aMPV of ORT infectie (Van Loock *et al.*, 2005a).

Het is echter niet uit te sluiten dat andere bijkomende respiratoire pathogenen ook hun bijdrage leveren tot het multifactorieel respiratoir complex. Meer specifiek lijkt een primaire infectie met *Cp. psittaci* de klinische symptomen van een gelijktijdige of daaropvolgende infectie met *E. coli*, APV en/of ORT bovendien te verergeren, zoals aangetoond tijdens een onderzoeksproject gesteund door de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu (S5930 en S6037) (Van Looek *et al.*, 2005a; 2006a; 2006b).

### **3. LACTOFERRINE INTERFEREERT MET TYPE III SECRETIE IN GRAM-NEGATIEVE BACTERIËN**

Lactoferrine helpt het lichaam zich te verdedigen tegenover pathogene bacteriën, schimmels, protozoa en virussen en dit door zijn ijzerbindend vermogen en zijn anti-inflammatoire werking. Andere biologische functies van lactoferrine zijn 1) de activatie van het immuunsysteem, 2) de inwerking op de myelopoiesis en 3) zijn vermogen om te binden aan verschillende cellen en anionische moleculen, inclusief DNA, lipopolysaccharide en glycosaminoglycanen [overzicht in Ward *et al.*, (2005)]. Zijn anti-bacteriële werking werd tot voor kort in hoofdzaak toegeschreven aan het ijzerbindend vermogen. Doch meer recent werd aangetoond dat lactoferrine inwerkt op het T3SS van Gram-negatieve bacteriën zoals *Shigella* en *E. coli*. Lactoferrine is een serine protease en het degradeert twee virulentie-eiwitten gesecreteerd door het T3SS van *Shigella*, namelijk het 'invasion plasmide antigen B en C (IpaB en IpaC) (Ochoa & Clearly, 2004). Deze eiwitten vormen normaal een complex en zorgen voor de opname van *Shigella* door de gastheercel. In het geval van *E. coli* veroorzaakt lactoferrine de degradatie van de gesecreteerde virulentie-eiwitten EspA, B en D. EspA vormt normaal een buisvormige structuur tussen de bacterie en de gastheercel. EspB en D worden door deze buis getransporteerd en vormen dan aan het uiteinde van de buis een porie in de gastheercelmembraan zodat de bacterie in het cytoplasma van de gastheercel kan dringen (Ochoa *et al.*, 2003; Di Biase *et al.*, 2004; Ochoa *et al.*, 2004; Ochoa & Clearly, 2004). Wij hebben in ons onderzoekslaboratorium kunnen aantonen dat lactoferrine ook inwerkt op het T3SS van *Cp. psittaci* door inhibitie van de Tarp-geïnduceerde actine polymerisatie noodzakelijk voor de opname van de kiem in de gastheercel (Beeckman *et al.*, 2007).

## Hoofdstuk 2: Zoönotische transmissie van *Chlamydophila psittaci*

Naar:

Van Droogenbroeck, C., Beeckman, D.S.A., Verminnen, K., Marien, M., Nauwynck, H., de Thibault de Boesinghe, L., and Vanrompay, D. (2009). Simultaneous zoonotic transmission of *Chlamydophila psittaci* genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist. *Vet. Microbiol.*, 135(1-2): 78-81. First two authors contributed equally to this study.





## 1. INLEIDING

*Chlamydophila (Cp.) psittaci* veroorzaakt ademhalingsproblemen in vogels en psittacose of papegaaienziekte in de mens. Alle gekende *Cp. psittaci* outer membrane protein (*ompA*) genotypes zijn overdraagbaar naar de mens en gaan vaak gepaard met koorts, rillingen, hoofdpijn, ademnood en hoesten. Radiografie duidt vaak op infiltratie van de longen [overzicht in Beeckman en Vanrompay (2009)]. Het klinisch beeld varieert van asymptomatisch tot sepsis en multi-orgaan falen en mogelijks opname in intensieve zorg. De infectie gebeurt meestal door inademing van aerosolen van fecaal materiaal van geïnfecteerde vogels. In dit hoofdstuk tonen we de simultane overdracht van drie verschillende *Cp. psittaci ompA* genotypes (D, F en E/B) aan van geïnfecteerde kalkoenen naar een dierenarts.

## 2. MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1. Gevalsbeschrijving en staalname

Conventionele geëmbryoneerde kalkoeneieren (T9 Webster) werden aangekocht en overgebracht naar een uitkijkkamer op de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent. Twee groepen van vijf ééndagskuikens werden overgebracht naar negatieve druk isolatoren, om op de leeftijd van drie weken geïnfecteerd te worden met aviair metapneumovirus (aMPV) en *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). De dieren vertoonden echter reeds vóór deze leeftijd ademhalings symptomen zoals rhinitis en ademnood. Per groep werd vervolgens één ziek dier geëuthanaseerd om de oorsprong van de infectie te achterhalen. Lijkschouwing bracht duidelijke stuwung van de conchae, sero-muceuse rhinitis en stuwung van de trachea aan het licht. Routinediagnostiek voor courante virale en bacteriële infecties (o.a. ORT, *Escherichia coli* en aMPV) bleef negatief. Daaropvolgend werden van de overblijvende dieren faryngeale swabstalen genomen voor *Cp. psittaci* diagnose (tijds punt 1, t1) voor zowel isolatie als PCR. De dierenarts die verantwoordelijk was voor het experiment en de lijkschouwing op de dieren had uitgevoerd vertoonde geen klinische symptomen. Desalniettemin werden ook van haar twee keelwabs afgenomen voor isolatie en PCR, net als twee bloedstalen voor serologie (t1 en t1 + 2 maand). Alle dieren werden geëuthanaseerd en in verzegelde RMA vaten afgevoerd door een gespecialiseerde firma. Twee weken later (tijds punt t2) vertoonde de dierenarts nog steeds geen klinische symptomen, en werden opnieuw keelwabs afgenomen voor *Cp. psittaci* diagnostiek.

## 2.2. *Cp. psittaci* detectie en karakterisatie

Humane (t1, n = 1) en dier swabs voor isolatie (t1, n = 2) werden getest door inoculatie op BGM celcultuur, incubatie gedurende drie dagen en indirecte immunofluorescentiekleuring met behulp van een familiespecifiek monoclonaal antilichaam (7B6III). De stalen werden gescoord, waarbij een hogere score wijst op een hogere bacteriële aanwezigheid (Vanrompay *et al.*, 1992; Geens *et al.*, 2005a). Op de swabstalen voor PCR werd DNA extractie en nested PCR voor het outer membrane protein A (*ompA*) gen van *Cp. psittaci* uitgevoerd zoals beschreven door Van Look *et al.* (2005b). Stalen die positief bleken in nested PCR werden verder gekarakteriseerd door middel van een *Cp. psittaci ompA* genotype-specifieke real-time PCR (Geens *et al.*, 2005b). Deze techniek laat bovendien ook toe om chlamydiaal DNA kwantitatief te meten door middel van normalisatie ten opzichte van humane of aviaire beta-actine huishoudgenen. De serumstalen werden kaolin behandeld om de “achtergrondactiviteit” in ELISA ten gevolge van o.a. lipiden te reduceren (Novak *et al.*, 1993) en vervolgens getest in een in-house ELISA (Verminnen *et al.*, 2006).

## 3. RESULTATEN

In beide diergroepen konden levende kiemen worden aangetoond door middel van isolatie en dit werd bevestigd door de resultaten van de nested PCR (Tabel 1). Door middel van *ompA* genotypering kon worden aangetoond dat beide groepen geïnfecteerd waren met drie verschillende *Cp. psittaci* genotypes, meerbepaald genotypes D, F en E/B, waarbij voor genotype D het hoogste kopij-aantal kon worden waargenomen (Tabel 2). Hoewel de dierenarts geen klinische symptomen had, bleek ook zij geïnfecteerd te zijn op tijdstip t1. (Tabel 1). Net als bij de kalkoenen werd in de humane keelwabs genotype D, F en E/B gedetecteerd (Tabel 2), met het hoogste kopij-aantal opnieuw voor genotype D. De serum *Cp. psittaci*-specifieke antistoftiter van de dierenarts bedroeg op dat tijdstip (t1) 1:800.

**Tabel 1** Isolatie en nested PCR resultaten voor kalkoengroep 1 en 2 en de dierenarts

Staal	Isolatiescore <sup>a</sup>	Nested PCR <sup>b</sup>
<b>Kalkoengroep 1</b>	2	+
<b>Kalkoengroep 2</b>	2	+
<b>Dierenarts (t1)</b>	1	+
<b>Dierenarts (t2)</b>	2	+

<sup>a</sup> Score: 0: Geen *Cp. psittaci*; 1: gemiddeld 1–5 elementaire lichaampjes; scores 2, 3 tot 4: gemiddeld 1–5, 6–10 en >10 inclusie positieve cellen, in vijf representatieve velden van het preparaat

<sup>b</sup> + : positief resultaat in nested PCR

Twee weken later (tijdstip t2) bevatten de faryngeale keelwabs van de dierenarts nog steeds levende *Cp. psittaci* kiemen (Tabel 1) en werden opnieuw genotypes D, F en E/B gedetecteerd. Op dit tijdstip waren de genormaliseerde kopij-aantallen voor alle drie de genotypes wel lager dan op tijdstip t1 (Tabel 2).

**Tabel 2 Genormaliseerd aantal *Cp. psittaci ompA* kopijen per 5  $\mu$ l DNA extract zoals bepaald door genotype-specifieke real-time PCR**

Staal	Genormaliseerd aantal <i>Cp. psittaci ompA</i> kopijen		
	Genotype D	Genotype F	Genotype E/B
<b>Kalkoengroep 1 (t1)</b>	2,73 . 10 <sup>7</sup>	1,30 . 10 <sup>6</sup>	4,43 . 10 <sup>5</sup>
<b>Kalkoengroep 2 (t1)</b>	1,29 . 10 <sup>7</sup>	3,11 . 10 <sup>5</sup>	1,93 . 10 <sup>5</sup>
<b>Dierenarts (t1)</b>	1,23 . 10 <sup>4</sup>	1,54 . 10 <sup>2</sup>	1,62 . 10 <sup>3</sup>
<b>Dierenarts (t2)</b>	2,69 . 10 <sup>3</sup>	4,60 . 10 <sup>1</sup>	2,54 . 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Het aantal kalkoen of humane beta-actine kopijen in de reactie werd bepaald om te corrigeren voor verschillen in hoeveelheid staal en efficiëntie van de DNA extractie. Absolute *Cp. psittaci* kopij-aantallen werden vervolgens genormaliseerd ten opzichte van de hoeveelheid kalkoen of humaan DNA in elk staal.

Het humane serumstaal dat twee maand later genomen was (t1 + 2 maand) was *Cp. psittaci* negatief. Gedurende deze periode klaagde de dierenarts niet over ernstige ademhalingsproblemen, maar vermeldde wel lichte verkoudheidsymptomen, mogelijk als gevolg van een virale infectie, aangezien dit incident zich in de winterperiode voordeed. De dierenarts werd dan ook niet behandeld voor humane psittacose.

#### 4. DISCUSSIE

*Chlamydophila psittaci* infecties, en voornamelijk de overdracht ervan naar de mens, wint de laatste jaren aan interesse bij dierenartsen en gezondheidswerkers. Veelal wordt humane psittacose gediagnosticeerd aan de hand van een micro-immunofluorescentie (MIF) test. Deze MIF test wordt dan ook beschouwd als dé referentiemethode voor serologische diagnose van *Cp. psittaci* infecties. Slides met antigenen van *Chlamydia (C.) trachomatis*, *Cp. pneumoniae* en *Cp. psittaci* worden hiervoor gebruikt en een staal is positief wanneer de titer  $\geq$  1:16 bedraagt (NASPHV, 2008). Omdat in de MIF test gebruik wordt gemaakt van volledige chlamydiale bacteriën, kan er serologische kruisreactiviteit optreden tussen *Cp. psittaci* en andere *Chlamydiaceae* die bij de mens voorkomen. Bovendien kunnen ook kruisreagerende antistoffen tegen lipopolysaccharide (LPS) of eiwitten zoals hsp60 leiden tot vals-positieve resultaten (Brade & Brunner, 1979; Yuan *et al.*, 1992). Vandaar dat een multiparametrische

aanpak met specifiekere diagnostische testen om *Cp. psittaci* in humane stalen te onderscheiden van andere chlamydiale infecties aangewezen zou zijn.

In deze studie konden we de zoönotische overdracht van *Cp. psittaci* aantonen met behulp van een monoclonaal antilichaam tegen het *Chlamydiaceae*-specifiek MOMP eiwit en een *Cp. psittaci*-specifieke nested PCR (Geens *et al.*, 2005a; Van Loock *et al.*, 2005b). De oorsprong van infectie werd bepaald aan de hand van een *Cp. psittaci ompA* genotype-specifieke real-time PCR (Geens *et al.*, 2005b). Hierbij werd een gelijktijdige infectie met genotypes D, F en E/B in beide kalkoengroepen vastgesteld. Aangezien beide groepen uit hetzelfde bedrijf afkomstig waren, kunnen we stellen dat deze drie genotypes op het bedrijf aanwezig waren. Ook in het verleden konden we al gemengde *Cp. psittaci* infecties op kalkoebenbedrijven aantonen (Van Loock *et al.*, 2005a). We weten echter niet of alle dieren geïnficeerd waren met deze drie verschillende stammen aangezien de dieren niet apart gesampled werden.

Serologie op de humane stalen gaf enkel voor t1 een positief resultaat. Het is mogelijk dat de gedetecteerde antistoffen kruisreagerende anti-*Cp. pneumoniae* of anti-*C. trachomatis* antistoffen waren. Immers, *Cp. psittaci* recombinant MOMP reageert niet met antistoffen tegen andere Gram-negatieve bacteriën, maar de aanwezige familie- en genus-specifieke epitopen kunnen wel binden met *C. trachomatis* en/of *Cp. pneumoniae* specifieke antistoffen. Een tweede mogelijkheid is dat deze antistoffen het gevolg waren van een eerdere *Cp. psittaci* infectie. De resultaten van de genotypering uitgevoerd op zowel de kalkoen- als de humane stalen lijken dit echter tegen te spreken, aangezien in beide exact dezelfde drie genotypes werden teruggevonden. Het is mogelijk dat de dierenarts geïnficeerd werd tijdens het transport van de kalkoenen naar de negatieve druk isolatoren. Verticale overdracht van *Cp. psittaci* en uitscheiding in één-dagskuikens werd reeds beschreven voor kalkoenen (Wittenbrink *et al.*, 1993; Lublin *et al.*, 1996; Vanrompay *et al.*, 1997b). Het is echter meer waarschijnlijk dat de dierenarts geïnficeerd werd tijdens het verzorgen van de dieren in de stallen en het uitvoeren van de lijkschouwingen op de twee weken oude dieren. Deze lijkschouwingen werden uitgevoerd in de autopsiezaal van de Faculteit Diergeneeskunde. De standaardprocedure (dierenartsen in opleiding en in privé-praktijken) werd gevolgd waarbij de dieren werden bevochtigd voor aanvang, maar geen P3 volgelaatsmasker werd gedragen. Volledige bescherming van zowel de operator als de omgeving kan enkel geboden worden wanneer gewerkt wordt in een microbiële veiligheidskast klasse II (BSCII). De vraag die zich opwerpt is dan of we praktijkdierenartsen moeten verbieden nog lijkschouwingen uit te voeren en dierenklinieken verplichten om een BSCII te voorzien in hun autopsiezalen. Dit is vrij verregaand en bovendien moeilijk afdwingbaar. Het dragen van een P3 volgelaatsmasker

tijdens de lijkschouwing is ons inziens beter haalbaar en biedt zeker bescherming tegen zoönotische transmissie van *Cp. psittaci*. Het dragen van een dergelijk masker is dan ook aan te raden, of zou zelfs verplicht moeten worden, zeker wanneer vogels met ademhalings-symptomen onderzocht worden.

In het verleden werden al verschillende uitbraken van humane psittacose beschreven ([overzicht in Beeckman & Vanrompay (2009)], maar slechts in een beperkt aantal gevallen werd ook een moleculaire karakterisatie van de geïsoleerde stammen uitgevoerd. Technieken die hiervoor gebruikt kunnen worden zijn *ompA* genotypering door real-time PCR of microarray (Geens *et al.*, 2005b; Sachse *et al.*, 2008), *ompA* sequencing (Geens *et al.*, 2005a) of multilocus variable number of tandem repeats assay (MLVA) typing (Laroucau *et al.*, 2008). In studies waar wel een moleculaire karakterisatie werd uitgevoerd (Heddema *et al.*, 2006a; 2006b; Harkinezhad *et al.*, 2007; Vanrompay *et al.*, 2007; Laroucau *et al.*, 2009) werd echter nog niet eerder een gelijktijdige overdracht van drie verschillende genotypes naar de mens beschreven. De hoogste kopij-aantallen in alle stalen werden waargenomen voor *Cp. psittaci* genotype D. Dit is geen verrassing aangezien eerdere studies reeds aantoonde dat genotype D meer voorkomt bij kalkoenen dan genotype F of E/B (Andersen, 1991; Vanrompay *et al.*, 1997a).

## 5. CONCLUSIE

In deze studie konden we 1) nogmaals het zoönotisch karakter van de aviaire pathogeen *Cp. psittaci* aantonen, 2) het gebruik van persoonlijke beschermingsmaatregelen aanbevelen, 3) de belang voor meer accurate, gevoelige en specifieke *Cp. psittaci* diagnostische testen demonstreren en 4) de noodzaak voor kostenefficiënte *Cp. psittaci* vaccins voor pluimvee en hobbyvogels aantonen, om op die manier de zoönotische overdracht te beperken.



## Hoofdstuk 3: Profylaxis tegen *Chlamydophila psittaci* door middel van een natuurlijk anti-microbieel eiwit

Naar:

Beeckman DSA, Van Droogenbroeck CMAD, De Cock BJA, Van Oostveldt P and Vanrompay DGC, 2007. Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. *Vet. Res.* 38 (5), 729-739.

Van Droogenbroeck C, Beeckman DSA, Harkinezhad T, Cox E and Vanrompay D, 2008. Evaluation of the prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis in SPF turkeys. *Vet. Microbiol.* 132 (3-4), 372-378.

Van Droogenbroeck C, Dossche L, Wauman T, Phan TTT, Beeckman DSA and Vanrompay D. Prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis. Submitted.

Van Droogenbroeck C, Wauman T, Beeckman DSA and Vanrompay D. From the lab to the farm, ovotransferrin as an anti-microbial against *Chlamydophila psittaci*. In preparation.





## A. Anti *Cp. psittaci* effect van transferrines – *in vitro* studie

### 1. INLEIDING

In eerste instantie werd onderzocht of de natuurlijke eiwitten humaan lactoferrine (hLF), bovien lactoferrine (bLF) en hun aviaire homologe ovotransferrine een anti-microbieel effect uitoefenden op de aviaire *Cp. psittaci* genotype D stam 92/1293.

Lactoferrine (LF) maakt deel uit van de transferrine-familie van ijzerbindende glycoproteïnen (Metz-Boutigue *et al.*, 1984) en is voornamelijk aanwezig in melk, traanvocht, speeksel en vaginale secreties. Dit ijzerbindend eiwit is betrokken in de immuun-afhankelijke gastheer-afweermechanismen tegen pathogene bacteriën, schimmels en protozoa. Het oefent zijn werking zowel direct uit, als door modulatie van de inflammatoire respons (Vorland, 1999). Het anti-bacterieel effect van lactoferrine kan op verschillende manieren verklaard worden. Zo bindt lactoferrine in zijn natuurlijke vorm ijzer dat nodig is om bacteriële groei toe te laten (Arnold *et al.*, 1977). Bovendien induceert het een destabilisatie van de buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën door binding met bacterieel lipopolysaccharide (Ellison, III *et al.*, 1988; Ellison, III *et al.*, 1990; Appelmeik *et al.*, 1994; Brandenburg *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2002), selectieve permeatie van ionen (Aguilera *et al.*, 2003), inhibitie van bacteriële intrede in de gastheer cel door genregulatie (Ashida *et al.*, 2004) en verstoort het bacteriële Type III secretie systeem (Ochoa *et al.*, 2003). Daarnaast bindt lactoferrine ook heparaan sulfaat gelijkende glycosaminoglycanen (GAGs) (Mann *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995). Deze GAGs zijn belangrijk om een eerste irreversibele, elektrostatische interactie tussen chlamydiae en de gastheer cel te mediëren (Su *et al.*, 1990; Zhang & Stephens, 1992; Raulston *et al.*, 1993; Ting *et al.*, 1995). Door het blokkeren van initiële bindingsplaatsen kan lactoferrine bijgevolg een inhiberend effect uitvoeren op de aanhechting van de pathogeen. Het homologe eiwit in vogels is ovotransferrine (ovoTF) of conalbumine. Dit extracellulaire ijzerbindend glycoproteïne behoort eveneens tot de familie van de transferrines, wordt aangemaakt door de lever en in de oviduct, en is dan ook voornamelijk terug te vinden in serum en het wit van ei. (Stevens, 1991; Giansanti *et al.*, 2002). Ovotransferrine is betrokken in ijzertransport naar en ijzerafgifte aan cellen (Martin-Mateo & Planas, 1965; Keung & Azari, 1982). Bovendien zou het eveneens anti-bacterieel werken, na transfer door de buitenste membraan, door selectieve permeatie van ionen doorheen de binnenste membraan leidend tot verlies van de elektrische potentiaal (Aguilera *et al.*, 2003). Daarnaast kon ook worden aangetoond dat een 92 aminozuren lang peptide van ovotransferrine, OTAP-92, Gram-negatieve bacteriën doodt. Het peptide penetreert de buitenste membraan van de

bacteriën en veroorzaakt zo een fatale permeabilisatie van de cytoplasmatische membraan (Ibrahim *et al.*, 1998; 2000).

In deze studie onderzochten we het mogelijk anti-chlamydiaal effect van zowel humaan en bovien lactoferrine als ovotransferrine in een model van Buffalo Green Monkey (BGM) nierepitheelcellen en kippenmonocyten/macrofagen (HD11 cellen).

## **2. MATERIAAL EN METHODEN**

### **2.1. Organisme en celcultuur**

De *Chlamydomphila (Cp.) psittaci* genotype D stam 92/1293 (Vanrompay *et al.*, 1993a) werd gebruikt in deze studie. Het effect van transferrines op *Cp. psittaci* werd onderzocht met behulp van Buffalo Green Monkey (BGM) nierepitheelcellen en HD11 kippenmacrofagen (Beug *et al.*, 1979). BGM cellen werden opgekweekt in Eagle's minimaal essentieel medium (MEM) gesupplementeerd met 10% hitte-geïnactiveerd foetaal bovien serum, 2 mM L-glutamine, 1% vitamines voor MEM, 10  $\mu$ l/ml streptomycinesulfaat (1% w/v) en 20  $\mu$ l/ml vancomycine (0.5% w/v). HD11 cellen werden opgegroeid in Dulbecco's gemodificeerd Eagle's minimaal essentieel medium (DMEM) gesupplementeerd met 5% hitte-geïnactiveerd foetaal kippenserum, 1% natriumpyruvaat, 1% L-glutamine en 0.5% gentamycine. Beide celculturen werden geïncubeerd bij 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2. Transferrines**

Ovotransferrine (ovoTF), humaan lactoferrine (hLF) en bovien lactoferrine (bLF), respectievelijk opgezuiverd uit het wit van kippeneieren, humane melk en bovien colostrum, werden aangekocht bij Sigma en ijzerverzadigd zoals voorheen beschreven (Rossi *et al.*, 2002).

### **2.3. In vitro toxiciteit van transferrines voor gastheercellen**

Om het mogelijk toxisch effect van transferrines na te gaan, werden HD11 cellen geplant in 96-well platen aan een concentratie van 300 000 cellen/ml. De volgende dag werden deze cellen gedurende 24, 36 en 48 uur blootgesteld aan verschillende transferrine concentraties (0.5; 1; 2.5; 5 en 10 mg/ml). De cytotoxiciteit werd onderzocht door middel van het tellen van levende cellen na nigrosinekleuring en via een 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] MTT-test (Mosmann, 1983) die een maat vormt voor de mitochondriale activiteit. Tien  $\mu$ l MTT (5 mg/ml) in Hanks balanced salt solution werd toegediend aan elk welletje en na incubatie gedurende 3.5 uur bij 37 °C werd de MTT-oplossing vervangen door

200  $\mu$ l DMSO in ethanol (1/1 v/v). De platen werden gedurende 15 min geschud aan 450 rpm om de formazan kristallen op te lossen en vervolgens werden de OD-waarden bij 585 nm (OD1) en 620 nm (OD2, correctie voor celdebris en well-imperfecties) spectrofotometrisch bepaald. De finale optische densiteiten werden voorgesteld als OD1-OD2. Ook voor BGM cellen werd de toxiciteit op gelijkaardige wijze nagegaan.

#### **2.4. Effect van transferrines op extracellulaire *Cp. psittaci***

Incubatie van *Cp. psittaci* in de aanwezigheid van transferrines vóór inoculatie liet ons toe om het direct anti-chlamydiaal effect op extracellulaire bacteriën te bestuderen en om de maximale niet-bactericide concentratie van transferrines te bepalen. *Cp. psittaci* bacteriën ( $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml) werden gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37 °C in BGM celcultuurmedium gesupplementeerd met 0.005; 0.05; 0.5 en 5 mg/ml transferrine. Daarna werden de bacteriën tweemaal gewassen (45 000 x g, 45 min, 4 °C) in PBS en geïnoculeerd in BGM cellen. Op 36 uur post infectie (p.i.) werd de bacteriële vermeerdering gekwantificeerd door middel van een immunofluorescentiekleuring (zie paragraaf 2.7).

#### **2.5. Effect van transferrines op chlamydiale aanhechting en intrede**

HD11 cellen werden aan een concentratie van 300 000 cellen/ml opgegroeid op steriele glaasjes in Chlamydia Track bottles gedurende 24 uur bij 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. De cellen werden vervolgens geïnoculeerd met 20  $\mu$ l van de *Cp. psittaci* stam 92/1293 ( $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml) volgens de standaardprocedure (Vanrompay *et al.*, 1992), maar zonder het gebruik van cycloheximide aangezien dit de actinepolymerisatie kan inhiberen bij de intrede van de bacterie. Het inoculeren gebeurde bovendien gedurende 15 min bij 4 °C (1 000 x g) in plaats van 37 °C om de aanhechting en intrede te synchroniseren (Subtil *et al.*, 2004). Om het optimale tijdstip te bepalen om *Cp. psittaci* geïnduceerde actinepolymerisatie te bepalen werden in een eerste experiment de geïnfecteerde cellen voor 0, 5, 10 en 15 min geïncubeerd bij 4 °C of 37 °C. Na fixatie en immunofluorescentiekleuring (zie paragraaf 2.7) bleek het 15 min tijdstip (incubatie bij 37 °C) het meest geschikt om een inschatting te maken van de chlamydiaal geïnduceerde actinepolymerisatie. Vervolgens werden nieuwe HD11 cellen geïnfecteerd zoals hierboven beschreven, werden de monolagen werden nadien gewassen om niet aangehechte bacteriën te verwijderen en werden verschillende concentraties transferrines werden toegediend (0.005 en 0.05 mg/ml ovoTF en 0.5 mg/ml hLF en bLF in HD11 medium met 5.5 mg/ml glucose). De cellen werden verder geïncubeerd bij 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> tot een

immunofluorescentiekleuring (zie paragraaf 2.7) werd uitgevoerd van de bacteriën en het cytoskelet op 15 min, 1 uur, 6 uur en 48 uur p.i.

## **2.6. Effect van transferrines op de intracellulaire vermeerdering**

Niet-cytotoxische transferrine concentraties van 0.005 tot 5 mg/ml ovoTF en 0.005 tot 1 mg/ml hLF en bLF werden toegediend aan HD11 cellen op 3 uur p.i. wanneer alle bacteriën de cellen waren binnengedrongen en er binaire fissie kon optreden. Op deze manier kon het effect van de transferrines op de intracellulaire vermeerdering bestudeerd worden door middel van een immunofluorescentiekleuring op 48 uur p.i. Scores van 0 tot 5 werden gegeven in overeenstemming met Van Loock *et al.* (2006a).

## **2.7. Immunofluorescentiekleuring**

Zowel het bactericide effect van de verschillende transferrines als hun effect op de aanhechting, intrede en intracellulaire vermeerdering werd onderzocht door middel van een immunofluorescentiekleuring. Alle kleuringen werden als volgt uitgevoerd. De cellen werden tweemaal gewassen met PBS en vervolgens gefixeerd met 4% paraformaldehyde en 120 mM sucrose in PBS gedurende 30 min bij kamertemperatuur. Na nog een volgende wasstap werden de cellen gedurende 10 min geïncubeerd met 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS bij kamertemperatuur en gepermeabiliseerd met 0.05% saponine en 1 mg/ml BSA in PBS. *Cp. psittaci* kon gedetecteerd worden door middel van een polykonaal konijn antilichaam tegenover opgezuiverde *Cp. psittaci* EB's (Beeckman *et al.*, 2009), gevolgd door een AlexaFluor 546 gelabeld geit anti-konijn conjugaat, allebei 1/200 verdund in PBS met 1% BSA. Na 15 min, 1 uur en 6 uur p.i. werd het actineskelet gevisualiseerd door middel van AlexaFluor 488 gelabeld falloidine (Molecular Probes) zoals voorgeschreven door de firma. De glaasjes in de Chlamydia Track Bottles werden gemonteerd met Mowiol met 0.01% p-phenyleendiamine (PPD) (Valnes & Brandtzaeg, 1985).

De fluorescent gelabelde bacteriën werden gekwantificeerd door middel van fluorescentiemicroscopie met een CCD camera, waarbij gebruik gemaakt werd van een digitale titratie techniek (Beeckman *et al.*, 2009). Beelden van de chlamydiale aanhechting en intrede en van de actinepolymerisatie werden geanalyseerd door middel van confocale laser scanning microscopie (CLSM).

### 3. RESULTATEN

#### 3.1. Toxiciteit van transferrines voor *in vitro* gastheercellen

Concentraties tot en met 5 mg/ml ovoTF en tot en met 1 mg/ml hLF en bLF oefenden geen cytotoxisch effect uit op HD11 cellen voor alle onderzochte tijdstippen. Op 36 uur p.i. kon in de MTT-test evenwel een reductie van 25% van het cellulaire metabolisme geobserveerd worden voor HD11 cellen die behandeld werden met 0.5 mg/ml bLF. Deze reductie nam zelfs toe tot 50% op 48 uur p.i. Voor BGM cellen was 10 mg/ml ovoTF, 1 mg/ml hLF en 0.5 mg/ml bLF niet toxisch.

#### 3.2. Effect van transferrines op extracellulaire *Cp. psittaci*

Pre-incubatie van de bacteriën met 0.5 tot en met 5 mg/ml ovoTF inhibeerde hun infectiviteit voor BGM cellen significant, zoals gedetecteerd aan de hand van de chlamydiale groei op 36 uur p.i. Voor hLF of bLF was minimum 5 mg/ml vereist om een gelijkaardig bactericid effect te bekomen. Op basis van deze resultaten werden in de hieropvolgende experimenten concentraties van 0.005 en 0.05 mg/ml ovoTF en 0.5 mg/ml hLF of bLF aangewend. Het bactericide effect van ovotransferrine was dus groter dan dat van de beide geteste lactoferrines.

#### 3.3. Effect van transferrines op chlamydiale aanhechting en intrede

Vooreerst werd het optimale tijdstip om de door *Cp. psittaci* geïnduceerde actinepolymerisatie in kaart te brengen, namelijk 15 min bij 37 °C. Niet-cytotoxische en niet-bactericide concentraties van 0.05 mg/ml ovoTF en 0.5 mg/ml hLF en bLF toonden aan dat de aanhechting en de intrede van *Cp. psittaci* in HD11 cellen kon geïnhibeerd worden, doch het inhiberend effect van ovoTF was significant groter dan voor hLF of bLF: Zowel op 15 min p.i. als 1 uur p.i. kon een dosis-afhankelijke inhibitie van aanhechting en intrede worden waargenomen door ovoTF ten opzichte van de niet-behandelde stalen. Confocale opnames op 15 min p.i. brachten aan het licht dat inoculatie in aanwezigheid van niet-cytotoxische concentraties (0.005 of 0.05 mg/ml) ovoTF een significante inhibitie van de actinepolymerisatie induceerde, en dit opnieuw op dosis-afhankelijke wijze. Hetzelfde fenomeen kon waargenomen worden op 1 uur p.i. Bovendien werd enkel de actinepolymerisatie ter hoogte van de bacteriële intredeplaats geïnhibeerd, en dus niet het vermogen van de cel om actine te polymeriseren. Op 48 uur p.i. werd duidelijk dat zowel beide ovoTF concentraties als 0.5 mg/ml LF een significante daling in aantal inclusievormende eenheden (MNI) tot gevolg hadden in vergelijking met de niet-behandelde controles (Tabel 3).

**Tabel 3 Gemiddeld aantal inclusies (MNI,  $\pm$  standaard afwijking) op 48 uur p.i. in afwezigheid (controle) of aanwezigheid van lactoferrine of ovotransferrine.**

Behandeling	Mean Number of Inclusion forming
Controle	372 $\pm$ 75
0.005 mg/mL ovoTF	63 <sup>a</sup> $\pm$ 27
0.05 mg/mL ovoTF	87 <sup>a</sup> $\pm$ 34
0.5 mg/mL hLF	154 <sup>a</sup> $\pm$ 42
0.5 mg/mL bLF	124 <sup>a</sup> $\pm$ 52

<sup>a</sup> Significant verschillend ( $P < 0.05$ ) van de waarde van de niet-behandelde controle (Tukey HSD test).

Algemeen kan dus gesteld worden dat ovoTF effectiever was dan humaan en bovien lactoferrine voor de inhibitie van *Cp. psittaci* in HD11 cellen aangezien zowel aanhechting, intrede als vermeerdering geïnhibeerd werden bij een 10 maal lagere concentratie.

### 3.4. Effect van transferrines op de intracellulaire vermeerdering

OvoTF en de beide lactoferrines hadden geen invloed op de intracellulaire vermeerdering van *Cp. psittaci*. Eens het micro-organisme was binnengedrongen in de cel kon er een normale vermeerdering plaatsvinden in aanwezigheid van transferrines in het medium (Tabel 4). Er werd bovendien geen afwijkende inclusiemorfologie waargenomen.

**Tabel 4 Effect van transferrins op de intracellulaire vermeerdering van *Cp. psittaci*.** Drie uur na infectie van HD11 cellen met *Cp. psittaci*, werden transferrines aan het medium toegevoegd om hun effect op de intracellulaire vermeerdering na te gaan. De gemiddelde scores op 48 uur p.i. worden weergegeven.

mg/ml	0	0.005	0.05	0.5	1.0	5.0
ovoTF	5+	5	5	4.5	NT	5
hLF		NT	NT	5	4.5	NT
bLF		NT	NT	4.5	4	NT

NT niet getest.

## 4. DISCUSSIE

Zowel voor ovotransferrine (Valenti *et al.*, 1983; Ibrahim *et al.*, 1998) als lactoferrine [overzicht in Valenti & Antonini (2005)] werden in het verleden reeds bactericide effecten beschreven, maar hun effect op chlamydiale bacteriën was tot op heden nog niet kaart gebracht. Het specifiek bactericide effect van ovoTF en humaan en bovien LF op de vogelpathogeen *Cp. psittaci* werd bestudeerd door *Cp. psittaci* te incuberen met verschillende concentraties van deze natuurlijk voorkomende anti-microbiële eiwitten vooraleer BGM cellen te infecteren. Om mogelijke effecten van ijzersequestratie te vermijden werden alle

eiwitten ijzerverzadigd. De bactericide activiteit van ovoTF was significant hoger dan van hLF en bLF. Alhoewel er geen direct aanwijsbare reden is voor dit verschil in anti-chlamydiale activiteit, kan het zijn dat ovoTF, wat enkel bij vogels wordt teruggevonden, beter is aangepast om vogelpathogenen uit te schakelen.

Irreversibele aanhechting van *Chlamydiaceae* aan hun gastheer cel gaat gepaard met het aantrekken en polymeriseren van actinefilamenten die de bacterie vervolgens assisteren bij hun intrede in de gastheer cel (Clifton *et al.*, 2004). Algemeen kunnen we stellen dat niet-cytotoxische en niet-bactericide concentraties aan ovoTF *Cp. psittaci* aanhechting en intrede in een homoloog celsysteem (HD11 kippenmacrofagen) efficiënter inhibeerden dan humaan en bovendien LF. Een mogelijke verklaring is dat de binding van ovoTF aan gastheer cel GAG's interfereert met de chlamydiale aanhechting. Het is echter zo dat het N-terminale domein in lactoferrine dat hierbij betrokken is, niet aanwezig is in ovoTF (Giansanti *et al.*, 2002), wat betekent dat het effect van lactoferrines op *Cp. psittaci* aanhechting en intrede in principe groter zou moeten zijn dan voor ovoTF. Dit kan er enkel op wijzen dat andere anti-chlamydiale mechanismen betrokken zijn in de geobserveerde inhibitie van aanhechting en intrede, zoals bijvoorbeeld een effect op het bacteriële Type III secretiesysteem (T3SS). Dit T3SS brengt het Tarp eiwit (translocated actin-recruiting phosphoprotein) over naar de gastheer cel en initieert op deze manier de actinepolymerisatie (Clifton *et al.*, 2005). In het huidige onderzoek werd waargenomen dat behandeling met transferrines resulteerde in een vermindering en zelfs afwezigheid van *Cp. psittaci* geïnduceerde actinepolymerisatie, hoewel de cel daar op andere plaatsen nog steeds tot toe in staat bleek. Een mogelijk mechanisme voor een dergelijk effect is binding aan LPS in de buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën. Dit geeft het membraan een meer rigide structuur (Brandenburg *et al.*, 2001), waardoor de stabiliteit van het T3SS en de secretie van effector eiwitten zoals Tarp in het gedrang zouden kunnen komen. Bovendien konden Ochoa *et al.* (2003; 2004) aantonen dat lactoferrine de aanhechting van enteropathogene *E. coli* (EPEC) aan gastheer cellen en actinepolymerisatie inhibeert door afbraak van de EPEC T3SS translocon eiwitten EspA, B en D. Ook bij *Shigella flexneri* verminderde behandeling met lactoferrine infectie van gastheer cellen door het vrijgave en daaropvolgend afbraak van T3SS translocon eiwitten IpaB and IpaC (Gomez *et al.*, 2003). Op basis van de sequentiële en structurele homologie tussen humaan LF en ovoTF, kan bijgevolg verwacht worden dat ook ovoTF een destabiliserend of zelfs proteolytisch effect heeft op het chlamydiale T3SS. Wanneer we kijken naar de bacteriële vermeerdering op 48 p.i., zagen we een duidelijke inhibitie door zowel ovoTF (0.005 en 0.05 mg/ml) als LF (0.5 mg/ml). Dit was te verwachten omdat de aanhechting en

intrede significant verlaagd was (zie hoger). Gezien het feit dat deze inhibitie sterker was in aanwezigheid van ovoTF, vermoeden we dat er een species-specifiek effect wordt uitgeoefend door de eiwitten die in deze studie gebruikt werden.

## 5. CONCLUSIE

Zowel lactoferrine als het aviaire homologe eiwit ovotransferrine oefenen een bactericide effect uit op extracellulaire *Cp. psittaci*, waarbij ovotransferrine het effectiefst was. Daarnaast konden we ook aantonen dat de aanhechting en intrede van *Cp. psittaci* in HD11 kippenmacrofagen meer geïnhibeerd werd door ovotransferrine dan door humaan of bovien lactoferrine. Dit is mogelijk het gevolg van een blokkage van Type III secretie gemedieerde actinepolymerisatie ter hoogte van de aanhechtingsplaats van de bacteriën. Het bactericide effect en de significante inhibitie van de aanhechting en intrede van *Cp. psittaci* door ovotransferrine impliceren dat het eiwit mogelijk ook *in vivo* kan aangewend worden ter bestrijding van *Cp. psittaci* infectie.



## **B. Anti *Cp. psittaci* effect van transferrines – *in vivo* studie**

### **1. INLEIDING**

Uit de voorgaande studie is gebleken dat ovotransferrine (ovoTF) het meest effectieve transferrine was ter preventie van een *Chlamydophila (Cp.) psittaci* infectie in HD11 cellen. Tijdens een daaropvolgend *in vivo* “proof of principle” experiment werd het anti-*Cp. psittaci* effect van ovoTF bestudeerd bij SPF kalkoenen.

### **2. MATERIAAL EN METHODEN**

#### **2.1. Organisme en celcultuur**

*Chlamydophila (Cp.) psittaci* genotype D stam 92/1293 (Vanrompay *et al.*, 1993a) werd gebruikt in deze studie. De bacteriën werden opgegroeid in Buffalo Green Monkey (BGM) cellen zoals voorheen werd beschreven (zie hoofdstuk 3A, paragraaf 2.1).

#### **2.2. Ovotransferrine**

Ovotransferrine (ovoTF), opgezuiverd uit het wit van kippeneieren, werd aangekocht bij Sigma. Er werd geopteerd voor niet-ijzerverzadigd ovoTF om een maximaal anti-bacterieel effect te bekomen (ijzer-sequestratie, direct bactericide effect en inhibitie van aanhechting en intrede).

#### **2.3. Proefopzet**

De experimenten werden uitgevoerd in negatieve druk isolatoren (IM 1500, Montair Sevenum, Nederland) met HEPA filters op de in- en uitlaat. Elk van de vier isolatoren huisvestte een groep van acht ‘specific pathogen free’ (SPF) kalkoenen (CNEVA, Ploufragan, Frankrijk). De kalkoenen werden eerst behandeld met een ovoTF aerosol alvorens, eveneens aërogeen, geïnfecteerd te worden met *Cp. psittaci*. Er werd gekozen voor deze leeftijd omdat op dit moment in de kalkoenbedrijven een eerste *Cp. psittaci* infectiedoorbraak wordt waargenomen door het verdwijnen van de maternale antistoffen (Van Loock *et al.*, 2005a). Zowel de ovoTF als de *Cp. psittaci* aerosol werden gedurende een uur toegediend met behulp van een Cirrus<sup>TM</sup> vernevelaar (2-5 µm aerosol partikelgrootte; Laméris, Aartselaar, België) verbonden met een membraanpomp (2 bar; VWR, Leuven, België). Groepen 1 en 2 kregen respectievelijk een eenmalige dosis van 10 en 5 mg ovoTF per dier (respectievelijk ‘High Dose’ en ‘Single Low Dose’ groep). Aan groep 3 werd een dagelijkse dosis van 5 mg ovoTF per dier toegediend gedurende twaalf opeenvolgende dagen (‘Multiple Low Dose’ groep).

Groep 4 (No OvoTF) was de onbehandelde positieve controlegroep en kreeg geen ovoTF toegediend, maar PBS. De ventilatie werd uitgeschakeld tijdens de ovoTF behandeling, maar nadien terug gedurende twee uur aangeschakeld. Vervolgens werden de dieren in een vernevelbox (40 cm x 40 cm x 80 cm) aerogeen geïnfecteerd met  $10^6$  TCID<sub>50</sub> van *Cp. psittaci* genotype D stam 92/1293 en gedurende 12 dagen post infectie (p.i.) opgevolgd, gebaseerd op een voorgaand onderzoek naar de pathogenese van *Cp. psittaci* in SPF kalkoenen (Vanrompay *et al.*, 1995b).

#### 2.4. Klinische symptomen en macroscopische letsels

Alle dieren werden dagelijks gecontroleerd op klinische symptomen tot op dag 12 p.i. en scores werden toegekend naargelang de ernst van de symptomen: score 0: geen klinische symptomen, score 1: conjunctivitis, score 2: rhinitis, score 3: ademnood, score 4: conjunctivitis en rhinitis, score 5: conjunctivitis en ademnood, score 6: rhinitis en ademnood, score 7: conjunctivitis, rhinitis en ademnood. Bacteriële excretie werd geëvalueerd aan de hand van faryngeale en cloacale swabs op dag 3, 6, 9 en 12 p.i. en de swabs (Fiers, Kuurne, België) werden bewaard in transportmedium bij -80°C tot aan de analyse. Op diezelfde dagen werden telkens twee dieren van elke groep geëuthanaseerd. Tijdens de lijkschouwing werden de macroscopische letsels bestudeerd (Tabel 5).

Tabel 5 Scoresysteem voor *Cp. psittaci* macroscopische letsels in kalkoenen.

Weefsel	Score 1	Score 2	Score 3
<b>Conjunctivae</b>	Licht gestuwd	Sterk gestuwd	Petechiae
<b>Conchae</b>	Licht gestuwd	Sterk gestuwd	Necrose
<b>Trachea</b>	Licht gestuwd	Matig gestuwd	Sterk gestuwd
<b>Longen</b>	Licht gestuwd	Sterk gestuwd	Grijze foci
<b>Thoracale luchtzakken</b>	Diffuse opaciteit	Focale fibrine afzettingen	Ernstige fibrineuze airsacculitis
<b>Abdominale luchtzakken</b>	Diffuse opaciteit	Weinig fibrine afzettingen	Ernstige fibrineuze airsacculitis
<b>Pericardium</b>	Sereuze pericarditis	Sero-fibrineuze pericarditis	Fibrineuze adhesieve pericarditis
<b>Milt</b>	Licht vergroot	Matig vergroot	Sterk vergroot
<b>Lever</b>	Licht vergroot	Matig vergroot	Sterk vergroot

Daarnaast werden weefselstalen van de conchae, de trachea, de longen, de abdominale en thoracale luchtzakken en de milt genomen om de aanwezigheid van chlamydiaal antigeen aan te tonen.

## 2.5. *Cp. psittaci* replicatie en excretie

Vriesweefselsneden (10  $\mu$ m) van de conchae, de trachea, de longen, de thoracale en abdominale luchtzakken en de milt werden onderzocht met behulp van de IMAGEN<sup>TM</sup> immunofluorescentiekleuring (IMAGEN<sup>TM</sup> CHLAMYDIA, Oxoid, Drongen, België) zoals voorheen werd beschreven (Vanrompay *et al.*, 1994). *Chlamydia* positieve cellen werden geteld in vijf ad random geselecteerde microscopische velden (400 x, Nikon Eclipse TE2000-E, Japan) en een score van 0 tot 4 werd toegekend: score 0 is een indicatie voor de afwezigheid van *Chlamydiae*, score 1 stelt een gemiddelde van 1-5 elementaire lichaampjes (infectieuze, niet-metabolische morfologische vorm) voor en score 2, 3 en 4 worden gegeven wanneer er respectievelijk gemiddeld 1-5, 6-10 en > 10 inclusie (actief replicerende organismen) positieve cellen aanwezig zijn.

Alle swabs werden onderzocht via cultivatie in Buffalo Green Monkey (BGM) cellen (Vanrompay *et al.*, 1992) en een IMAGEN<sup>TM</sup> immunofluorescentiekleuring. De aanwezigheid van *Cp. psittaci* werd gescoord zoals voor bacteriële replicatie in de verschillende weefsels (zie hierboven).

## 2.6. Statistische analyse

De Mann-Whitney test werd gebruikt voor statistische analyse. De resultaten werden als significant verschillend beschouwd bij  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTATEN

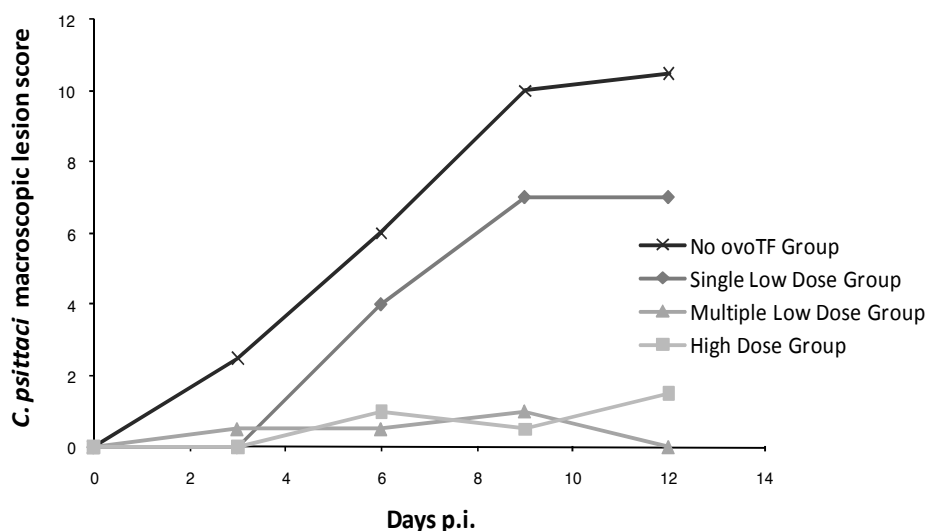
### 3.1. Klinische symptomen

Gedurende het ganse experiment werden ernstige klinische symptomen waargenomen in de niet behandelde groep (No OvoTF). De hoogste maximale klinische scores (score 5 tot 6) werden in deze groep waargenomen op dag 6, 9 en 12 p.i. Alle dieren vertoonden ademnood, conjunctivitis (oognijpen, met de kop zijdelings over de schouder wrijven, krabben) en/of rhinitis (hoofdschudden, niezen) en snakten soms naar adem (pompemde ademhaling). Zoals voor de No OvoTF groep, werden de hoogste maximale klinische scores (score 5 tot 6) op dag 6, 9 en 12 p.i. genoteerd. Alle dieren in deze groep vertoonden conjunctivitis en ademnood op dag 12 p.i. Geen enkele van de kalkoenen uit de Multiple Low Dose groep vertoonde klinische symptomen, behalve op dag 11 p.i. Op dat moment leden de twee overblijvende dieren aan milde ademnood. De volgende dag, op het moment van lijkschouwing, leken deze dieren klinisch gezond. Een maximale klinische score van 3 werd voor de High Dose groep

slechts op dag 12 p.i. genoteerd en die dag werden ook voor het eerst klinische symptomen waargenomen (milde ademnood).

### 3.2. Macroscopische letsels

De macroscopische letsels, voorgesteld als de som van de gemiddelde scores voor de verschillende weefsels van telkens twee dieren die geëuthanaseerd werden op dag 3, 6, 9 en 12 p.i., worden weergegeven in Figuur 4. Macroscopische letsels konden opgemerkt worden in de controledieren (No OvoTF) vanaf dag 3 p.i. tot op het einde van het experiment op dag 12 p.i. De hoogste score bij deze dieren (score 10.5) kon waargenomen worden op dag 12 p.i. met sterk gestuwde conjunctivae, conchae en trachea samen met pneumonie, fibrineuze adhesieve airsacculitis, sereuze pericarditis en heptosplenomegalie.



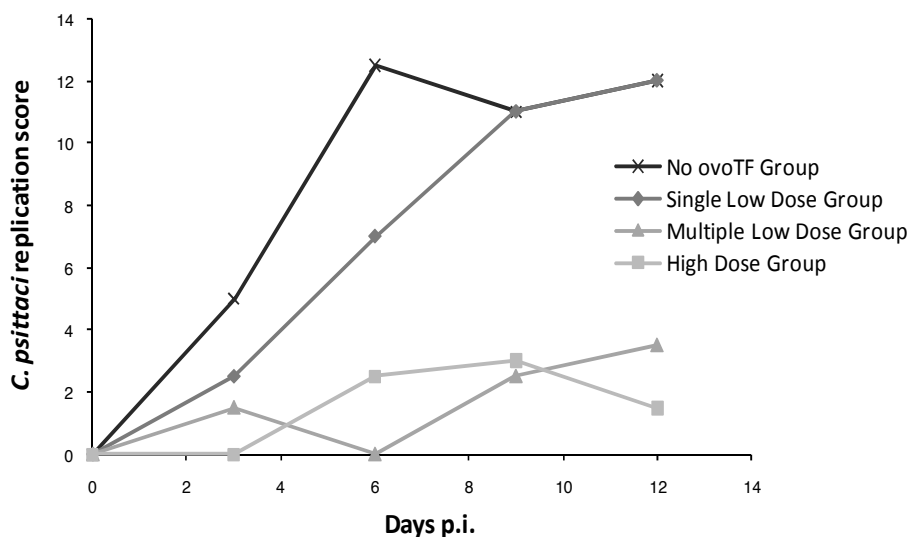
**Figuur 4** Scores voor *Cp. psittaci* macroscopische letsels. Elke score stelt de som voor van de gemiddelde scores voor de verschillende weefsels van telkens twee dieren van elke groep die geëuthanaseerd werden op dag 3, 6, 9 en 12 p.i.

Bij de High Dose groep kon de hoogste score (score 1.5) eveneens waargenomen worden op dag 12 p.i. hoewel er enkel een lichte stuwing van de conjunctivae en een matige stuwing van de longen kon opgemerkt worden. Ook bij de Single Low Dose groep kon op dag 12 p.i. de hoogste score waargenomen worden (score 7). Bij deze dieren werd een sterke stuwing van de conjunctivae en de conchae geobserveerd, samen met pneumonie, focale fibrine afzettingen in de luchtzakken en een matig vergrootte milt. De dieren van de Multiple Low Dose groep vertoonden daarentegen de hoogste score (score 1) op dag 9 p.i. met enkel een lichte stuwing van de conjunctivae en de longen. Er kon geen significant verschil geobserveerd worden

tussen de macroscopische letsels van de High Dose en de Multiple Low Dose groep, maar de letsels waren algemeen gezien minder ernstig dan deze van de Single Low Dose groep en de controlegroep.

### 3.3. *Cp. psittaci* replicatie en excretie

Figuur 5 toont de sommen van de gemiddelde scores van de directe immunofluorescentiekleuring van de vriesweefselcoupes van telkens twee dieren die geëuthanaseerd werden op dag 3, 6, 9 en 12 p.i. De No OvoTF en Single Low Dose groepen vertoonden de hoogste scores op dag 9 p.i. (score van 11) en dag 12 p.i. (score van 12), hoewel de scores voor de Single Low Dose groep op dag 3 en dag 6 p.i. lager waren. Herhaaldelijke toediening van ovoTF (Multiple Low Dose groep) resulteerde in afwezigheid van *Cp. psittaci* vermeerdering op dag 6 p.i. De infectie was echter niet overwonnen aangezien zowel de lagere als de hogere luchtwegen opnieuw positief waren op dag 9 en 12 p.i.



**Figuur 5** Aanwezigheid van *Cp. psittaci* in het ademhalingsstelsel. Elke score stelt de som voor van de gemiddelde scores van de directe immunofluorescentiekleuring van de vriesweefselcoupes van telkens twee dieren van elke groep, geëuthanaseerd op dag 3, 6, 9 en 12 p.i.

In de High Dose groep kon op dag 3 p.i. nog geen chlamydiale vermeerdering worden waargenomen, terwijl dit voor de andere groepen wel al het geval was. Kleuring van de vriesweefselcoupes van de High Dose groep en Multiple Low Dose groep resulteerde in significant lagere scores in vergelijking met de Single Low Dose groep en de No OvoTF groep, met respectievelijk de hoogste score op dag 9 (score van 3) en dag 12 p.i. (score van 3.5).

De faryngeale swabs van de High Dose, Single Low Dose en No OvoTF groepen waren positief op dag 3, 6, 9 en 12 p.i. Cloacale excretie kon in deze groepen nog steeds waargenomen worden op dag 12 p.i. (Tabel 6). Nochtans waren de isolatiescores van de High Dose groep significant lager dan voor de Single Low Dose groep en de No OvoTF groep. De Multiple Low Dose groep vertoonde de minste excretie aangezien faryngeale en cloacale swabs negatief werden, respectievelijk op dag 9 en dag 12 p.i.

**Tabel 6 Gemiddelde scores per groep (% positieve dieren/groep) voor faryngeale en cloacale *Cp. psittaci* excretie**

Groep	Faryngeale excretie				Cloacale excretie			
	Dagen post infectie				Dagen post infectie			
	3	6	9	12	3	6	9	12
<b>HD</b>	0.38 (38)	0.33 (33)	0.75 (75)	0.50 (50)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.50 (50)	1.00 (100)
<b>SLD</b>	0.88 (88)	1.00 (83)	1.25 (100)	1.50 (100)	0.00 (0)	1.00 (83)	0.75 (75)	1.50 (100)
<b>MLD</b>	0.5 (50)	0.67 (67)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.25 (25)	0.00 (0)
<b>NO</b>	0.5 (50)	1.33 (100)	1.50 (100)	1.00 (100)	0.00 (0)	0.67 (67)	1.25 (100)	1.50 (100)

HD: High Dose; SLD: Single Low Dose; MLD: Multiple Low Dose; NO: No OvoTF.

#### 4. DISCUSSIE

*Chlamydophila psittaci* infecties komen vaak voor bij kalkoenen, waar ze verantwoordelijk zijn voor economische verliezen en mogelijk ook een risico vormen voor de volksgezondheid. Op dit moment zijn er geen vaccins ter beschikking, en bijgevolg worden vaak antibiotica (tetracyclines, enrofloxacine) toegediend tijdens het kweekproces. In deze studie onderzochten we of het gebruik van ovotransferrine (ovoTF), een natuurlijk anti-microbieel eiwit, geschikt is om een experimentele *Cp. psittaci* infectie in Specifiek Pathogeen Vrije (SPF) kalkoenen te voorkomen. De dieren werden door middel van een aerosol geïnfecteerd omdat dit de natuurlijke manier van infectie op de bedrijven benadert. Immers, op deze manier komen de bacteriën zowel terecht in het ademhalingsstelsel als op de veren en in de ogen van de dieren. Dit laat toe dat de dieren ook verder geïnfecteerd kunnen worden door geïnfecteerd verenstof, naast inhalatie van nasaal of fecaal geëxcreteerde kiemen.

Verneveling van een éénmalige profylactische dosis van 10 mg ovoTF of een dagelijkse dosis van 5 mg ovoTF gedurende 12 opeenvolgende dagen resulteerde in een significante verlaging van klinische symptomen, macroscopische letsels en bacteriële replicatie en excretie in vergelijking met de niet-behandelde geïnfecteerde dieren.. Deze resultaten tonen aan dat ovoTF ook *in vivo* een anti-chlamydiaal effect heeft en vormen de basis voor verder

onderzoek naar het gebruik ervan op commerciële kalkoenbedrijven. Zo zou men ovoTF kunnen vernevelen bij drie tot vier weken oude kalkoenen, net op het moment dat de maternale *Cp. psittaci* antistoffen verdwijnen en een eerste infectiegolf op de bedrijven optreedt (Van Loock *et al.*, 2005a).

Het is zeer waarschijnlijk dat er verschillende biologische en immunomodulatoire mechanismen betrokken waren in het positief effect waargenomen volgend op toediening van ovotransferrine. Zoals vermeld in hoofdstuk 3A kan ovoTF (en/of OTAP-92) een antimicrobiële functie uitoefenen door membraanpermeabilisatie, destabilisatie van de buitenste membraan na binding met LPS, selectieve permeatie van ionen en/of destabilisatie en afbraak van het Type III secretiesysteem. Daarnaast is ovoTF ook het belangrijkste aviaire ‘acute phase protein’ (APP), wordt het significant opgereguleerd bij ontsteking en infectie (Hallquist & Klasing, 1994) en induceert het IL-6 vrijstelling door macrofagen en heterofielen (Xie *et al.*, 2002). In dit verband werd recent nog aangetoond dat lactoferrine eveneens immunomodulatoir zou werken: lactoferrine zou immers de aangeboren immuunrespons linken met de verworven immuunrespons via de maturatie van dendritische cellen (Spadaro *et al.*, 2008). Gezien de grote homologie tussen lactoferrine en ovotransferrine, kan voor ovotransferrine een gelijkaardige functie vermoed worden.

Wanneer men zowel het directe anti-chlamydiaal effect en de immunomodulatoire functies van ovoTF beschouwt, is het dan ook begrijpelijk dat de groep die een éénmalige hoge dosis van 10 mg ovoTF per kalkoen toegediend kreeg (High Dose groep), beter presteerde in het begin van het experiment (dag 3 p.i.), in vergelijking met de groep die een dagelijkse dosis van 5 mg ovoTF per kalkoen kreeg gedurende 12 dagen (Multiple Low Dose groep). Deze laatste groep gaf echter betere resultaten naar het einde van het experiment toe. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de herhaalde toediening van ovoTF het immuunsysteem aanwakkerde, bacteriën op de veren afdoodde en infectie door contact met de andere dieren in de groep en geïnfecteerd verenstof inhieerde. Een éénmalige dosis van 5 of 10 mg ovoTF kon echter geen herinfectie verhinderen.

## 5. CONCLUSIE

Deze studie toont het anti-chlamydiaal effect aan van ovotransferrine in SPF kalkoenen aan en impliceert de mogelijkheid om dit natuurlijk anti-microbieel eiwit aërogeen toe te dienen aan pluimvee ter preventie van *Cp. psittaci* infecties in commerciële pluimveebedrijven. Verder onderzoek naar praktische toedieningswijzen is echter aangewezen.

## **C. Anti *Cp. psittaci* effect van transferrines – evaluatie op een kalkoenbedrijf**

### **1. INLEIDING**

Op pluimveebedrijven worden de dieren bij aankomst vaak een aantal dagen profylactisch behandeld met antibiotica zoals enrofloxacin of tetracyclines, om op die manier het multifactorieel respiratoir complex het hoofd te bieden. Desondanks worden uitbraken van ademhalingsziekten (o.a. *Cp. psittaci*, ORT, aMPV) waargenomen later in de kweekronde (Van Looek *et al.*, 2005a). Gezien het feit dat tetracyclines aangewezen zijn voor de behandeling van chlamydiosis en de Europese Gemeenschap het plan heeft opgevat om het gebruik van tetracyclines in kalkoenen te verbieden (persoonlijke mededeling Eurovet Animal Health, Nederland, 2009), dienen nieuwe strategieën ontwikkeld te worden om *Cp. psittaci* infecties in kalkoenen te vermijden of in te perken.

In het eerste deel van dit hoofdstuk bleek dat ovotransferrine (ovoTF) het meest effectieve transferrine was ter preventie van een *Cp. psittaci* infectie in HD11 cellen (Beeckman *et al.*, 2007). Een daaropvolgend *in vivo* experiment met SPF kalkoenen in negatieve druk isolatoren toonde aan dat een éénmalige verneveling van 10 mg ovoTF per dier en een dagelijkse toediening van 5 mg ovoTF per dier gedurende 12 opeenvolgende dagen resulteerde in een statistisch significante reductie van klinische symptomen, macroscopische letsels en *Cp. psittaci* replicatie en excretie (van Droogenbroeck *et al.*, 2008). Vervolgens onderzochten we de toepasbaarheid van ovoTF-verneveling op een Belgisch kalkoenbedrijf ter preventie van *Cp. psittaci* uitbraken. Tegelijkertijd werd ook het effect van ovoTF-verneveling op het voorkomen van ORT en aMPV geëvalueerd.

### **2. MATERIAAL EN METHODEN**

#### **2.1. Bedrijfsmanagement**

De profylactische toediening van ovoTF werd geëvalueerd op een kalkoenbedrijf in Lichtervelde, West-Vlaanderen. Op het bedrijf werden British United Turkey (BUT) Big-6 kuikens van Franse leghennen opgekweekt in drie stallen. Tijdens de voorbije kweekrondes werden telkens ademhalingsproblemen waargenomen, waarbij de gemiddelde mortaliteit bij de hennen 6.5% bedroeg en bij de hanen opliep tot gemiddeld 11%. Volgens de bedrijfsleider waren de hanen ook gevoeliger voor ademhalingsproblemen. Bovendien dienden zowel de hennen als de hanen telkens met antibiotica behandeld te worden (de gemiddelde kostprijs bedroeg 5000 € per kweekronde).



Het bedrijf hanteerde een ‘all-in all-out’ management schema, met een sanitaire periode van twee weken tussen slachting en aanvang van een nieuwe kweekronde. In deze periode werden de stallen geпоetst en gedesinfecteerd met formalin 40% + MS Megades (Schipper, Bladel, Nederland) waarbij gebruik gemaakt werd van een MS Powermister (Schipper). Hennen en hanen werden in dezelfde geklimatiseerde stal gehuisvest in twee afgescheiden groepen tot de leeftijd van vier weken. Daarna werden de hennen en hanen gescheiden verder opgekweekt in aanpalende stallen, tot slachting op de leeftijd van 15 of 17 weken, respectievelijk. De bedrijfsleider verschafte informatie over klinische symptomen (dagelijkse monitoring), mortaliteit en toegepaste medische behandelingen. De dieren waren negatief voor *Salmonella*. Alle dieren werden gevaccineerd tegen zowel aviaire metapneumovirus (aMPV) (Nobilis<sup>®</sup> RTV 8544, subtype A stam, Intervet, Boxmeer, Nederland) als Newcastle Disease (NCD) (Nobilis<sup>®</sup> ND LaSota, Intervet) op de leeftijd van 1 dag en 4 weken. De NCD boostervaccinatie zou normalerwijze op de leeftijd van drie weken worden uitgevoerd, maar werd nu met één week uitgesteld om een mogelijk inhibitorische werking van ovoTF op het vaccin te vermijden. Net zoals bij de vorige kweekrondes kregen de kuikens gedurende vier dagen enrofloxacin (Enroxil<sup>®</sup>, Eurovet, Bladel, Nederland) oraal toegediend (0.5 l in 1000 l water) als profylactische maatregel tegen bacteriële infecties.

## 2.2. Experimentele opzet van beide klinische studies

Uit voorgaand onderzoek weten we dat Belgische kalkoenbedrijven twee *Cp. psittaci* uitbraken doormaken tijdens een kweekronde, op de leeftijd van drie tot zes weken en acht tot 12 weken (Van Loock *et al.*, 2005a). We besloten daarom twee afzonderlijke klinische studies uit te voeren op hetzelfde kalkoenbedrijf. Aangezien de bedrijfsleider voorheen meer problemen had met de hanen, werden deze opgevolgd voor klinische symptomen en aanwezigheid van *Cp. psittaci*.

Gedurende de eerste klinische proef (herfst-winter), werden 13 300 kalkoenen opgekweekt op het bedrijf. De eerste vier weken werden de hennen en hanen (elk 6650 dieren) in twee aparte delen van stal 1 gehuisvest. De gemiddelde dichtheid van de dieren bedroeg drie per m<sup>2</sup> voor de hanen en 6 per m<sup>2</sup> voor de hennen. De omgevingstemperatuur werd ingesteld op 34 tot 35 °C, en geleidelijk aan verlaagd tot 20 °C in de tweede week en 18 °C in de vierde week van de kweekronde. In overeenstemming met de wetgeving werd zowel natuurlijke als mechanische ventilatie voorzien.

Vanaf de leeftijd van 2 weken werd aan de kalkoenen gedurende 12 opeenvolgende dagen (tot de leeftijd van 3.5 week) een ovoTF (Fordras, Lugano, Zwitserland) aerosol toegediend aan een dosis van 5 mg ovoTF per dier met behulp van een Atomist 1026 vernevelaar (Desvac, Pellouailles-les-Vignes, Frankrijk). Dit toetstel creëert druppels met een diameter van 50  $\mu\text{m}$  en werd door de bedrijfsleider de ganse stal rondgedragen.

Op de eerste dag van het experiment werden 24 willekeurig gekozen hanen gemerkt met een genummerde pootring en blauwe verf om snelle identificatie toe te laten, aangezien ze vrij rondliepen tussen de andere dieren. Van de kalkoenen werden faryngeale swabs (1 voor isolatie en 1 voor PCR) en bloedstalen (voor antistofbepaling) afgenomen op dag 2, week 2 en week 3.5 van het experiment. In de vierde week werden de hanen overgeplaatst naar de aanpalende stal 2, en van de gemerkte dieren werden stalen genomen op week 6, week 10 en week 15. Alle serumstalen werden getest voor een drie- tot viervoudige stijging van de antistoftiter tegen aMPV en ORT. Bij seroconversie werd getracht aMPV en ORT te detecteren en karakteriseren uitgaande van faryngeale swabs.

Op dezelfde dagen als de staalnames bij de dieren werden van de bedrijfsleider en van de twee onderzoekers faryngeale swabs voor isolatie en PCR afgenomen, net als op dag 0, de dag vóór de kuikens in de stal werden geplaatst. Daarnaast werden er eveneens luchtstalen genomen om de aanwezigheid van *Cp. psittaci* aan te tonen in de lucht: in stal 1 op dag 0 (gepoetste en gedesinfecteerde stal), dag 2 (één dag na de aankomst van de kuikens), week 2 en 3.5. Omdat de hanen in de vierde week werden verplaatst naar stal 2, werden daar de volgende luchtstalen genomen: op week 3.5 (gepoetste en gedesinfecteerde stal) en week 6, 10 en 15. In Tabel 7A wordt een overzicht gegeven van alle staalnames tijdens de eerste klinische proef.

Gedurende de tweede klinische proef (lente-zomer) werden 23 000 dieren opgekweekt op het bedrijf. De experimentele opzet was gelijkaardig aan deze van de eerste klinische proef. Volgende aanpassingen werden echter doorgevoerd: 1) Drie groepen (één van 4 000 hanen, één van 10 000 hanen en één van 9 000 hennen) werden opgekweekt in stal 1 gedurende de eerste vier weken van het experiment, 2) tijdens de eerste toedieningsperiode van ovoTF (week 2 tot week 3.5) werd enkel de groep met 4 000 hanen, in een apart deel van de stal, behandeld met de Atomist 1026 ovoTF aerosol, 3) De dieren werden niet individueel gemerkt, maar voor elke staalname werden willekeurig 24 kalkoenen geselecteerd uit de ovoTF behandelde groep, 4) op vier weken leeftijd werden de ovoTF behandelde hanen ( $n = 4\,000$ ) verplaatst naar stal 2, de niet-behandelde hanen verhuisden ( $n = 10\,000$ ) naar stal 3 en de niet-behandelde hennen ( $n = 9\,000$ ) bleven in stal 1, 5) de ovoTF behandelde dieren in stal 2

kregen een tweede ovoTF behandeling van week 8 tot 9.5 (dagelijkse toediening gedurende 12 dagen) en werden verder opgevolgd zoals in experiment 1, 6) extra staalnames werden uitgevoerd op week 8, 9.5 en 12 om het tijdstip van infectie nauwkeuriger te kunnen bepalen. In Tabel 7B wordt een overzicht gegeven van alle staalnames tijdens de tweede klinische proef.

Deze klinische proeven werden goedgekeurd door het Veterinair Ethisch Comité van de Universiteit Gent, het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) en het Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten (FAGG).

### 2.3. Stalen

Alle dieren werden gecontroleerd op klinische symptomen. Faryngeale swabs voor isolatie werden bewaard in Chlamydia transportmedium (74.6 g/l sucrose, 5.1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.9 g/l L-glutaminezuur monokaliumzout, 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicine, 10% v/v FCS 100  $\mu\text{g/ml}$  vancomycine, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycine, 25 000 U/ml nystatine) bij  $-80^\circ\text{C}$ . De swabs werden gedurende 1 uur geschud bij  $4^\circ\text{C}$ , en vervolgens afgedraaid (10 min,  $2\ 790 \times \text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). De supernatansen werden opgeslagen bij  $-80^\circ\text{C}$  tot isolatie op celcultuur.

Faryngeale swabs for *C. psittaci*, ORT en aMPV PCR werden aangevuld met met 2 ml DNA stabilisatiebuffer (Roche), geschud gedurende 1 uur bij kamertemperatuur, waarna DNA extractie volgde zoals beschreven door Van Loock *et al.* (2005b). Alle stalen werden bij  $-80^\circ\text{C}$  bewaard tot PCR. De humane stalen werden op dezelfde manier als de kalkoenstalen verwerkt.

Bij de dieren werd bloed afgenomen door venipuncture van de vleugelvene en overnacht bij kamertemperatuur bewaard. Na centrifugatie ( $300 \times \text{g}$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) werd het serum voorbehandeld met kaolin (zie hoger), en bewaard bij  $-20^\circ\text{C}$  tot ELISA voor de detectie van antistoffen tegen *Cp. psittaci*, ORT en aMPV.

Bioaerosol monitoring werd uitgevoerd met een MAS-100 EcoSampler (Merck) in combinatie met het ChlamyTrap collectiemedium (van Droogenbroeck *et al.*, 2009). De MAS-100 EcoSampler werd gebruikt aan een lichtsnelheid van 100 l/min gedurende 10 min. De luchtstalen werden gedurende 1 uur geültracentrifugeerd aan  $45\ 000 \times \text{g}$  bij  $4^\circ\text{C}$  en de pellet werd opgelost in 500  $\mu\text{l}$  transportmedium.

Tabel 7 Overzicht van de experimentele set-up van de eerste en tweede klinische proef.

A.	Staaltype	Tijds punten								
		Dag 0	Dag 2	Week 2	Week 3.5	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12	Week 15
<b>3 mensen</b>	Faryngeale swab	X	X	X	X	X	NT	X	NT	X
<b>24 hanen</b>	Faryngeale swab	<sup>b</sup>	X	X	X	X	NT	X	NT	X
	Bloedstaal	/	X	X	X	X	NT	X	NT	X
<b>Stal 1<sup>a</sup></b>	Luchtstaal	X	X	X	X	NT	NT	NT	NT	NT
<b>Stal 2</b>	Luchtstaal	NT <sup>c</sup>	NT	NT	X	X	NT	X	NT	X
<b>OvoTF stal 1</b>				START	STOP					
B.		Dag 0	Dag 2	Week 2	Week 3.5	Week 6	Week 8	Week 9.5	Week 12	Week 15
<b>3 mensen</b>	Faryngeale swab	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>24 hanen</b>	Faryngeale swab	<sup>b</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X
	Bloedstaal	/	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Stal 1<sup>a</sup></b>	Luchtstaal	X	X	X	X	NT	NT	NT	NT	NT
<b>Stal 2</b>	Luchtstaal	NT <sup>c</sup>	NT	NT	NT*	X	X	X	X	X
<b>OvoTF stal 1<sup>**</sup></b>				START	STOP					
<b>OvoTF stal 2</b>							START	STOP		

<sup>a</sup> Hennen en hanen werden samen gehuisvest tot de leeftijd van vier weken in stal 1. Vervolgens werden de hanen overgebracht naar stal 2.

<sup>b</sup> /: Geen staalname op dag 0 omdat de kuikens slechts op dag 1 van het experiment aankwamen.

<sup>c</sup> NT: Niet getest.

\* Niet getest, omdat de stal nog niet volledig klaar was toen we het bedrijf op 3.5 weken bezochten.

\*\* Enkel het eerste compartiment van stal 1, met 4 000 hanen, werd behandeld.

#### 2.4. *Cp. psittaci* isolatie en moleculaire karakterisatie

Alle swabs werden onderzocht via cultivatie in Buffalo Green Monkey (BGM) cellen (Vanrompay *et al.*, 1992) en een IMAGEN<sup>TM</sup> immunofluorescentiekleuring. De aanwezigheid van *Cp. psittaci* werd gescoord zoals beschreven in hoofdstuk 2A, paragraaf 2.5.

*Cp. psittaci* isolaten werden verder gekarakteriseerd door middel van een *Cp. psittaci ompA* genotype-specifieke real-time PCR (Geens *et al.*, 2005b) en een *ompA* genotyperende microarray (Sachse *et al.*, 2008).

#### 2.5. Antistofrespons

De diersera werden getest in een in-house ELISA op basis van het *Cp. psittaci* major outer membrane protein (MOMP) (Verminnen *et al.*, 2006). Anti-MOMP immunoglobuline titers werden voorgesteld als de reciproke waarde van de hoogste serumverduunning die een optische densiteit (OD<sub>450</sub>) waarde gaf hoger dan de cut-off waarde. De cut-off waarde werd bepaald als de gemiddeld absorptantie van seronegatieve kalkoerstalen opgeteld met twee maal de standaardafwijking (SD).

De aanwezigheid van anti-ORT antistoffen werd getest met een commerciële ELISA, de IDEXX ORT ELISA (Flocktest kit, IDEXX, Liebefeld-Bern, Zwitserland), volledig zoals voorgeschreven door de fabrikant. Een gelijkaardige test werd gebruikt voor het testen van de sera op anti-aMPV antistoffen, IDEXX aMPV ELISA (Flocktest kit, IDEXX).

#### 2.6. ORT en aMPV detectie met PCR

Faryngeale swabs werden getest op de aanwezigheid van ORT 16S rDNA met behulp van primers ontwikkeld door Hung & Alvarado (2001) aan een eindconcentratie van 100 nM, waarbij een fragment van 78 bp geamplificeerd werd. Na een initiële denaturatie bij 95 °C, werden 35 cycli uitgevoerd (1 min denaturatie bij 95 °C, 1 min annealing bij 52 °C en 1 min elongatie bij 72 °C). Een finale extensiestap werd uitgevoerd door de stalen 5 min bij 72 °C te plaatsen. PCR producten werden gescheiden op een 1% SeaKem agarose gel (Cambrex Bio Science, USA) aan 100 V en gekleurd met ethidium bromide.

aMPV DNA werd gedetecteerd aan de hand van een eerder beschreven real-time RT-PCR (Guionie *et al.*, 2007), daarbij gebruik makend van de TaqVet<sup>TM</sup> aMPV A-C RRT-PCR kit ontwikkeld door Laboratoire Service International, voor de detectie van subgroepen A, B en C. Subgroep D werd gedetecteerd door het opzetten van een extra reactie met primers en probes ontwikkeld door Guionie *et al.* (2007). Primers en Taqman<sup>®</sup> probes zijn gebaseerd op

de geconserveerde regio's van de nucleotide sequenties van de G genen voor aMPV-A, -B en -D virussen en het SH gen van aMPV-C virussen.

### 3. RESULTATEN

#### 3.1. Eerste klinische studie

##### 3.1.1. Verloop van de kweekronde

Aan de hand van een longitudinale studie volgden we de aanwezigheid van *Cp. psittaci*, ORT en aMPV in hanen. In deze eerste klinische studie, waarbij dagelijks ovoTF werd toegediend van week 2 tot week 3.5 van de kweekronde, vertoonden de dieren geen klinische symptomen tot de leeftijd van negen weken. Dit is in sterk contrast met de voorgaande kweekronde, waar de dieren ademhalingsymptomen vertoonden op week 2 en 3, en behandeld werden met Soludox 50%® (Eurovet, Nederland) om de mortaliteit te beperken. Op negen weken in de huidige opzet schudden 20% van de hanen sporadisch met hun hoofd en vertoonden ze neussecreties. Tien, 15, 49, 53 en 19 hanen stierven in de weken 9-10, 10-11, 11-12 en 12-13, wat betekent dat de mortaliteit verdriedubbelde tussen week 10 en 12. De hanen werden onmiddellijk (leeftijd van 9 weken) behandeld met doxycycline (Soludox 50%®) via het drinkwater aan volgend regime: vijf dagen aan 10 mg/kg per dag, gevolgd door vijf dagen aan 20 mg/kg per dag. Ondertussen werd door Diergezondheidszorg Vlaanderen (Torhout, Belgium) een etiologische diagnose gesteld, waarbij ORT en *Escherichia coli* naar voor geschoven werden als de oorzaak van de uitbraak. Behandeling met doxycycline resulteerde echter niet in een merkbare verbetering van de gezondheidstoestand van de dieren. Daarom werd een behandeling met enrofloxacin (Enroxil 10%®, Eurovet) ingesteld aan een dosis van 0.5 l / 1000 l gedurende vijf dagen. De klinische situatie van de dieren verbeterde vanaf de leeftijd van 12 weken, maar vijf tot 10% van de dieren bleef niezen tot het moment van slachting.

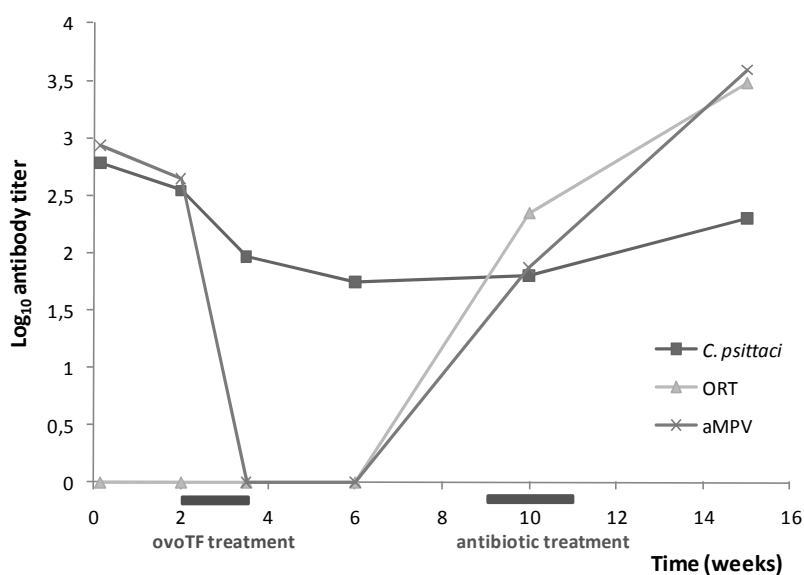
De hennen, eveneens behandeld met ovoTF van week 2 tot week 3.5 in stal 1, bleven klinisch gezond tot week 8 van de kweekronde, maar de daaropvolgende week stierven 110 dieren. Vervolgens werd een behandeling met doxycycline (Soludox 50%®, vijf dagen, 10 mg/kg per dag) ingesteld, waarna het aantal dode dieren daalde tot vier in week 9-10.

De gemiddelde sterftegraad in hennen en hanen voor deze kweekronde bedroeg respectievelijk 10 en 15%. Dit was merkkelijk hoger in vergelijking met vorige kweekrondes (respectievelijk 6.5 en 11%), maar kan verklaard worden doordat een deel van de hennen en hanen per ongeluk stikten op dag 2 van de opzet. De bedrijfsleider was echter overtuigd van

de positieve invloed als gevolg van de ovoTF behandeling, en was dan ook bereid om deel te nemen aan een tweede klinische proef waarbij de dieren behandeld werden gedurende week 2-3.5 en 8-9.5.

### 3.1.2. *Chlamydophila psittaci*

De twee-dagen-oude kuikens hadden hoge maternale antistof titers tegen *Cp. psittaci* (Figuur 6 en Tabel 8). Het percentage seropositieve dieren bleef min of meer constant vanaf dag 2, maar de gemiddelde antistoftiters daalden tot week 6. Deze daling was beperkt maar gestaag, wat wijst op een continue stimulatie van het immuunsysteem. Tussen week 10 en week 15 kon serologisch een *Cp. psittaci* uitbraak worden waargenomen, aangezien er een drievoudige stijging was in de antistoftiters tussen deze twee tijdstippen. Bovendien steeg ook het aantal seropositieve dieren in deze periode.



**Figuur 6** Gemiddelde serologische respons van de kalkoenen tegen *Cp. psittaci*, ORT en aMPV tijdens de eerste klinische studie. De balkjes stellen de periodes van ovoTF en antibioticumbehandeling voor.

Levende bacteriën konden geïsoleerd worden uit de faryngeale swabs afgenomen op dag 2 en week 2 en 3.5, waarbij respectievelijk 24%, 48% en 58% van de 24 kalkoenen positief testten (Tabel 8). Ondanks de hoge maternale antistoftiters, kon dus al op dag 2 zowel *Cp. psittaci* antigeen als DNA worden teruggevonden. Het percentage positieve swabs verdubbelde 24% op dag 2 tot 48% op de leeftijd van 2 weken, en bijna alle kalkoenen werden seropositief. Op week 6 en 10 konden geen levende bacteriën worden geïsoleerd. In de laatste week van de

studie werden 12.5% van de dieren opnieuw cultuurpositief. Moleculaire karakterisatie van de isolaten bracht aan het licht dat de *Cp. psittaci* stam op het bedrijf een *ompA* genotype A had. Alle humane faryngeale stalen waren negatief in isolatie, behalve deze van onderzoeker 2, genomen tijdens week 2 van de kweekronde. Deze persoon voelde zich niet ziek, en werd opnieuw cultuurnegatief op week 3.5.

Door middel van bioaerosolmonitoring konden levende *Cp. psittaci* kiemen in de lucht worden aangetoond op dag 2 en week 3.5, 10 en 15, waarbij de hoogste scores werden waargenomen in week 10 en 15 van de kweekronde. De luchtstalen genomen op dag 0 en week 2 konden niet beoordeeld worden als gevolg van schimmelgroei op de BGM monolagen, en daardoor kon het effect van ovoTF verneveling op *Cp. psittaci* in de lucht dus niet bepaald worden. In de lucht van de geïmplanteerde en gedesinfecteerde lege stal 2 konden ook levende kiemen worden teruggevonden, amper een halve week vóór de hanen naar deze stal zouden verplaatst worden.

### 3.1.3. aMPV en ORT

De hanen hadden maternale antistoffen tegen aMPV op dag 2, maar deze konden niet meer gedetecteerd worden in week 3.5 van de studie (Figuur 6 en Tabel 8). In de eerste week maskeerden de maternale antistoffen mogelijk de aMPV primo-vaccinatie titers. Er kon geen serologische indicatie van de booster-vaccinatie worden waargenomen aangezien de dieren seronegatief bleven tot week 6 van de kweekronde. Anti-aMPV antistoffen konden pas in de tiende week worden aangetoond, en zowel de gemiddelde titer als het aantal seropositieve dieren steeg verder naar het einde van de studie toe. Ondanks de hogere antistoftiters kon geen aMPV gedetecteerd worden in de faryngeale swabs die afgenomen werden in week 6, 10 en 15. Gezien de hoge antistoftiters, in overeenstemming met eerdere klinische studies op Belgische kalkoenbedrijven (Van Looek *et al.*, 2005a), vermoeden we dat de geobserveerde seroconversie tussen 6 en 10 weken het gevolg was van een aMPV infectie.

Geen enkele van de gemerkte hanen had maternale antistoffen tegen ORT en alle bleven seronegatief tot de leeftijd van 6 weken (Figuur 6). Gelijkaardig als wat geobserveerd werd voor aMPV, konden anti-ORT antistoffen voor de eerste maal gedetecteerd worden in de tiende week van de kweekronde, waarna zowel de gemiddelde titer als het aantal seropositieve dieren verder steeg. Deze stijging was het gevolg van een uitbraak, zoals gediagnosticeerd door Diergezondheidszorg Vlaanderen (Torhout) op de leeftijd van 9 weken en door middel van een 16S rDNA-gebaseerde PCR op de leeftijd van 10 weken. Deze ORT PCR was negatief op het einde van de klinische studie.



Tabel 8 Resultaten van de diagnose voor *Cp. psittaci*, ORT en aMPV tijdens de eerste klinische studie.

<i>Cp. psittaci</i>	Staal / test	Tijds punten								
		Dag 0	Dag 2	Week 2	Week 3.5	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12	Week 15
<b>Bedrijfsleider</b>	Faryngeale swab	-	-	-	-	-	NT <sup>d</sup>	-	NT	-
<b>Onderzoeker 1</b>	Faryngeale swab	-	-	-	-	-	NT	-	NT	-
<b>Onderzoeker 2</b>	Faryngeale swab <sup>a</sup>	-	-	+(1)	-	-	NT	-	NT	-
<b>24 gemerkte hanen</b>	Faryngeale swab <sup>b</sup>	/ <sup>c</sup>	+(0.24)	+(0.71)	+(0.93)	-	NT	-	NT	+(0.20)
	% positieve swabs	/	24	48	58	0	NT	0	NT	12.5
	<i>OmpA</i> genotype	/	A	A	A	NA <sup>e</sup>	NT	NA	NT	A
	Antistoftiter	/	607.5	334.3	92.7	55.3	NT	63.0	NT	201.0
	(± SD)		± 596.2	± 302.0	± 78.0	± 35.0		± 56.7		± 114.0
	% positieve sera	/	100	95	100	89	NT	90	NT	100
<b>Stal 1</b>	Luchtstaal	Fungae	+(1)	Fungae	+(1)	NT	NT	NT	NT	NT
<b>Stal 2</b>	Luchtstaal	NT	NT	NT	+(1)	-	NT	+(2)	NT	+(3)
<b>ORT</b>		<b>Dag 0</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Week 2</b>	<b>Week 3.5</b>	<b>Week 6</b>	<b>Week 8</b>	<b>Week 10</b>	<b>Week 12</b>	<b>Week 15</b>
<b>24 gemerkte hanen</b>	Antistoftiter	/	0.0	0.0	0.0	0.0	NT	220.9	NT	2965.2
	(± SD)		± 0.0	± 0.0	± 0.0	± 0.0		± 898.6		± 3037.6
	% positieve sera	/	0	0	0	0	NT	15	NT	86
	PCR	-	-	-	-	-	NT	+	NT	-
<b>aMPV</b>		<b>Dag 0</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Week 2</b>	<b>Week 3.5</b>	<b>Week 6</b>	<b>Week 8</b>	<b>Week 10</b>	<b>Week 12</b>	<b>Week 15</b>
<b>24 gemerkte hanen</b>	Antistoftiter	/	850.2	433.5	0.0	0.0	NT	73.3	NT	3898.9
	(± SD)		± 1515.4	± 903.7	± 0.0	± 0.0		± 184.5		± 2761.3
	% positieve sera	/	47	43	0	0	NT	20	NT	95
	PCR (subtype)	-	-	-	-	-	NT	-	NT	-

<sup>a</sup>Isolatiescores vermeld tussen haakjes.<sup>b</sup>Gemiddelde isolatiescores vermeld tussen haakjes.<sup>c</sup>/: Geen staalname op dag 0 omdat de kuikens op dag 1 van het experiment aankwamen.<sup>d</sup>NT: Niet getest.<sup>e</sup>NA: Niet van toepassing.

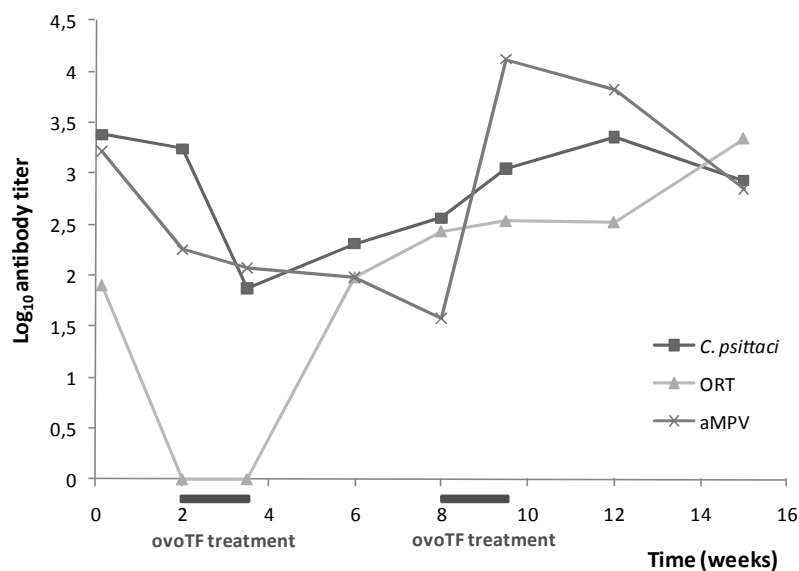
### 3.2. Tweede klinische studie

#### 3.2.1. Verloop van de kweekronde

Tijdens de tweede klinische proef werd ovoTF toegediend van week 2 tot 3.5 en van week 8 tot week 9.5. De behandelde hanen vertoonden geen ademhalings symptomen van dag 1 tot week 17, het moment van slachting. De niet behandelde hanen in stal 3 en de hennen in stal 1 dienden behandeld te worden met Soludox 50%<sup>®</sup> in week 2-3, en met Enroxil 10%<sup>®</sup> in week 8-9 om ademhalings symptomen te onderdrukken. De gemiddelde mortaliteit in de ovoTF behandelde hanen was 6.8%, terwijl dit 10% bedroeg bij de niet-behandelde dieren (zowel hanen als hennen). Algemeen kan dus gesteld worden dat de sterftegraad in de ovoTF behandelde hanen significant lager was dan de gemiddelde sterftegraad in hanen bij vorige kweekrondes (11%). De bedrijfsleider was zeer tevreden met de bekomen resultaten en zou graag alle hanen en hennen met ovoTF behandelen tijdens volgende kweekrondes.

#### 3.2.2. *Chlamydophila psittaci*

Zoals eerder al geobserveerd werd in de eerste klinische proef, kon de aanwezigheid van maternale antistoffen geen bescherming bieden tegenover een *Cp. psittaci* infectie. Immers, het percentage positieve swabs was meer dan verdubbeld op week 2 in vergelijking met dag 2. Serologisch kon een *Cp. psittaci* uitbraak gedetecteerd worden van week 3.5 tot 6 en van week 8 tot 9.5 (telkens meer dan drievoudige stijging van de gemiddelde antistoftiters, Figuur 7 en Tabel 9). Het percentage positieve swabs daalde echter in de periode tussen 3.5 en week 9.5 en de dieren verkeerden schijnbaar in goede gezondheid. Het totale aantal dieren dat tussen de start van de kweekronde en week 9.5 stierf bedroeg 53 (1.3%). Op alle tijdstippen, behalve week 9.5 (einde van de tweede ovoTF toediening), konden levende bacteriën worden geïsoleerd uit faryngeale dierswabs, maar het percentage *Cp. psittaci* positieve swabs daalde significant na elke ovoTF vernevelingsreeks. Het percentage positieve serumstalen bleef echter relatief constant (95-100%). Het totale aantal hanen dat stierf tussen de leeftijd van 9.5 week tot aan de slachting (17 weken) was 222 (5.5%). Moleculaire karakterisatie op 15 weken typeerde de *Cp. psittaci* infectie als *ompA* genotype D. De genotyperende micro-array gaf echter geen resultaat voor stalen die positief waren in nested PCR (week 6, 8 en 12). Alle humane faryngeale stalen waren negatief in isolatie, behalve deze van de bedrijfsleider tijdens de eerste twee weken van de kweekronde (isolatiescore 1), maar deze voelde zich niet ziek. In alle luchtstalen genomen tijdens deze klinische studie konden levende kiemen worden teruggevonden, zelfs in deze van dag 0, de dag voor de dieren de stal binnenkwamen.



**Figuur 7** Gemiddelde serologische respons van de kalkoenen tegen *Cp. psittaci*, ORT en aMPV tijdens de tweede klinische studie. De balkjes stellen de periodes van ovoTF behandeling voor.

### 3.2.3. aMPV en ORT

Net als in de eerste klinische studie hadden de dieren hoge anti-aMPV antistoftiters op dag 2 van de kweekronde, die bijna volledig verdwenen op de leeftijd van 3.5 weken. (Figuur 7 en Tabel 9). Waarschijnlijk werden ook hier de primo-vaccinatie antistoffen gemaskeerd door de aanwezige maternale antistoffen. De boostervaccinatie werd niet weerspiegeld in de serologie aangezien de antistoftiters verder daalden tot week 8 van de kweekronde. Seroconversie had plaats in de periode tussen week 8 en week 9.5 (350-voudige stijging in antistoftier), wat wijst op een aMPV infectie. Daarna kon een snelle daling van de antistoftiter worden waargenomen. De aMPV infectie werd door PCR op faryngeale swabs (week 8) getypeerd als een subtype B infectie. De kalkoenen vertoonden echter geen ademhalingsproblemen en werden bijgevolg ook niet behandeld. Het aantal dieren dat per week stierf bleef bovendien constant (7 hanen in week 8-9 en 9 hanen in week 9-10).

Voor ORT kon seroconversie waargenomen worden tussen week 6 en 8 en tussen week 12 en 15 (respectievelijk 3- en 7-voudige stijging in antistoftiter). De infectie werd ook hier bevestigd in PCR op faryngeale swabs genomen op 6, 8 en 12 weken. Swabs genomen in week 9.5 en 15 waren PCR negatief. Seroconversie voor ORT ging niet gepaard met klinische symptomen. Een licht verhoogde mortaliteit kon echter wel geobserveerd worden in week 6-7 en week 13-14. Ook voor deze infectie werden de dieren niet behandeld met medicatie.

Tabel 9 Resultaten van de diagnose voor *Cp. psittaci*, ORT en aMPV tijdens de tweede klinische studie.

<i>Cp. psittaci</i>	Staal / test	Tijds punten								
		Dag 0	Dag 2	Week 2	Week 3.5	Week 6	Week 8	Week 9.5	Week 12	Week 15
<b>Bedrijfsleider</b>	Faryngeale swab <sup>a</sup>	-	+(1)	+(1)	NT <sup>d</sup>	-	-	-	-	-
<b>Onderzoeker 1</b>	Faryngeale swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Onderzoeker 2</b>	Faryngeale swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>24 niet-gemerkte hanen</b>	Faryngeale swab <sup>b</sup>	/ <sup>c</sup>	+(0.25)	+(0.69)	+(0.31)	+(0.13)	+(0.38)	-	+(0.17)	+(0.10)
	% positieve swabs	/	21	54	29	8	13	0	13	8
	<i>OmpA</i> genotype	/	NT	NT	NT	NR <sup>e</sup>	NR	NA <sup>f</sup>	NR	D
	Antistoftiter	/	2389.6	1733.8	73.8	203.8	365.0	1130.0	2300.0	860.9
	(± SD)		±3322.8	±1848.6	±97.7	±202.7	±272.3	±1135.6	±1289.4	±565.9
	% positieve sera	/	100	100	96	100	100	100	100	100
<b>Stal 1</b>	Luchtstaal	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	NT	NT	NT	NT	NT
<b>Stal 2</b>	Luchtstaal	NT	NT	NT	NT	+(3)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
<b>ORT</b>		<b>Dag 0</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Week 2</b>	<b>Week 3.5</b>	<b>Week 6</b>	<b>Week 8</b>	<b>Week 9.5</b>	<b>Week 12</b>	<b>Week 15</b>
<b>24 gemerkte hanen</b>	Antistoftiter	/	79.2	0.0	0.0	95.8	270.1	340.8	330.8	2179.5
	(± SD)		±325.8	±0.0	±0.0	±401.5	±560.0	±542.9	±565.6	±3835.7
	% positieve sera	/	17	0	0	8	21	42	50	56
	PCR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<b>aMPV</b>		<b>Dag 0</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Week 2</b>	<b>Week 3.5</b>	<b>Week 6</b>	<b>Week 8</b>	<b>Week 9.5</b>	<b>Week 12</b>	<b>Week 15</b>
<b>24 gemerkte hanen</b>	Antistoftiter	/	1650.0	178.6	117.90	95.8	37.7	13176.6	6656.1	711.8
	(± SD)		±1588.3	±465.7	±577.5	±264.8	±108.2	±6949.0	±5451.2	±778.1
	% positieve sera	/	88	29	4	25	13	96	100	74
	PCR (subtype)	-	-	-	-	-	+(B)	-	-	-

<sup>a</sup>Isolatiescores vermeld tussen haakjes.

<sup>b</sup>Gemiddelde isolatiescores vermeld tussen haakjes.

<sup>c</sup>/: Geen staalname op dag 0 omdat de kuikens op dag 1 van het experiment aankwamen.

<sup>d</sup>NT: Niet getest.

<sup>e</sup>NA: Niet van toepassing.

<sup>f</sup>NR: Geen resultaat.

#### 4. DISCUSSIE

Ondanks de beschikbaarheid van commerciële vaccins voor NCD en aMPV, blijft de pluimvee-industrie geplaagd door economische verliezen als gevolg van ademhalingsziekten. Bovendien spelen ook andere pathogenen zoals *Mycoplasma spp.*, *Escherichia coli* en *Cp. psittaci* een rol in het multifactorieel respiratoir ziektecomplex (Van Looek *et al.*, 2005a; 2006a; Verminnen *et al.*, 2008; Laroucau *et al.*, 2009), alhoewel deze laatste vaak als een exoot, afkomstig van papegaaien en parkieten, beschouwd wordt. Het vermijden van uitbraken, klinische symptomen en sterfte door middel van *Cp. psittaci* vaccinatie zou onomstotelijk bewijs leveren voor het pathogene belang van *Cp. psittaci* in de pluimvee-industrie. Tot op heden zijn er echter nog geen *Cp. psittaci* vaccins geregistreerd. Desalniettemin zou het nemen van preventieve maatregelen het antibioticumgebruik in de pluimvee-industrie kunnen beperken en de gezondheidstoestand van de dieren verbeteren.

We beschreven eerder in dit verslag al dat ovotransferrine (ovoTF) het meest effectieve transferrine was ter preventie van een *Cp. psittaci* infectie in HD11 cellen (Hoofdstuk 3, deel A) en dat een éénmalige verneveling van 10 mg ovoTF per dier en een dagelijkse toediening van 5 mg ovoTF per dier gedurende 12 opeenvolgende dagen resulteerde in een statistisch significante reductie van klinische symptomen, macroscopische letsels en *Cp. psittaci* replicatie en excretie in SPF kalkoenen (Hoofdstuk 3, deel B). In dit deel onderzochten we de toepasbaarheid van ovoTF-verneveling op een Belgisch kalkoenbedrijf ter preventie van *Cp. psittaci*. Tegelijkertijd werd ook het effect van ovoTF-verneveling op de aanwezigheid van ORT en aMPV geëvalueerd.

In beide klinische studies konden maternale antistoffen tegen aMPV en *Cp. psittaci*, maar niet (studie 1) of weinig (studie 2) tegen ORT, worden gedetecteerd. De maternale anti-aMPV antistoffen waren waarschijnlijk het gevolg van vaccinatie van de moederdieren tegen aMPV, hoewel een natuurlijke infectie niet uit te sluiten valt. De moederdieren die de eieren produceerden voor de eerste klinische studie werden klaarblijkelijk niet gevaccineerd voor ORT en hadden ook geen natuurlijke infectie doorgemaakt aangezien geen maternale anti-ORT antistoffen gedetecteerd konden worden tot week 10 van de kweekronde. Deze die de eieren aanleverden voor de tweede studie waren mogelijk wel geïnfecteerd met ORT op het moment van de ei-productie aangezien 17% van de kuikens lage hoeveelheden aan anti-ORT antistoffen in het bloed hadden de dag na aankomst op het bedrijf. Er konden geen antistoffen meer gedetecteerd worden in de tweede week van de kweekronde. Vaccinatie van de kalkoenmoederdieren tegen ORT om de nakomelingen te beschermen is weinig waarschijnlijk gezien de lange periode tot slacht en wordt dan ook zelden uitgevoerd. We konden geen informatie

verkrijgen met betrekking tot de vaccinatiestatus van de moederdieren. Voor *Cp. psittaci* is er nog geen vaccin beschikbaar en dit impliceert dat de anti-*Cp. psittaci* maternale antistoffen afkomstig zijn van natuurlijk geïnfecteerde moederdieren.

Uit eerdere studies is gebleken dat kweekrondes bij kalkoenen meestal gekarakteriseerd worden door twee *Cp. psittaci* infectiegolven, één op drie tot zes weken (na daling van de maternale antistoftiters) en een tweede op de leeftijd van acht tot 12 weken, telkens gepaard gaande met ademhalingsproblemen (Van Loock *et al.*, 2005a). De eerste infectiegolf wordt daarbij vaak gevolgd door een ORT infectie (week 6-8), terwijl een aMPV infectie kan optreden tijdens of net na de tweede *Cp. psittaci* infectiegolf.

In de eerste klinische studie waren de twee-dagen-oude kuikens reeds positief voor *Cp. psittaci*. Dit is hoogstwaarschijnlijk het gevolg van verticale overdracht uit de moederdieren (Wittenbrink *et al.*, 1993; Lublin *et al.*, 1996) aangezien de lucht in de stal op dag 0 geen *Cp. psittaci* kiemen bevatte. De aanwezige maternale antistoffen boden bescherming tegen een doorbraak van de pathogeen in de dieren, maar konden niet vermijden dat de bacteriën zich verder in de populatie verspreidden (stijging van het aantal positieve swabs van 24% op dag 2 tot 58% op week 3.5 van de kweekronde). De op week 3 tot 6 verwachte seroconversie vond echter niet plaats en het percentage positieve swabs daalde en bereikte zelfs 0% in week 10 van de studie. We kunnen dus besluiten dat ovoTF verneveling gedurende week 2-3.5 preventief werkt tegen de eerste *Cp. psittaci* infectiegolf. Dit kon echter niet duidelijk bevestigd worden in de tweede klinische studie, aangezien er schijnbaar wel seroconversie optrad tussen week 3.5 en week 6. Het dient echter wel vermeld dat de standaardafwijkingen op de serumantistoftiters zeer hoog waren en de stalen afkomstig waren van niet-gemerkte, willekeurig gekozen hanen. Men kan moeilijk van echte seroconversie te spreken aangezien de staalnames op de twee tijdstippen van verschillende dieren kwamen. Het is dus aan te raden om toekomstige longitudinale studies uit te voeren met gemerkte dieren, ondanks het feit dat de zoektocht naar deze dieren zeer arbeidsintensief is. Om de actuele infectiestatus van de dieren in te schatten kan het percentage positieve swabs wel een goede indicator zijn: net als in de eerste klinische studie, daalde het percentage positieve swabs en vertoonden de dieren geen ademhalingsproblemen. De dieren dienden bijgevolg ook niet met antibiotica behandeld te worden.

Normalerwijze wordt een tweede chlamydiale infectiegolf verwacht rond de leeftijd van 8 tot 12 weken, en hiermee in overeenstemming konden we tijdens de eerste klinische studie seroconversie waarnemen tussen week 10 en week 15 en steeg het percentage positieve dieren van 0% tot 12.5%. Een éénmalige periode van ovoTF verneveling (week 2 tot 3.5) kon dus

geen bescherming bieden tegen een tweede *Cp. psittaci* infectiegolf. Deze infectiegolf werd voorafgegaan en mogelijk ook geïnitieerd door een ORT infectie in week 9 (positief in cultuur en PCR) en vermoedelijk ook een gelijktijdige aMPV infectie. Een genotype A *Cp. psittaci* stam was reeds aanwezig vanaf het begin van de kweekronde maar seroconversie en klinische symptomen traden pas op na de ORT en aMPV infecties in week 9. Als gevolg van de infecties met ORT, aMPV en *Cp. psittaci* vertoonden de hanen klinische symptomen tijdens de tweede helft van de kweekronde en werden ze behandeld met antibiotica om uitval door sterfte te beperken.

In de tweede klinische studie kon *Cp. psittaci* geïnduceerde seroconversie opgemerkt worden tussen week 8 en week 9.5. Het was echter opnieuw zo dat de standaardafwijkingen op de serumantistoffiters zeer hoog waren en het percentage positieve swabs in deze periode daalde tot 0%. Deze *Cp. psittaci* infectie werd voorafgegaan door een ORT infectie (PCR positief in week 6-8) en vergezeld van een subtype B aMPV infectie. ORT seroconversie had opnieuw plaats tussen 12 en 15 weken leeftijd en de ORT PCR was positief in week 12. De hanen bleven echter gezond en kregen geen medicatie. We kunnen dus stellen dat, in tegenstelling tot voorgaande kweekronden, geen opflakking van ademhalingsproblemen optrad tijdens de tweede risicoperiode (week 8 tot 12 van de kweekronde) in stal 2. De dieren in stal 1 en 3, die niet behandeld waren met ovoTF, hadden wel te kampen met ademhalingsinfecties en dienden behandeld te worden met antibiotica om de sterfte te beperken.

Bovenstaande resultaten tonen aan dat beide ovoTF toedieningsperiodes nodig waren om de dieren te beschermen tegen uitbraken van ademhalingsziekten. Andere toedieningsregimes, zoals dagelijkse verneveling, kunnen ook effectief zijn, maar toediening tijdens de risicoperiodes lijkt aan te raden aangezien ovoTF schijnbaar enkel de toename van de infectiedruk lijkt te vermijden. Er treden nog steeds infecties met *Cp. psittaci* op, maar deze zijn minder uitgesproken en veroorzaken geen klinische symptomen. Het is ook belangrijk dat alle dieren behandeld worden met de ovoTF aerosolen, zoals gebeurde in de eerste klinische studie. Hiervoor zou preferentieel een meer geautomatiseerde vernevelmethode moeten ontwikkeld worden aangezien de bedrijfsleider relatief veel moeilijkheden ondervond om de elektrisch aangedreven Atomist doorheen de ganse stal te dragen.

Uit deze klinische studie bleek duidelijk dat de gebruikte methoden om de stallen te poetsen en desinfecteren ontoereikend waren of de stallen mogelijk opnieuw gecontamineerd werden na desinfectie. De aanwezigheid van *Cp. psittaci* in de lucht van stal 2 in week 3.5 van de eerste klinische studie kan te wijten zijn aan onvoldoende reiniging en desinfectie. Een andere verklaring is dat er gecontamineerde lucht van stal 1 in stal 2 terecht kwam. Voor de tweede

klinsche studie is de *Cp. psittaci* positieve lucht een gevolg van onvoldoende reiniging en desinfectie aangezien er op dat moment geen andere kalkoenen op het bedrijf aanwezig waren en ook geen gecontamineerd materiaal de stal werd binnengebracht.

Bij het uitvoeren van de klinische proeven werden twee mensen besmet met *Cp. psittaci*. Geen van beide vertoonde echter klinische symptomen, in tegenstelling tot een eerdere longitudinale studie op een Belgisch kalkoebenbedrijf waar een hoogvirulente genotype D stam werd teruggevonden (Verminnen *et al.*, 2008). In deze studie bleef de genotyperende micro-array negatief voor nested PCR positieve stalen van week 6, 8 en 12. Dit is mogelijk te verklaren door het feit dat de gevoeligheid van de nested PCR veel hoger is dan deze van de genotyperende micro-array. Net zoals in eerdere studies (Van Looek *et al.*, 2005a; Verminnen *et al.*, 2008) scheidde de kalkoenen nog steeds levende kiemen uit op het moment van slacht, wat een aanzienlijk risico inhoudt voor overdracht naar het personeel van slachthuizen.

## 5. CONCLUSIE

Het voorkomen van aviaire chlamydie en de preventie ervan zijn nog steeds ondergewaardeerd. Verneveling van ovotransferrine in de stallen resulteerde in een significante verbetering van de gezondheid van de kalkoenen. De beste resultaten werden bekomen wanneer ovotransferrine werd toegediend van week 2 tot 3.5 en week 8 tot 9.5 van de kweekronde. Er traden nog steeds *Cp. psittaci*, ORT en aMPV infecties op, maar deze waren minder uitgesproken en bleven klinisch onopgemerkt. De resultaten kunnen mogelijk nog verbeterd worden wanneer ovotransferrine wordt verneveld in combinatie met een *Cp. psittaci* vaccin.



## Hoofdstuk 4: Algemene discussie en besluit



### ***Chlamydomphila psittaci* infecties bij pluimvee en de mens**

*Chlamydomphila (Cp.) psittaci* is als belangrijke ademhalingspathogeen verantwoordelijk voor aanzienlijke economische verliezen in de pluimvee-industrie, voornamelijk bij kalkoenen (Andersen & Vanrompay, 2003). In deze kalkoenbedrijven worden per kweekronde vaak één of twee golven van ademhalingsinfecties waargenomen. Deze worden bestreden met dure antibioticabehandelingen om op die manier hoge sterftecijfers, gewichtsverlies en afkeuring aan de slachtlijn te voorkomen (Anderson *et al.*, 1978).

Als gevolg van het zoönotisch karakter van *Cp. psittaci* kan ook de mens geïnfecteerd worden na aerogene transmissie van bacteriën van zieke vogels, leidend tot psittacose of papegaaienziekte (Longbottom & Coulter, 2003). De symptomen bij de mens kunnen variëren van zware ademhalingsproblemen en longontsteking tot mildere symptomen zoals hoofdpijn, niezen en hoesten. Vaak blijft de ziekte onopgemerkt (Beeckman & Vanrompay, 2009), waardoor geen medische verzorging wordt gezocht of een verkeerde behandeling wordt ingesteld. Het aantal gerapporteerde humane psittacosegevallen is dan ook veel lager dan de werkelijke prevalentie (Cole, 1990).

### **Zoonotische *Cp. psittaci* overdracht: diagnose**

Veelal worden humane psittacose gevallen gediagnosticeerd door middel van serologische testen zoals de microimmunofluorescentie (MIF) test, die antistoffen tegen *Cp. psittaci* detecteert. De MIF test zou gevoeliger en specifiekere zijn dan de complement fixatie (CF) test die gebruik maakt van chlamydiaal lipopolysaccharide (LPS) als antigeen, dat serologisch verwant is met het LPS van *Enterobacteriaceae*. Maar ook de MIF test vertoont kruisreactiviteit met andere Chlamydiae, zoals *Cp. pneumonia* en *C. trachomatis*, wat leidt tot vals-positieve resultaten. Een multiparametrische approach gebaseerd op zowel serologie als DNA amplificatie is dan ook aangewezen om *Cp. psittaci* infecties van andere chlamydiale infecties te onderscheiden.

In hoofdstuk 2 van dit verslag gebruikten we dan ook een combinatie van moleculaire technieken om een *Cp. psittaci* infectie afkomstig van kalkoenen te diagnosticeren in een dierenarts. Het ging hierbij om een *Cp. psittaci* specifieke nested PCR (Van Loock *et al.*, 2005b) en een *Cp. psittaci* genotype-bepalende real time PCR (Geens *et al.*, 2005b), die zeer specifiek en minder tijdrovend zijn dan voorheen ontwikkelde testen. Het is dan ook aan te raden dergelijke snelle antigeendetectorende testen in te sluiten in de routinediagnostiek voor ziekenhuizen en gezondheidscentra. Bovendien konden we levende *Cp. psittaci* bacteriën aantonen in zowel de humane als de kalkoenswabs. Dit gebeurde door middel van isolatie in

BGM cellen, waarvan een eerdere studie aantoonde dat deze de meest gevoelige *in vitro* gastheer zijn voor *Cp. psittaci* isolatie (Vanrompay *et al.*, 1992). Het serum van de dierenarts was positief in de rMOMP ELISA (Verminnen *et al.*, 2006), wat er op kan wijzen dat de dierenarts voorheen in contact kwam met geïnfecteerde kalkoenen. Het gebruikte rMOMP bevat echter familie- en genus-specifieke epitopen, waardoor een *Cp. psittaci* infectie niet kan onderscheiden worden van een infectie met andere Chlamydiae en er zijn er geen *Cp. psittaci* specifieke humane serologische tests beschikbaar. Rekening houdend met de positieve *Cp. psittaci* PCR en isolatie resultaten in zowel de dierenarts als de kalkoenen, kunnen we er van uitgaan dat de serumantistoffen in de dierenarts wel degelijk het gevolg waren van een infectie met *Cp. psittaci*. Blijft natuurlijk dat een *Cp. psittaci*-specifieke serologische test voor humane sera een aanwinst zou zijn voor het huidige *Cp. psittaci* diagnostisch platform (Verminnen *et al.*, 2008).

#### **Zoonotische overdracht van verschillende *Cp. psittaci* genotypes**

In de literatuur zijn al verschillende gevallen van zoonotische overdracht van *Cp. psittaci* genotypes (genotypes A, B, C en E/B) naar de mens beschreven (Heddema *et al.*, 2006a; Heddema *et al.*, 2006b; Harkinezhad *et al.*, 2007; Vanrompay *et al.*, 2007; Verminnen *et al.*, 2008). In het kader van dit onderzoek konden we echter als eerste de gelijktijdige overdracht van *Cp. psittaci* genotypes D, F en E/B van kalkoenen naar een dierenarts aantonen. Hoewel levende kiemen gevonden werden in de dierenarts, ontwikkelde ze geen ademhalings-symptomen, mogelijk omdat ze al een zekere mate van immunologische bescherming had ontwikkeld tijdens vorige experimenten. Bovendien werd eerder al beschreven dat nieuwe werknemers vatbaarder zijn voor infectie in vergelijking met werknemers die al geruime tijd aangesteld zijn (Newman *et al.*, 1992; Hinton *et al.*, 1993). Desalniettemin zijn specifieke voorzorgsmaatregelen aan te raden voor alle risico-activiteiten en -beroepen. Zo zouden werknemers in slachthuizen en pluimveebedrijven geïnformeerd moeten worden over de ziekte en persoonlijke bescherming, zoals een volgelaats P3 bioveiligheidsmasker. Lijkschouwingen op dode volgels zouden preferentieel in een klasse II bioveiligheids kabinet moeten worden uitgevoerd (Longbottom & Coulter, 2003).

#### **Profylactisch gebruik van ovotransferrine: *in vitro* studie**

Er zijn geen *Cp. psittaci* vaccins of andere preventieve maatregelen commercieel beschikbaar om aviaire chlamydirose in de pluimveesector in te dijken of te bestrijden. Vaak worden antibiotica zoals tetracyclines ingezet om de economische verliezen te beperken, maar het

profylactisch aanwenden van antibiotica kan aanleiding geven tot het ontstaan van tetracycline resistente zoönotische *Cp. psittaci* stammen. Gelijkaardige tetracycline resistente *C. suis* stammen werden al gedetecteerd in varkens, hoogstwaarschijnlijk als gevolg van het bijna onvermijdelijk gebruik van tetracyclines in het varkensvoeder (Lenart *et al.*, 2001; Dugan *et al.*, 2004). Bovendien verhoogt het gebruik van antibiotica ook het gevaar op antibioticaresiduen in producten voor menselijke consumptie, mogelijk leidend tot allergische reacties. Omwille van deze redenen onderzochten we het potentieel van natuurlijk voorkomende anti-microbiële eiwitten ter preventie van chlamydiëse in kalkoenen. Transferrines zijn ijzerbindende glycoproteïnen. Als gevolg van ijzersequestratie is er geen vrij ijzer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) meer voorhanden waardoor het voor sommige bacteriën moeilijk wordt om te kunnen vermeerderen en overleven. Daarnaast werken transferrines ook in op de buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën (Valenti *et al.*, 1982; Valenti *et al.*, 1983; Ibrahim *et al.*, 2000; Valenti & Antonini, 2005). In een eerste, *in vitro*, fase van het onderzoek konden we een direct bactericidaal effect van 0.5 mg/ml ovotransferrine (ovoTF) op extracellulaire *Cp. psittaci* aantonen. Voor lactoferrine (LF) aan een 10 maal hogere concentratie (5 mg/ml), werd een gelijkaardig, zij het minder uitgesproken, effect waargenomen. Bovendien konden niet-cytotoxische en niet-bactericidale concentraties van maximum 0.05 mg/ml ovoTF en 0.5 mg/ml humaan en runder LF de chlamydiaal geïnduceerde actinepolymerisatie en intrede in de kippen monocyt/en/macrofagen cellijn HD11 significant inhiberen en deze inhibitie was bovendien concentratie-afhankelijk. Toediening van eiwitten 3 uur nadat een infectie werd ingesteld had geen invloed op de intracellulaire vermeerding van *Cp. psittaci* in HD11 cellen. Algemeen kunnen we dus stellen dat ovotransferrine effectiever bleek dan lactoferrine om een *Cp. psittaci* infectie *in vitro* tegen te gaan, waarbij voornamelijk de aanhechting en intrede van *Cp. psittaci* in zijn gastheercel wordt geïnhibeerd.

### **Profylactisch gebruik van ovotransferrine: preklinische studie**

Op basis van de *in vitro* resultaten gingen we na of ovotransferrine ook *in vivo* zou kunnen aangewend worden om *Cp. psittaci* infecties bij kalkoenen te bestrijden of vermijden. Hiervoor werd een ‘proof of principle’ experiment opgezet in drie weken oude SPF kalkoenen, waarbij deze werden blootgesteld aan ovotransferrine verneveling (10 of 5 mg per dier) net vóór infectie met *Cp. psittaci* of gedurende 12 dagen na de infectie. Een éénmalige dosis van 10 mg verneveld ovotransferrine per kalkoen en een dagelijkse behandeling met 5 mg (12 opeenvolgende dagen) bood de beste bescherming (klinische symptomen, macroscopische letsels en chlamydiale vermeerdering en excretie). Het belang van de

toegediende dosis kon duidelijk aangetoond worden aangezien die dieren die slechts éénmalig behandeld werden met 5 mg ovotransferrine dezelfde symptomen en letsels vertoonden als de niet-behandelde controlegroep. We kunnen natuurlijk niet garanderen dat elk dier exact 5 of 10 mg ovotransferrine inademde, maar het *in vivo* effect van ovotransferrine kon ons inziens tot starten van uit een wetenschappelijk gefundeerde basis, namelijk de eerder bekomen *in vitro* resultaten (Hoofdstuk 3A).

Ovotransferrine werd door middel van verneveling aan de kalkoenen toegediend om de hoogst mogelijke mate van bescherming te induceren. Immers, *Cp. psittaci* vermeerderd in eerste instantie in de mucosale epitheelcellen en macrofagen van de bovenste luchtwegen, en dit is exact de plaats waar het ovotransferrine terechtkomt in geval van aerogene toediening. Bovendien heeft de toediening van ovotransferrine onder de vorm van een aerosol ook praktische voordelen. Verneveling van ovotransferrine kan sneller in vergelijking met andere toedieningswijzen (intramusculair, intradermaal,...) en het gebruik van speciale toestellen om ovotransferrine op de bedrijven toe te dienen, en zo de dieren te beschermen, is een interessante en innovatieve strategie voor gebruik in de kalkoenindustrie. Daarnaast zou ovotransferrine ook in kippenindustrie kunnen worden toegepast, waar *Cp. psittaci* infecties frequent voorkomen (Dickx *et al.*, niet gepubliceerde resultaten). De verschillende werkwijzen van ovotransferrine in acht nemend, oefent dit eiwit mogelijk een breedspectrum anti-microbieel effect uit, en kan het aldus ook belangrijk zijn in de bestrijding van andere respiratoire pathogenen die frequent in de pluimveeindustrie voorkomen zoals *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *Mycoplasma sp.* en aviair metapneumovirus (aMPV). Bijgevolg zou het gebruik van een natuurlijk anti-microbieel eiwit de gezondheidsproblematiek en economische problemen als gevolg van profylactisch antibioticumgebruik een halt toe roepen. Zo werd recent in de Verenigde Staten een anti-microbiële spray op basis van lactoferrine op de markt gebracht, na goedkeuring door de Food and Drug Administration (FDA). Sproeien van dit product op ongekookte runderkarkassen helpt bij de bestrijding van *E. coli* O157:H7<sup>1</sup> infecties. Of ook ovotransferrine tegen *E. coli* infecties kan ingezet worden dient verder onderzoek uit te maken, maar de kans is groot gezien de structurele gelijkenissen tussen ovotransferrine en lactoferrine (Lambert *et al.*, 2005).

---

<sup>1</sup> Anti-microbial spray safe for fighting *E. coli*, FDA Talk Paper #P03-62 (<http://www.fda.gov>).

**Profylactisch gebruik van ovotransferrine: klinische studies**

Nadat we succesvol het anti-chlamydiale effect van ovotransferrine in SPF kalkoenen konden aantonen, wilden we onderzoeken of dit natuurlijk anti-microbieel eiwit ook in de conventionele kalkoenindustrie toepasbaar was. Hiervoor voerden we twee klinische studies uit op een Belgisch kalkoenbedrijf. Tijdens de eerste klinische studie werden de dieren gedurende 12 opeenvolgende dagen behandeld met een ovotransferrine nevel (5 mg per dier), in overeenstemming met de resultaten van de preklinische studie in SPF kalkoenen. Toediening startte op de leeftijd van 2 weken en werd beëindigd op 3.5 weken. In de tweede klinische studie werd een extra dagelijkse verneveling van week 8 tot week 9.5 van de kweekronde uitgevoerd. Deze toedieningsperiodes werden gekozen op basis van de resultaten van Van Look *et al.* (2005a) die aantoonde dat er op Belgische kalkoenbedrijven meestal twee *Cp. psittaci* infectiegolven voorkomen (3-6 weken en 8-12 weken). Daarenboven werd ook de prevalentie van andere, tegelijk voorkomende infecties zoals ORT en aMPV onderzocht tijdens beide klinische studies.

De eerste klinische proef toonde aan dat verneveling van ovotransferrine een uitbraak van *Cp. psittaci* tijdens de eerste negen weken van de kweekronde kon voorkomen. Gedurende gans deze periode vertoonden de dieren geen klinische symptomen en diende geen antibioticabehandeling te worden ingesteld. Het lijkt er sterk op dat verneveling van ovotransferrine de dieren beschermde tegen de eerste infectiegolf die normaal optreedt op de leeftijd van 3 tot 6 weken. De behandeling had echter geen lange termijn effect omdat de dieren niet beschermd werden tegen de tweede *Cp. psittaci* infectiegolf op 8 tot 12 weken van de kweekronde. Vanaf week 9 konden ernstige ademhalingsymptomen worden waargenomen en de *Cp. psittaci* infectie ging vergezeld van een ORT en aMPV infectie, zoals duidelijk werd in zowel ELISA als PCR. De dieren werden daarop behandeld met antibiotica om de mortaliteit te beperken.

Om deze antibioticumbehandeling op het einde van de kweekronde, en dus dicht bij het moment van slachting, te beperken, werd in de tweede klinische proef ook ovotransferrine verneveld van week 8 tot week 9.5. In tegenstelling tot de eerste klinische proef bleven de kalkoenen gedurende de ganse kweekronde gezond en dienden ze niet behandeld te worden met antibiotica. De hennen en hanen die in stal 1 en stal 3 ondergebracht waren, en enkel ovotransferrine kregen in de periode week 2-3.5, vertoonden zoals verwacht wel klinische symptomen in de tweede risicoperiode (8-12 weken) en werden daarom behandeld met antibiotica om de sterfte te beperken. Met deze tweede klinische studie konden we dus duidelijk aantonen dat aerogene toediening van ovotransferrine tijdens de risicoperiodes

gedurende 12 opeenvolgende dagen een significante bescherming van conventionele kalkoenen biedt tegen uitbraken van *Cp. psittaci* en andere respiratoire pathogenen. Hoewel verneveling van ovotransferrine niet de aanwezigheid van deze infecties kan voorkomen, vermijdt het dat er klinische symptomen optreden of antibiotica moet gegeven worden en zorgt het voor een daling van de infectiedruk. Bijgevolg kunnen dergelijke milde infecties makkelijker worden opgevangen door het immuunsysteem van de dieren in kwestie en treden geen klinische symptomen meer op.

In beide klinische studies op het kalkoeben bedrijf werd gebruik gemaakt van een elektrisch aangedreven Atomist 1026 sproeistoestem voor het vernevelen van ovotransferrine. In de toekomst zou het echter aangewezen zijn om een draadloos en meer geautomatiseerd verneveltoestel te gebruiken. Dit zou de bedrijfsleider toelaten vrij doorheen de stal te vernevelen zonder gehinderd te worden door de reikwijdte van het verlengsnoer of de dieren ermee te hinderen. Hierbij dient men er wel rekening mee te houden dat ovotransferrine voldoende dicht bij de dieren verneveld moet worden om verdamping van de ovotransferrinedruppels te vermijden.

#### **Ovotransferrine aerosols: is het de investering waard?**

De dieren werden dagelijks behandeld met een dosis van 5 mg ovotransferrine per dier. Rekening houdend met een kostprijs van ongeveer 350 € per kg ovotransferrine en de totale dosis die aan de dieren werd toegediend, kan men stellen dat een aanzienlijk bedrag op tafel gelegd moet worden om de dieren te beschermen (714 € voor een kweekronde met 17.000 kalkoenen). Wanneer echter, zoals tijdens de voorgaande kweekrondes zonder ovotransferrineverneveling, een antibioticumbehandeling nodig is, bedraagt de kostprijs ongeveer 5000 € per kweekronde. Het vernevelen van ovotransferrine tijdens de twee risicoperiodes (klinische studie 2) zorgde er echter voor dat er geen ademhalingsproblemen optraden en de dieren niet behandeld moesten worden met antibiotica. Een dergelijke aanpak vermindert de kostprijs voor de bedrijfsleider dus significant en maakt het bovendien aantrekkelijk om in ovotransferrine te investeren. Aangezien het ook niet langer nodig is om antibiotica toe te dienen, vooral niet tijdens de laatste weken van de kweekrondes, vermindert het risico op afkeuring aan de slachtlijn en de aanwezigheid van residuen in voedsel voor humane consumptie.



## Samenvatting



*Chlamydiaceae* zijn Gram-negatieve obligaat intracellulaire bacteriën die eukaryote cellen kunnen infecteren. Deze bacteriën onderscheiden zich van andere micro-organismen door hun unieke levenscyclus met een infectieuze, extracellulaire, maar metabool inactieve vorm (de ‘elementaire lichaampjes of EBs’) en een intracellulaire, metabool actieve vorm (de ‘reticulaire lichaampjes of RBs’) (Vanrompay *et al.*, 1995a). Binnen de familie van de *Chlamydiaceae* veroorzaakt de bacterie *Chlamydophila (Cp.) psittaci* (voorheen *Chlamydia psittaci*) ademhalingsziekte bij vogels, zoals papegaaien, duiven, eenden en kalkoenen, en psittacose of papegaaizenziekte bij de mens. Meer dan 475 vogelsoorten, zowel gedomesticeerde als wilde vogels, kunnen geïnfecteerd worden door *Cp. psittaci* (Kaleta & Taday, 2003). De verspreiding van *Cp. psittaci* gebeurt hoofdzakelijk door het inademen van infectieuze aerosolen van oog- en neussecreties of gedroogd fecaal materiaal van geïnfecteerde vogels (Burkhart & Page, 1971; Takahashi *et al.*, 1988; Cole, 1990). Voornamelijk in de pluimvee-industrie leiden *Cp. psittaci* infecties tot aanzienlijke verliezen, zeker wanneer de dieren gelijktijdig met aviaire *E. coli* (APEC), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) of aviaire metapneumovirus (aMPV) geïnfecteerd zijn (Van Loock *et al.*, 2005a; 2006a). De ziekte kan ook worden overgedragen op mensen die regelmatig met besmette vogels in contact komen zoals dierenartsen, slachthuispersoneel en vogelhobbyisten. Humane psittacose blijft daarbij vaak onopgemerkt als gevolg van een heel divers klinisch beeld variërend van onbeduidend tot grieperige symptomen of longontsteking.

De aerogene transmissie van *Cp. psittaci* bacteriën staat centraal in het uitgevoerde onderzoek. Naast het illustreren van de zoönotische overdracht van deze bacteriën naar de mens, was het onze bedoeling om de ademhalingsinfecties veroorzaakt door *Cp. psittaci* te voorkomen door gebruik van aerosolen van het natuurlijk anti-microbieel eiwit ovotransferrine (ovoTF). De profylactische werking van ovoTF aerosolen werd eerst tijdens een pre-klinische studie geëvalueerd in specifiek pathogeen vrije (SPF) kalkoenen die gehuisvest werden in negatieve druk isolatoren. Vervolgens werd het ovoTF ook uitgetest in een klinische studie op een Belgisch kalkoenbedrijf.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de taxonomie en de infectiebiologie van chlamydiale infecties. Ook de rol van het Type III secretiesysteem wordt kort belicht. Daarnaast wordt dieper ingegaan op een aantal pathogenen die betrokken zijn in het multifactorieel respiratoir complex in de pluimvee-industrie, zoals *Cp. psittaci*, aMPV en ORT. Verschillende aspecten van deze infecties bij vogels komen aan bod, zoals prevalentie,

overdracht, pathogenese, klinisch ziektebeeld, behandeling en het belang voor de volksgezondheid.

Omdat ze regelmatig in contact komen met vogels, hebben dierenartsen, houders van hobbyvogels en mensen die tewerkgesteld zijn in de pluimvee-industrie een grotere kans om geïnfecteerd te worden door *Cp. psittaci*. De zoönotische transmissie van deze bacterie werd duidelijk geïllustreerd in **Hoofdstuk 2**. Deze studie beschrijft de overdracht van een *Cp. psittaci* infectie van geïnfecteerde kalkoenen naar een dierenarts. Faryngeale swabs van de kalkoenen en van de dierenarts werden positief bevonden voor *Cp. psittaci* door middel van nested PCR, outer membrane protein A (*ompA*) genotype-specifieke kwantitatieve real-time PCR en celcultuur. In deze studie werd bovendien voor het eerst de simultane overdracht van drie verschillende *Cp. psittaci* (*ompA*) genotypes (genotypes D, F en E/B) aangetoond van geïnfecteerde kalkoenen naar de mens.

Aangezien er momenteel geen vaccins of andere profylactica voorhanden zijn om *Cp. psittaci* infecties te voorkomen, werden in **deel A van Hoofdstuk 3** drie natuurlijk anti-microbiële eiwitten aangewend om een experimentele *Cp. psittaci* infectie te voorkomen. Het effect van ovotransferrine (ovoTF) en lactoferrine (LF) op de aanhechting en intrede van *Cp. psittaci* werd hiervoor in een model van HD11 cellen nagegaan. Lactoferrine is een ijzerbindend glycoproteïne (Metz-Boutigue *et al.*, 1984) en oefent zijn antimicrobiële werking onder meer uit door destabilisatie en afbraak van het T3SS (Ochoa *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2003; Ochoa & Clearly, 2004). Ovotransferrine (ook conalbumine genoemd) is het aviaire homoloog van lactoferrine. Cytotoxiciteit van de eiwitten voor HD11 cellen werd nagegaan d.m.v. tellingen van levende en dode cellen en een klassieke MTT-test. In een eerste experiment werd het effect van deze transferrines op extracellulaire *Cp. psittaci* getest. Pre-incubatie van de bacteriën met 0.5 tot 5 mg/ml ovoTF inhibeerde hun infectiviteit voor BGM-cellen significant, terwijl bij behandeling met humaan of bovien LF een minimale concentratie van 5 mg/ml vereist was om een gelijkaardig resultaat te bekomen. Vervolgens werd onderzocht of deze eiwitten de chlamydiale aanhechting en intrede in de gastheercel konden beïnvloeden. Hiervoor werden niet-cytotoxische en niet-bactericidale concentraties van 0.05 mg/ml ovoTF en 0.5 mg/ml humaan en bovien LF toegediend gelijktijdig met de inoculatie in HD11 kippenmacrofagen. De resultaten toonden aan dat ovotransferrine de aanhechting en intrede efficiënter tegengaat dan lactoferrine. Met behulp van een dubbele immunofluorescentiekleuring voor *Cp. psittaci* en gastheer-actine werd bovendien aangetoond dat ovoTF de chlamydiaal geïnduceerde actinepolymerisatie (ter hoogte van de intredeplaats) op concentratie-afhankelijke wijze verhindert. Toediening van eiwitten 3 uur nadat een

infectie werd ingesteld had geen invloed op de intracellulaire vermeerdering van *Cp. psittaci* in HD11 cellen. Dit alles impliceerde dat ovotransferrine mogelijk kon gebruikt worden ter preventie van chlamydiale infecties *in vivo*.

In **deel B van Hoofdstuk 3** werd ovoTF dan ook aangewend om een experimentele *Cp. psittaci* infectie te voorkomen in SPF kalkoenen. De dieren werden behandeld met ovoTF aerosolen alvorens geïnfecteerd te worden met *Cp. psittaci* serovar/genotype D stam 92/1293 ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>). Groepen 1 en 2 kregen een éénmalige dosis van respectievelijk 10 en 5 mg ovoTF per kalkoen toegediend, groep 3 kreeg een dagelijkse dosis van 5 mg ovoTF per kalkoen gedurende 12 opeenvolgende dagen en groep 4 fungeerde als onbehandelde, geïnfecteerde controlegroep. De geïnfecteerde dieren werden gedurende 12 dagen gehuisvest in negatieve druk isolatoren en de klinische symptomen werden dagelijks opgevolgd. Om de drie dagen werden swabs genomen voor de evaluatie van de bacteriële excretie tot aan de euthanasie op dag 12 post infectie (p.i.). Tijdens de necropsie werd de pathologie en *Cp. psittaci* replicatie in verschillende weefsels onderzocht. Een éénmalige dosis van 10 mg ovoTF en een herhaaldelijke dosis van 5 mg ovoTF konden echter niet voorkomen dat de dieren geïnfecteerd werden door *Cp. psittaci*, maar zorgden wel voor een significante reductie van de klinische symptomen, macroscopische letsels en bacteriële replicatie en excretie in vergelijking met de onbehandelde geïnfecteerde controledieren. Deze studie toont duidelijk het anti-chlamydiaal effect aan van ovoTF *in vivo* en suggereert de mogelijkheid om dit eiwit profylactisch aan te wenden op kalkoenbedrijven.

In **deel C van Hoofdstuk 3** werd het ovoTF tijdens twee opeenvolgende klinische studies toegediend op een Belgisch kalkoenbedrijf dat reeds te kampen had met ademhalingsinfecties tijdens voorgaande kweekronden. Tijdens de twee studies werd het effect van ovoTF bestudeerd op de uitbraak van *Cp. psittaci* infecties, alsook op gelijktijdige *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) en aviair metapneumovirus (aMPV) infecties. Tijdens de eerste klinische studie kregen de kalkoenen gedurende twaalf dagen een dagelijkse aerosol dosis van 5 mg ovoTF per dier vanaf de leeftijd van 2 weken tot op week 3.5. OvoTF aerosolen werden toegediend door middel van een Atomist 1026 spraytoestel. Gedurende de tweede klinische studie werd het ovoTF toegediend van week 2 tot week 3.5, maar ook van week 8 tot week 9.5. Tijdens de eerste klinische studie konden er bij de kalkoenen geen ademhalings-symptomen waargenomen worden tot op de leeftijd van 9 weken en dienden er bijgevolg geen antibiotica toegediend te worden. Op week 9 werden de dieren echter getroffen door een *Cp. psittaci* en ORT infectie. Tijdens de tweede klinische studie zorgde de toediening van het ovoTF voor een significante verbetering van de gezondheid van de dieren gedurende de

volledige kweekronde in vergelijking met voorgaande opzetten. *Cp. psittaci*, ORT en aMPV infecties kwamen echter wel nog voor tijdens deze studie, maar deze waren minder virulent en de dieren vertoonden geen klinische symptomen zodat een antibioticum-kuur onnodig was.

Tot besluit kunnen we stellen dat we het zoönotisch gevaar van *Cp. psittaci* infecties hebben aangetoond door de gelijktijdige overdracht van drie verschillende *Cp. psittaci* genotypes uit geïnfecteerde kalkoenen naar een dierenarts te beschrijven. Daarnaast werd het anti-chlamydiaal effect van ovotransferrine getest in ons kippenmonocyten/macrofagen model en konden we aantonen dat verneveling van ovotransferrine aan SPF en conventionele kalkoenen bescherming biedt tegen aviaire chlamydiëse. In de toekomst zou ovotransferrine dan ook vermarkt kunnen worden als een kosten-efficiënt en makkelijk toe te dienen preventief product in de commerciële pluimveehouderij.

## Résumé





Les *Chlamydiaceae* sont des bactéries Gram-négatives qui ont besoin d'une cellule eukaryote pour pouvoir survivre et se multiplier. Ces bactéries se distinguent des autres micro-organismes par leur mode de vie, caractérisée par une forme infectieuse extracellulaire à métabolisme inactif (les 'corps élémentaires ou EBs') et une forme intracellulaire à métabolisme actif (les 'corps réticulaires ou RBs') (Vanrompay *et al.*, 1995a). Dans la famille des *Chlamydiaceae*, la bactérie *Chlamydophila (Cp.) psittaci* (précédemment *Chlamydia psittaci*) cause des problèmes respiratoires chez des oiseaux comme les perroquets, pigeons, canards et dindons, et la psittacose chez les humains. Plus de 475 espèces d'oiseaux, aussi bien des oiseaux domestiqués que sauvages, peuvent être infectés par *Cp. psittaci* (Kaleta & Taday, 2003). La dissémination de *Cp. psittaci* se fait surtout par inhalation d'aérosols infectieux, dérivés des sécrétions oculonasaux ou des dépôts fécaux séchés d'oiseaux infectés (Burkhart & Page, 1971; Takahashi *et al.*, 1988; Cole, 1990). Particulièrement dans l'aviculture, les infections par *Cp. psittaci* causent des déficits substantiels, surtout quand les animaux sont infectés simultanément par *E. coli* aviaire (APEC), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) ou le métapneumovirus aviaire (aMPV) (Van Loock *et al.*, 2005a; 2006a). La maladie peut aussi être transmise aux personnes qui sont régulièrement en contact avec des oiseaux contaminés, comme des vétérinaires, des employés d'abattoirs ou des amateurs d'oiseaux. La psittacose humaine est rarement diagnostiquée à cause d'une grande diversité en symptômes cliniques (inapparent, malaise générale, symptômes de grippe, pneumonie).

La transmission aérogène de *Cp. psittaci* est l'élément central dans les enquêtes menées. Nous avons pu illustrer la transmission zoonotique de ces bactéries vers un vétérinaire. En outre, nous avons essayé d'empêcher les problèmes respiratoires causés par *Cp. psittaci*, en utilisant des aérosols d'ovotransferrine (ovoTF), une protéine naturelle et anti-microbienne. L'effet prophylactique de l'ovoTF a d'abord été évalué pendant une étude préclinique avec des dindons indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (SPF), hébergés dans des isolateurs sous pression négative. Ensuite, ovoTF a aussi été mise à l'essai dans deux études cliniques dans une entreprise belge d'élevage de dindons.

Le **Chapitre 1** donne un résumé de la taxonomie et de la biologie des infections chlamydiales, ainsi que du rôle du système de sécrétion de Type III (T3SS). Par après, nous discutons plus profondément des pathogènes impliqués dans le complexe respiratoire multifactoriel, comme *Cp. psittaci*, aMPV et ORT. Différents aspects de ces infections sont

exposés, comme entre autres, la prévalence, la transmission, la pathogénie, les symptômes, le traitement et l'intérêt pour la santé publique.

En ayant fréquemment contact avec des oiseaux, les vétérinaires, amateurs d'oiseaux ou employés de l'aviculture risquent plus souvent d'être infectés par *Cp. psittaci*. Cela est clairement illustré dans le **Chapitre 2**. Cette étude décrit la transmission d'une infection avec *Cp. psittaci* des dindons infectés vers un vétérinaire. Les prélèvements pharyngés des dindons et du vétérinaire étaient positifs pour *Cp. psittaci* en nested PCR, outer membrane protein A (*ompA*) real-time PCR quantitatif et en isolation sur culture. En outre, nous avons pu démontrer la transmission simultanée de trois différents (*ompA*) génotypes de *Cp. psittaci* (génotypes D, F et E/B) des dindons infectés vers le vétérinaire.

Etant donné qu'à présent il n'y a pas de vaccins ou autres produits prophylactiques sur le marché pour éviter des infections *Cp. psittaci*, nous avons examiné trois protéines naturelles et anti-microbiennes pour combattre une infection expérimentale avec *Cp. psittaci* dans la **partie A du Chapitre 3**. Pour cela, nous avons examiné l'effet de l'ovoTF et de la lactoferrine (LF) sur l'insertion et l'entrée de *Cp. psittaci* dans notre modèle de cellules HD11. La lactoferrine est une glycoprotéine qui fixe le fer (Metz-Boutigue *et al.*, 1984) et exerce son effet anti-microbien entre autres par la déstabilisation et démolition du T3SS (Ochoa *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2003; Ochoa & Clearly, 2004). L'ovotransferrine (aussi connu comme conalbumine) est l'homologue aviaire de la lactoferrine. La cytotoxicité de ces protéines pour les cellules HD11 a été déterminée par comptage des cellules vivantes et mortes et par un test MTT. Dans une première expérience nous avons testé l'effet de ces transferrines sur des bactéries *Cp. psittaci* extracellulaires. La pré-incubation des bactéries avec 0.5 à 5 mg/ml d'ovoTF diminuait leur infectivité pour les cellules BGM de façon significative, tandis qu'il fallait une concentration minimale de 5 mg/ml de LF humaine ou bovine pour obtenir un résultat comparable. Ensuite, l'effet de ces protéines sur l'insertion et l'entrée chlamydiale dans la cellule hôte a été déterminé. A cette fin, des concentrations non-cytotoxiques et non-bactéricides de 0.05 mg/ml ovoTF et 0.5 mg/ml LF humaine ou bovine ont été administrées simultanément avec l'inoculation des macrophages HD11. Les résultats montraient que l'ovoTF diminue l'insertion et l'entrée chlamydiale dans la cellule hôte plus efficacement que la LF. En utilisant une coloration à immunofluorescence pour *Cp. psittaci* et pour l'actine de la cellule hôte, nous avons aussi pu démontrer que l'ovoTF empêche la polymérisation d'actine au site de l'insertion chlamydiale, et cela dépend de la concentration utilisée. L'administration des protéines 3 heures après l'inoculation, n'a plus d'influence sur

la réplication intracellulaire de *Cp. psittaci* dans les cellules HD11. Cela implique qu'ovoTF pourrait être utilisée pour prévenir des infections chlamydiales chez les animaux.

Par conséquent, l'ovoTF a été utilisée dans la **partie B du Chapitre 3** afin de prévenir une infection expérimentale de dindons SPF avec *Cp. psittaci*. Les animaux étaient exposés à l'ovoTF avant l'infection avec *Cp. psittaci* serovar/génotype D souche 92/1293 ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>). Les groupes 1 et 2 recevaient une dose unique de respectivement 10 et 5 mg d'ovoTF par dindon, tandis que le groupe 3 était traité quotidiennement avec 5 mg d'ovoTF par dindon pendant 12 jours consécutifs. Le quatrième groupe ne recevait pas de traitement. Les animaux infectés étaient hébergés pendant 12 jours dans des isolateurs sous pression négative et les symptômes cliniques étaient observés de façon journalière. Tous les trois jours, des prélèvements ont été pris pour évaluer l'excrétion bactérienne jusqu'à l'euthanasie au jour 12 après infection (a.i.). Durant la nécropsie, la pathologie et la réplication de *Cp. psittaci* dans différents tissus étaient examinées. Une dose unique de 10 mg d'ovoTF et une dose journalière de 5 mg d'ovoTF ne pouvaient pas prévenir l'infection des animaux par *Cp. psittaci*, mais pouvaient réduire les symptômes cliniques, les lésions macroscopiques et la réplication et l'excrétion bactérienne de façon significative en comparaison avec les animaux non-traités. Cette étude démontre donc clairement l'effet anti-chlamydiale *in vivo* de l'ovoTF et suggère que cette protéine peut également être appliquée de manière prophylactique dans les entreprises d'élevage.

Dans la **partie C du Chapitre 3** nous décrivons l'administration d'ovoTF dans deux études cliniques consécutives dans une entreprise belge d'élevage de dindons. Ces dindons avaient subi des infections respiratoires pendant les élevages précédents. Durant les deux études, l'effet de l'ovoTF sur la manifestation des infections par *Cp. psittaci* était observé, ainsi que l'effet sur des infections par *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) et le metapneumovirus aviaire (aMPV). Pendant la première étude clinique, les dindons recevaient une dose journalière de 5 mg d'ovoTF par animal à partir de l'âge de 2 semaines jusqu'à l'âge de 3.5 semaines. L'administration d'ovoTF se faisait par vaporisation avec un Atomist 1026. Par contre, lors de la deuxième étude clinique, l'ovoTF était non seulement administrée à l'âge de 2 semaines à 3.5 semaines, mais aussi dans la période entre la semaine 8 et la semaine 9.5 d'élevage. Il n'y eu pas de problèmes respiratoires pendant la première étude clinique jusqu'à l'âge de 9 semaines, d'où il ne fallait pas alors traiter les animaux avec des antibiotiques. Dans la semaine 9 de l'élevage, les dindons furent frappés par une infection avec *Cp. psittaci* et ORT. Par contre, la deuxième étude clinique montrait que l'administration journalière d'ovoTF pendant deux périodes (chaque fois 12 jours) peut améliorer la santé des animaux

pendant toute la durée de l'élevage. Des infections avec *Cp. psittaci*, ORT et aMPV étaient néanmoins toujours présentes, mais moins virulentes et les animaux ne souffraient pas de symptômes cliniques. De ce fait, il ne fallait pas traiter les dindons avec des antibiotiques.

Pour conclure, on peut dire que nous avons de nouveau démontré le risque zoonotique des infections par *Cp. psittaci* en décrivant la transmission simultanée de trois différents génotypes de *Cp. psittaci* de dindons infectés vers un vétérinaire. En outre, l'effet anti-chlamydiale de l'ovotransferrine a été évalué dans notre modèle de cellules HD11 et nous avons pu démontrer que l'administration d'aérosols d'ovotransferrine peut protéger aussi bien les dindons SPF que les dindons conventionnels contre la chlamydie aviaire. Dans un avenir proche, il serait possible de commercialiser l'ovotransferrine dans l'aviculture professionnelle comme un produit prophylactique, économique et facile à administrer.

## Summary



*Chlamydiaceae* are Gram-negative obligate intracellular bacteria invading eukaryotic cells. These bacteria can be readily distinguished from other microorganisms in their ability to perform a unique biphasic life cycle with infectious extracellular, but metabolically inactive elementary bodies (EBs) and intracellular metabolically active reticular bodies (RBs) (Vanrompay *et al.*, 1995a). Among these bacteria, *Chlamydophila (Cp.) psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) is responsible for respiratory disease in birds, like parrots, pigeons, ducks and turkeys, and psittacosis or parrot fever in humans. More than 475 bird species, both domestic and wild, have been found to be infected with *Cp. psittaci* (Kaleta & Taday, 2003). *Cp. psittaci* is spread mainly by inhalation of infectious particles. Exposure usually occurs when eye and nostril secretions or dried fecal droppings containing the bacteria are aerosolized and inhaled by a susceptible host (Burkhart & Page, 1971; Takahashi *et al.*, 1988; Cole, 1990). The commercial poultry industry is affected by considerable economic losses, especially when the animals are simultaneously infected with avian pathogenic *E. coli* (APEC), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) or avian metapneumovirus (aMPV) (Van Loock *et al.*, 2005a; 2006a). Being a zoonosis, *Cp. psittaci* can be transmitted to persons frequently in contact with infected birds such as veterinarians, poultry abattoir workers and pet bird keepers. Human psittacosis is characterized by a highly variable clinical presentation, ranging from unapparent to flu-like symptoms or pneumonia, and often remains undiagnosed.

Aerogenic *Cp. psittaci* transmission plays a central role in the conducted research. Besides illustrating the zoonotic nature of these bacteria, we wanted to prevent *Cp. psittaci* respiratory disease by use of aerosols of the natural anti-microbial protein ovotransferrin (ovoTF). The prophylactic use of aerosolized ovoTF was first evaluated in a pre-clinical setting in Specific Pathogen Free (SPF) turkeys reared in negative pressure isolators. Next, we performed a clinical trial on a Belgian turkey broiler farm.

**Chapter 1** of this report gives an overview of the taxonomy and infection biology of chlamydial infections and illustrates the role of the Type III secretion system. Moreover, different pathogens implicated in the multifactorial respiratory disease complex in the poultry industry are discussed, such as *Cp. psittaci*, ORT and aMPV, focusing mainly on prevalence, transmission, pathogenesis, clinical disease, treatment and public health significance.

Pet bird owners, veterinary surgeons and poultry workers are more at risk of contracting a *Cp. psittaci* infection because they are in close contact with birds. The zoonotic potential of *Cp. psittaci* was clearly illustrated in **Chapter 2** describing the zoonotic transmission of

*Cp. psittaci* from infected turkeys towards a veterinary scientist. Pharyngeal swabs from the turkeys and from the veterinarian handling the animals were found to be *Cp. psittaci* positive by using a combination of nested PCR, outer membrane protein A (*ompA*) genotype-specific quantitative real-time PCR and cell culture. This study was the first to illustrate a simultaneous transmission of three different *Cp. psittaci* (*ompA*) genotypes (genotypes D, F and E/B) from turkeys towards a person.

Currently, there are no vaccines or other prophylactic strategies to prevent chlamydiosis. Therefore, three naturally occurring antimicrobial proteins were tested for their potential to inhibit an experimental *Cp. psittaci* infection. The effect of ovotransferrin (ovoTF) and lactoferrin (LF) on the attachment and internalization of *Cp. psittaci* in a model of HD11 cells is presented in **part A of Chapter 3**. Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein (Metz-Boutigue *et al.*, 1984), the anti-microbial functions of which include destabilization and breaking down of T3SSs (Ochoa *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2003; Ochoa & Clearly, 2004). Ovotransferrin or conalbumin is the functional avian homolog of mammalian lactoferrin. Cytotoxicity of the proteins for HD11 cells was determined using live/dead cell counts in addition to a classical MTT-test. We studied the effect of these transferrins on extracellular *Cp. psittaci* in a first experiment, revealing that pre-incubation of the bacteria with 0.5 to 5 mg/ml ovoTF significantly diminished their infectivity for BGM cells. Treatment with human or bovine LF required a minimal concentration of 5 mg/ml to obtain a similar effect. Secondly, transferrins were tested for their ability to influence bacterial adhesion and entry in HD11 cells. To this end, maximal non-cytotoxic and non-bactericidal concentrations of 0.05 mg/ml ovoTF and 0.5 mg/ml hLF and bLF were applied at the time of inoculation. A double immunofluorescence staining revealed that ovoTF was more effective than human and bovine LF in inhibiting bacterial irreversible attachment and cell entry and the latter was accompanied by a dose-dependent reduction of actin recruitment at the bacterial entry site. However, when transferrins were administered at 3 h p.i., once the bacteria had entered HD11 cells, neither ovoTF nor LF had any effect on intracellular replication. These findings suggested a possible role for the use of transferrins, and especially ovoTF, in preventing avian *Cp. psittaci* infections *in vivo* as well.

Therefore, the use of ovoTF aerosols to prevent an experimental *Cp. psittaci* infection in SPF turkeys was explored in **part B of Chapter 3**. The animals were treated with aerosolized ovoTF prior to the infection with the *Cp. psittaci* serovar/genotype D strain 92/1293 ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>). Groups 1 and 2 received a single dose of respectively 10 and 5 mg ovoTF per turkey, group 3 received a daily dose of 5 mg ovoTF per turkey during 12 subsequent days



and group 4 served as untreated, infected control group. The infected animals were housed in negative pressure isolators during 12 days before being necropsied. Clinical signs were monitored daily and bacterial excretion was evaluated every three days. At necropsy, pathology and *Cp. psittaci* replication in various tissues was examined. A single dose of 10 mg ovoTF and a repeated daily dose of 5 mg ovoTF could not prevent the birds from becoming infected with *Cp. psittaci*, but they significantly reduced the outcome of the infection. A single dose of 5 mg ovoTF had no influence on the outcome of the infection as compared to the non-treated infected controls. This study clearly demonstrated the anti-chlamydial effect of ovoTF *in vivo* and its potential as a prophylactic measure on turkey broiler farms.

In **part C of Chapter 3**, ovoTF was administered on a Belgian turkey broiler farm during two subsequent clinical trials. The farm experienced respiratory disease during former broods. The influence on *Cp. psittaci* infection outbreaks as well as on concurrent infections such as *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and Avian metapneumovirus (aMPV) was examined. During the first clinical trial, the turkeys received a daily ovoTF aerosol dose of 5 mg per animal, starting at the age of 2 weeks until week 3.5. Aerosol administration was performed by use of an Atomist 1026 spraying device. In the second clinical trial, ovoTF was administered from week 2 until 3.5 and also from week 8 until week 9.5. During clinical trial 1, the turkeys were protected against respiratory disease until week 9 and no antibiotics were needed until then. At that time, the turkeys experienced a *Cp. psittaci* and ORT infection. Focussing on clinical trial 2, ovoTF administration significantly improved the health of the turkeys during the entire production period as compared to previous broods and no antibiotic treatment was needed. *Cp. psittaci*, ORT and aMPV infections still occurred but they were less virulent and passed without clinical manifestations.

In conclusion, we emphasized the zoonotic nature of *Cp. psittaci* infections by describing the simultaneous transmission of three different *Cp. psittaci* genotypes from infected turkeys to a veterinary scientist. Ovotransferrin proved its usefulness as an anti-chlamydial compound in our chicken monocyte/macrophage model and we illustrated the prophylactic use of aerosolized ovotransferrin to protect SPF and conventional turkeys against avian chlamydiosis. In this way, ovotransferrin could be marketed as a cost-effective and easy-to-administer prophylactic measure in large-scale turkey farms.



## References

- Aguilera, O., Quiros, L.M. & Fierro, J.F. (2003). Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett* **548**: 5-10.
- Andersen, A.A. (1991). Comparison of avian *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease analysis and serovar-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **29**: 244-249.
- Andersen, A.A. (1997). Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J Vet Diagn Invest* **9**: 159-164.
- Andersen, A.A. & Vanrompay, D. (2000). Avian chlamydiosis. *Rev Sci Tech* **19**: 396-404.
- Andersen, A.A. & Vanrompay, D. (2003). Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In *Diseases of Poultry*. Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R. & Swayne, D.E. (eds). Ames, Iowa 50014: Iowa State Press, pp. 863-879.
- Anderson, D.C., Stoesz, P.A. & Kaufmann, A.F. (1978). Psittacosis outbreak in employees of a turkey-processing plant. *Am J Epidemiol* **107**: 140-148.
- Appelmek, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., de Boer, H.A., MacLaren, D.M., de Graaff, J. & Nuijens, J.H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* **62**: 2628-2632.
- Arnold, R.R., Cole, M.F. & McGhee, J.R. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* **197**: 263-265.
- Arzey, G.G. & Arzey, K.E. (1990). Chlamydiosis in layer chickens. *Aust Vet J* **67**: 461.
- Ashida, K., Sasaki, H., Suzuki, Y.A. & Lonnerdal, B. (2004). Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals* **17**: 311-315.
- Bavoil, P.M., Hsia, R. & Ojcius, D.M. (2000). Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology* **146** ( Pt 11): 2723-2731.
- Bavoil, P.M. & Hsia, R.C. (1998). Type III secretion in *Chlamydia*: a case of deja vu? *Mol Microbiol* **28**: 860-862.
- Beeckman, D.S. (2009). *Examining the Role of Type III Secretion in the Biology and Intracellular Pathogenesis of Chlamydophila psittaci* PhD thesis, Ghent University, Ghent, Belgium, pp. 1-262.
- Beeckman, D.S., Geens, T., Timmermans, J.-P., Van Oostveldt, P. & Vanrompay, D.C. (2008). Identification and characterization of a type III secretion system in *Chlamydophila psittaci*. *Vet Res* **39**: 27.
- Beeckman, D.S., Meesen, G., Van Oostveldt, P. & Vanrompay, D. (2009). Digital titration: Automated image acquisition and analysis of load and growth of *Chlamydophila psittaci*. *Microsc Res Tech* **72**: 398-402.
- Beeckman, D.S., Van Droogenbroeck, C.M., De Cock, B.J., Van Oostveldt, P. & Vanrompay, D.C. (2007). Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. *Vet Res* **38**: 729-739.
- Beeckman, D.S. & Vanrompay, D.C. (2009). Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* **15**: 11-17.
- Beeckman, D.S. & Vanrompay, D.C. (2010a). Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Curr Issues Mol Biol* **12**: 17-41.

- Beeckman, D.S. & Vanrompay, D.C. (2010b). Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydia psittaci* strains in chicken macrophages. *Vet Microbiol* **141**: 342-353.
- Belland, R.J., Ouellette, S.P., Gieffers, J. & Byrne, G.I. (2004). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol* **6**: 117-127.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J.F. & Graf, T. (1979). Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* **18**: 375-390.
- Bevan, B.J. & Bracewell, C.D. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 2. Isolations of *Chlamydia psittaci* from birds sampled between 1976 and 1984. *J Hyg (Lond)* **96**: 453-458.
- Bracewell, C.D. & Bevan, B.J. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 1. Serological reactions to chlamydia in birds sampled between 1974 and 1983. *J Hyg (Lond)* **96**: 447-451.
- Brade, H. & Brunner, H. (1979). Serological cross-reactions between *Acinetobacter calcoaceticus* and chlamydiae. *J Clin Microbiol* **10**: 819-822.
- Brandenburg, K., Jurgens, G., Muller, M., Fukuoka, S. & Koch, M.H. (2001). Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biol Chem* **382**: 1215-1225.
- Burkhart, R.L. & Page, L.A. (1971). Chlamydiosis (ornithosis-psittacosis). Davis, J.W., Anderson, R.C., Karstad, L. & Trainer, D.O. (eds). Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 118-140.
- Bush, R.M. & Everett, K.D. (2001). Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 203-220.
- Campbell, L.A. & Kuo, C.C. (2004). *Chlamydia pneumoniae* - an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* **2**: 23-32.
- Capponi, M. & Haider, F. (1969). The causal agent of trachoma (*Chlamydia trachomatis*) in the PLT group: simple methods of identification. *C R Seances Soc Biol Fil* **163**: 1099-1102.
- Catelli, E., Cook, J.K., Chesher, J., Orbell, S.J., Woods, M.A., Baxendale, W. & Huggins, M.B. (1998). The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian pneumovirus in chickens. *Avian Pathol* **27**: 632-640.
- Clifton, D.R., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S., Carabeo, R.A., Fields, K.A. & Hackstadt, T. (2005). Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect Immun* **73**: 3860-3868.
- Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Carabeo, R.A. & Hackstadt, T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10166-10171.
- Cole, E.C. (1990). The *Chlamydiae*: Infectious aerosols in indoor environments. Proceedings of the ASTM Conference on biological contaminants in indoor environments, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 99-114.
- Cook, J.K., Ellis, M.M. & Huggins, M.B. (1991). The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. *Avian Pathol* **20**: 155-166.
- Delevoeye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A. & Subtil, A. (2008). SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog* **4**: e1000022.
- Dho-Moulin, M. & Fairbrother, J.M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**: 299-316.

- Di Biase, A.M., Tinari, A., Pietrantonio, A., Antonini, G., Valenti, P., Conte, M.P. & Superti, F. (2004). Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells. *J Med Microbiol* **53**: 407-412.
- Dreeses-Werringloer, U., Padubrin, I., Kohler, L. & Hudson, A.P. (2003). Detection of nucleotide variability in *rpoB* in both rifampin-sensitive and rifampin-resistant strains of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2316-2318.
- Dugan, J., Andersen, A.A. & Rockey, D.D. (2007). Functional characterization of IScs605, an insertion element carried by tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Microbiology* **153**: 71-79.
- Dugan, J., Rockey, D.D., Jones, L. & Andersen, A.A. (2004). Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial *inv*-like gene. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3989-3995.
- Ellison, R.T., III, Giehl, T.J. & LaForce, F.M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun* **56**: 2774-2781.
- Ellison, R.T., III, LaForce, F.M., Giehl, T.J., Boose, D.S. & Dunn, B.E. (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *J Gen Microbiol* **136**: 1437-1446.
- Engel, J. (2004). Tarp and Arp: How *Chlamydia* induces its own entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9947-9948.
- Escalante-Ochoa, C., Ducatelle, R., Charlier, G., De Vos, K. & Haesebrouck, F. (1999). Significance of host cell kinesin in the development of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* **67**: 5441-5446.
- Everett, K.D. (2000). *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet Microbiol* **75**: 109-126.
- Everett, K.D. & Andersen, A.A. (1997). The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 461-473.
- Everett, K.D., Bush, R.M. & Andersen, A.A. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 415-440.
- Fields, K.A., Mead, D.J., Dooley, C.A. & Hackstadt, T. (2003). *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol Microbiol* **48**: 671-683.
- Fukushi, H. & Hirai, K. (1992). Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 306-308.
- Ganapathy, K., Jones, R.C. & Bradbury, J.M. (1998). Pathogenicity of in vivo-passaged *Mycoplasma imitans* in turkey poults in single infection and in dual infection with rhinotracheitis virus. *Avian Pathol* **27**: 80-89.
- Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bönner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D.E. & Vanrompay, D. (2005a). Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J Clin Microbiol*: 2456-2461.
- Geens, T., Dewitte, A., Boon, N. & Vanrompay, D. (2005b). Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet Res* **36**: 787-797.
- Giansanti, F., Rossi, P., Massucci, M.T., Botti, D., Antonini, G., Valenti, P. & Seganti, L. (2002). Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* **80**: 125-130.
- Gomez, H.F., Ochoa, T.J., Carlin, L.G. & Cleary, T.G. (2003). Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *J Infect Dis* **187**: 87-95.

- Grayston, J.T., Wang, S.P., Kuo, C.C. & Campbell, L.A. (1989). Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **8**: 191-202.
- Gregory, D.W. & Schaffner, W. (1997). Psittacosis. *Semin Respir Infect* **12**: 7-11.
- Guionie, O., Toquin, D., Sellal, E., Bouley, S., Zwingelstein, F., Allee, C., Bougeard, S., Lemiere, S. & Etteradossi, N. (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *J Virol Methods* **139**: 150-158.
- Hackstadt, T., Fischer, E.R., Scidmore, M.A., Rockey, D.D. & Heinzen, R.A. (1997). Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol* **5**: 288-293.
- Hafez, H.M. & Lohren, U. (1990). Swollen head syndrome: clinical observations and serological examinations in West Germany. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **97**: 322-324.
- Hafez, H.M. & Sting, R. (1996). Serologic surveillance on *Ornithobacterium rhinotracheale* in poultry flocks using self-made ELISA. Proceedings of the 45<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Cancun, pp. 163-164.
- Hafez, H.M., Sting, R., Jodas, S. & Stadler, A. (1998). *Chlamydia psittaci* infections in meat turkey: investigations on the interaction with other avian infectious agents. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, pp. 208-217.
- Hallquist, N.A. & Klasing, K.C. (1994). Serotransferrin, ovotransferrin and metallothionein levels during an immune response in chickens. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* **108**: 375-384.
- Harkinezhad, T., Verminnen, K., van Droogenbroeck, C. & Vanrompay, D. (2007). *Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. *J Med Microbiol* **56**: 1097-1100.
- Hatch, G.M. & McClarty, G. (1998). Phospholipid composition of purified *Chlamydia trachomatis* mimics that of the eucaryotic host cell. *Infect Immun* **66**: 3727-3735.
- Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., de Jongh, B.M., Kaan, J.A., van Kessel, R., Lumeij, J.T., Visser, C.E. & Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2006a). An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J Med Microbiol* **55**: 1571-1575.
- Heddema, E.R., van Hannen, E.J., Duim, B., Vandenbroucke-Grauls, C.M. & Pannekoek, Y. (2006b). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerg Infect Dis* **12**: 1989-1990.
- Hinton, D.G., Shipley, A., Galvin, J.W., Harkin, J.T. & Brunton, R.A. (1993). Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust Vet J* **70**: 174-176.
- Hoare, A., Timms, P., Bavoil, P.M. & Wilson, D.P. (2008). Spatial constraints within the chlamydial host cell inclusion predict interrupted development and persistence. *BMC Microbiol* **8**: 5.
- Holst, P.A.J. (1987). *Gezondheidsrisico's van huisvogels: praktijksurvey en patiënt-controle onderzoek* Delft: Eburon.
- Horn, M. (2008). *Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **62**: 113-131.
- Hsia, R.C., Pannekoek, Y., Ingerowski, E. & Bavoil, P.M. (1997). Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol Microbiol* **25**: 351-359.
- Hughes, C., Maharg, P., Rosario, P., Herrell, M., Bratt, D., Salgado, J. & Howard, D. (1997). Possible nosocomial transmission of psittacosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18**: 165-168.
- Hung, A.L. & Alvarado, A. (2001). Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Dis* **45**: 999-1005.

- Hybiske, K. & Stephens, R.S. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11430-11435.
- Ibrahim, H.R., Iwamori, E., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (1998). Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochim Biophys Acta* **1401**: 289-303.
- Ibrahim, H.R., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (2000). Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1523**: 196-205.
- Ito, I., Ishida, T., Mishima, M., Osawa, M., Arita, M., Hashimoto, T. & Kishimoto, T. (2002). Familial cases of psittacosis: possible person-to-person transmission. *Intern Med* **41**: 580-583.
- Kaleta, E.F. & Taday, E.M. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol* **32**: 435-461.
- Keung, W.M. & Azari, P. (1982). Structure and function of ovotransferrin. II. Iron-transferring activity of iron-binding fragments of ovotransferrin with chicken embryo red cells. *J Biol Chem* **257**: 1184-1188.
- Lambert, L.A., Perri, H., Halbrooks, P.J. & Mason, A.B. (2005). Evolution of the transferrin family: conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **142**: 129-141.
- Laroucau, K., de Barbeyrac, B., Vorimore, F., Clerc, M., Bertin, C., Harkinezhad, T., Verminnen, K., Obeniche, F., Capek, I., Bebear, C., Durand, B., Zanella, G., Vanrompay, D., Garin-Bastuji, B. & Sachse, K. (2009). Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet Microbiol* **135**: 82-89.
- Laroucau, K., Thierry, S., Vorimore, F., Blanco, K., Kaleta, E., Hoop, R., Magnino, S., Vanrompay, D., Sachse, K., Myers, G.S., Bavoil, P.M., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2008). High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol* **8**: 171-181.
- Lenart, J., Andersen, A.A. & Rockey, D.D. (2001). Growth and development of tetracycline-resistant *Chlamydia suis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2198-2203.
- Longbottom, D. & Coulter, L.J. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* **128**: 217-244.
- Lublin, A., Shudari, G., Mechani, S. & Weisman, Y. (1996). Egg transmission of *Chlamydia psittaci* in turkeys. *Vet Rec* **139**: 300.
- Lugert, R., Kuhns, M., Polch, T. & Gross, U. (2004). Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **193**: 163-171.
- Macpherson, I., Watt, R.G. & Alexander, D.J. (1983). Isolation of avian paramyxovirus other than Newcastle disease virus from commercial poultry in Great Britain. *Vet Rec* **112**: 479-480.
- Mann, D.M., Romm, E. & Migliorini, M. (1994). Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J Biol Chem* **269**: 23661-23667.
- Martin-Mateo, M.C. & Planas, J. (1965). Conalbumin and serum iron transport in birds. I. Study in the chicken (*Gallus domesticus*). *Rev Esp Fisiol* **21**: 1-7.
- Matsumoto, A. (1973). Fine structures of cell envelopes of *Chlamydia* organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques. *J Bacteriol* **116**: 1355-1363.
- Matsumoto, A. (1982). Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. *J Bacteriol* **151**: 1040-1042.

- Matsumoto, A., Bessho, H., Uehira, K. & Suda, T. (1991). Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions. *J Electron Microsc (Tokyo)* **40**: 356-363.
- Matsumoto, A., Fujiwara, E. & Higashi, N. (1976). Observations of the surface projections of infectious small cell of *Chlamydia psittaci* in thin sections. *J Electron Microsc (Tokyo)* **25**: 169-170.
- Metz-Boutigue, M.H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. & Jolles, P. (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem* **145**: 659-676.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- NASPHV (2008). Compendium of Measures to Control *Chlamydothila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis). *National Association of State Public Health Veterinarians*.
- Naylor, C., Shaw, K., Britton, P. & Cavanagh, D. (1997). Appearance of type B avian Pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathol* **26**: 327-338.
- Naylor, C.J., Al Ankari, A.R., Al Afaleq, A.I., Bradbury, J.M. & Jones, R.C. (1992). Exacerbation of *Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. *Avian Pathol* **21**: 295-305.
- Newhall, W.J. & Jones, R.B. (1983). Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *J Bacteriol* **154**: 998-1001.
- Newman, C.P., Palmer, S.R., Kirby, F.D. & Caul, E.O. (1992). A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. *Epidemiol Infect* **108**: 203-210.
- Novak, M., Moldoveanu, Z., Schafer, D.P., Mestecky, J. & Compans, R.W. (1993). Murine model for evaluation of protective immunity to influenza virus. *Vaccine* **11**: 55-60.
- Ochoa, T.J. & Clearly, T.G. (2004). Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals* **17**: 257-260.
- Ochoa, T.J., Noguera-Obenza, M. & Cleary, T.G. (2004). Lactoferrin blocks the initial host cell attachment mechanism of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Adv Exp Med Biol* **554**: 463-466.
- Ochoa, T.J., Noguera-Obenza, M., Ebel, F., Guzman, C.A., Gomez, H.F. & Cleary, T.G. (2003). Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 5149-5155.
- Pattison, M., Chettle, N., Randall, C.J. & Wyeth, P.J. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet Rec* **125**: 229-231.
- Peters, J., Wilson, D.P., Myers, G., Timms, P. & Bavoil, P.M. (2007). Type III secretion a la *Chlamydia*. *Trends Microbiol* **15**: 241-251.
- Raulston, J.E., Davis, C.H., Schmiel, D.H., Morgan, M.W. & Wyrick, P.B. (1993). Molecular characterization and outer membrane association of a *Chlamydia trachomatis* protein related to the hsp70 family of proteins. *J Biol Chem* **268**: 23139-23147.
- Redmann, T., Kamphausen, L., Neumann, U. & Failing, K. (1993). Seroprevalence of turkey rhinotracheitis in Germany. *Prev Vet Med* **16**: 263-269.
- Redmann, T., Zeydanli, M.M., Herbst, W. & Kaleta, E.F. (1991). [Isolation of a paramyxovirus-3 from turkeys with respiratory tract disease in Germany]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **98**: 138-141.
- Roepke, D.C., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Sprenger, S.J. & Halvorson, D.A. (1998). Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. *Avian Dis* **42**: 219-221.



- Roshick, C., Iliffe-Lee, E.R. & McClarty, G. (2000). Cloning and characterization of ribonucleotide reductase from *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* **275**: 38111-38119.
- Rossi, P., Giansanti, F., Boffi, A., Ajello, M., Valenti, P., Chiancone, E. & Antonini, G. (2002). Ca<sup>2+</sup> binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Cell Biol* **80**: 41-48.
- Ryll, M., Hinz, K.H., Neumann, U. & Behr, K.P. (1994). [Pilot study of the occurrence of *Chlamydia psittaci* infections in commercial turkey flocks in Niedersachsen]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **101**: 163-165.
- Ryll, M., Hinz, K.H., Neumann, U., Behr, K.P., Kruse, W., Löhren, U. & Südbeck, M. (1997). Zu Pathogenität und Verbreitung der *Ornithobacterium rhinotracheale*-infection bei der Pute. Proceedings of the 52<sup>nd</sup> Meeting of the Fachgruppe 'Geflügelkrankheiten' der Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hannover, pp. 39-60.
- Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehrlich, R. & Slickers, P. (2008). Genotyping of *Chlamydochlamydia psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes. *BMC Microbiol* **8**: 63.
- Scidmore, M.A., Fischer, E.R. & Hackstadt, T. (2003). Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* **71**: 973-984.
- Senn, L., Hammerschlag, M.R. & Greub, G. (2005). Therapeutic approaches to *Chlamydia* infections. *Expert Opin Pharmacother* **6**: 2281-2290.
- Spadaro, M., Caorsi, C., Ceruti, P., Varadhachary, A., Forni, G., Pericle, F. & Giovarelli, M. (2008). Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J* **22**: 2747-2757.
- Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol B* **100**: 1-9.
- Stipkovits, L. & Kempf, I. (1996). Mycoplasmoses in poultry. *Rev Sci Tech* **15**: 1495-1525.
- Stuart, J.C. (1989). Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. In: Nixey, C. & Grey, T.C. (Eds.) London, Butterworth, pp. 217-224.
- Su, H., Watkins, N.G., Zhang, Y.X. & Caldwell, H.D. (1990). *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* **58**: 1017-1025.
- Subtil, A., Parsot, C. & Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **39**: 792-800.
- Subtil, A., Wyplosz, B., Balana, M.E. & Dautry-Varsat, A. (2004). Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity. *J Cell Sci* **117**: 3923-3933.
- Suwa, T., Ando, S., Hashimoto, N. & Itakura, C. (1990). Pathology of experimental chlamydiosis in chicks. *Nippon Juigaku Zasshi* **52**: 275-283.
- Takahashi, T., Takashima, I. & Hashimoto, N. (1988). Shedding and transmission of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected chickens. *Avian Dis* **32**: 650-658.
- Tamura, A., Matsumoto, A., Manire, G.P. & Higashi, N. (1971). Electron microscopic observations on the structure of the envelopes of mature elementary bodies and developmental reticulate forms of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol* **105**: 355-360.
- Ting, L.M., Hsia, R.C., Haidaris, C.G. & Bavoi, P.M. (1995). Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infect Immun* **63**: 3600-3608.
- Valenti, P. & Antonini, G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2576-2587.

- Valenti, P., Antonini, G., Fanelli, M.R., Orsi, N. & Antonini, E. (1982). Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 840-841.
- Valenti, P., Antonini, G., Von Hunolstein, C., Visca, P., Orsi, N. & Antonini, E. (1983). Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *Int J Tissue React* **5**: 97-105.
- Valnes, K. & Brandtzaeg, P. (1985). Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J Histochem Cytochem* **33**: 755-761.
- Van de Zande, S., Nauwynck, H., Cavanagh, D. & Pensaert, M. (1998). Infections and reinfections with avian pneumovirus subtype A and B on Belgian turkey farms and relation to respiratory problems. *Zentralbl Veterinarmed B* **45**: 621-626.
- Van de Zande, S., Nauwynck, H., De Jonghe, S. & Pensaert, M. (1999). Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathol* **28**: 239-244.
- Van de Zande, S., Nauwynck, H., Naylor, C. & Pensaert, M. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Vet Rec* **147**: 132-134.
- Van de Zande, S., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (2001). The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys. *Vet Microbiol* **81**: 353-365.
- Van de, Z.S., Nauwynck, H. & Pensaert, M. (2002). Efficacy of avian pneumovirus vaccines against an avian pneumovirus/*Escherichia coli* O2:K1 dual infection in turkeys. *Vet Rec* **150**: 340-343.
- van Droogenbroeck, C., Beeckman, D.S., Harkinezhad, T., Cox, E. & Vanrompay, D. (2008). Evaluation of the prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis in SPF turkeys. *Vet Microbiol* **132**: 372-378.
- van Droogenbroeck, C., Van Risseghem, M., Braeckman, L. & Vanrompay, D. (2009). Evaluation of bioaerosol sampling techniques for the detection of *Chlamydomphila psittaci* in contaminated air. *Vet Microbiol* **135**: 31-37.
- Van Empel, P. & Hafez, H.M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*, a review. *Avian Pathol* **28**: 217-227.
- Van Loock, M., Geens, T., De Smit, L., Nauwynck, H., Van Empel, P., Naylor, C., Hafez, H.M., Goddeeris, B.M. & Vanrompay, D. (2005a). Key role of *Chlamydomphila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. *Vet Microbiol* **107**: 91-101.
- Van Loock, M., Loots, K., Van Heerden, M., Vanrompay, D. & Goddeeris, B.M. (2006a). Exacerbation of *Chlamydomphila psittaci* pathogenicity in turkeys superinfected by *Escherichia coli*. *Vet Res* **37**: 745-755.
- Van Loock, M., Loots, K., Zande, S.V., Heerden, M.V., Nauwynck, H., Goddeeris, B.M. & Vanrompay, D. (2006b). Pathogenic interactions between *Chlamydomphila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys. *Vet Microbiol* **112**: 53-63.
- Van Loock, M., Verminnen, K., Messmer, T.O., Volckaert, G., Goddeeris, B.M. & Vanrompay, D. (2005b). Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydomphila psittaci* in turkeys. *BMC Infect Dis* **5**: 76.
- van Veen, L. (2000). [*Ornithobacterium rhinotracheale* infections in poultry: a review]. *Tijdschr Diergeneeskd* **125**: 113-116.
- Vanrompay, D., Andersen, A.A., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1993a). Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J Clin Microbiol* **31**: 134-137.
- Vanrompay, D., Butaye, P., Sayada, C., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1997a). Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res Microbiol* **148**: 327-333.
- Vanrompay, D., Butaye, P., Van Nerom, A., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1997b). The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults. *Vet Microbiol* **54**: 85-93.

- Vanrompay, D., Charlier, G., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1996). Ultrastructural changes in avian *Chlamydia psittaci* serovar A-, B-, and D-infected Buffalo Green Monkey cells. *Infect Immun* **64**: 1265-1271.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *Zentralbl Veterinarmed B* **39**: 105-112.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1995a). *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* **45**: 93-119.
- Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Hendrickx, W. (1993b). Primary pathogenicity of an European isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poults. *Vet Microbiol* **38**: 103-113.
- Vanrompay, D., Harkinezhad, T., van de Walle, M., Beeckman, D., van Droogenbroeck, C., Verminnen, K., Leten, R., Martel, A. & Cauwerts, K. (2007). *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg Infect Dis* **13**: 1108-1110.
- Vanrompay, D., Mast, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Goddeeris, B. (1995b). *Chlamydia psittaci* in turkeys: pathogenesis of infections in avian serovars A, B and D. *Vet Microbiol* **47**: 245-256.
- Vanrompay, D., Van Nerom, A., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1994). Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J Clin Microbiol* **32**: 1470-1474.
- Verminnen, K., Duquenne, B., De Keukeleire, D., Duim, B., Pannekoek, Y., Braeckman, L. & Vanrompay, D. (2008). Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* infection diagnostic platform for zoonotic risk assessment. *J Clin Microbiol* **46**: 281-285.
- Verminnen, K., Van Loock, M., Hafez, H.M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Vanrompay, D. (2006). Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydophila psittaci* antibodies in turkey sera. *Vet Res* **37**: 623-632.
- Vorland, L.H. (1999). Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS* **107**: 971-981.
- Ward, P.P., Paz, E. & Conneely, O.M. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2540-2548.
- Wilson, D.P., Timms, P., McElwain, D.L. & Bavoil, P.M. (2006). Type III secretion, contact-dependent model for the intracellular development of *Chlamydia*. *Bull Math Biol* **68**: 161-178.
- Wittenbrink, M.M., Mrozek, M. & Bisping, W. (1993). Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg: evidence of egg transmission. *Zentralbl Veterinarmed B* **40**: 451-452.
- Wu, H.F., Monroe, D.M. & Church, F.C. (1995). Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch Biochem Biophys* **317**: 85-92.
- Wyrick, P.B. (2000). Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* **2**: 275-282.
- Xie, H., Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M. & Rath, N.C. (2002). Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes. *Dev Comp Immunol* **26**: 805-815.
- Yuan, Y., Lyng, K., Zhang, Y.X., Rockey, D.D. & Morrison, R.P. (1992). Monoclonal antibodies define genus-specific, species-specific, and cross-reactive epitopes of the chlamydial 60-kilodalton heat shock protein (hsp60): specific immunodetection and purification of chlamydial hsp60. *Infect Immun* **60**: 2288-2296.
- Zaini, M.-Z., Tan, L.J. & Kamaruzaman, J. (2008). Phenotypic Characteristics, Antibiotic Susceptibility and Pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine* **5**: 133-142.

Zhang, J.P. & Stephens, R.S. (1992). Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* **69**: 861-869.





## Publicaties

**Beeckman DSA, Van Droogenbroeck CMAD, De Cock BJA, Van Oostveldt P and Vanrompay DGC, 2007.** Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. *Vet. Res.* 38 (5), 729-739.

**Van Droogenbroeck C, Beeckman DSA, Harkinezhad T, Cox E and Vanrompay D, 2008.** Evaluation of the prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis in SPF turkeys. *Vet. Microbiol.* 132 (3-4), 372-378.

**Van Droogenbroeck C, Beeckman DSA, Verminnen K, Marien M, Nauwynck H, de Thibault de Boesinghe L and Vanrompay D, 2009.** Simultaneous zoonotic transmission of *Chlamydophila psittaci* genotypes D, F and E/B to a veterinary scientist. *Vet. Microbiol.* 135 (1-2), 78-81. First two authors contributed equally to this publication.

**Van Droogenbroeck C, Dossche L, Wauman T, Phan TTT, Beeckman DSA and Vanrompay D.** Prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis. Submitted.

**Van Droogenbroeck C, Wauman T, Beeckman DSA and Vanrompay D.** From the lab to the farm, ovotransferrin as an anti-microbial against *Chlamydophila psittaci*. In preparation.







## Presentaties

### Congreslezingen

- Beeckman D, Van Droogenbroeck C and Vanrompay D, 2007.** Effect of transferrins on *Chlamydophila psittaci*. Program and Book of Abstracts of the 8th International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, Brasil, p. 92.
- Beeckman D, Van Oostveldt P and Vanrompay D, 2007.** *In vitro* effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion. Proceedings of the 5th Annual Workshop of COST action 855, Animal Chlamydiosis and its zoonotic implications. Pulawy, Poland, p. 9.
- Beeckman D, Van Droogenbroeck C, De Cock B, Van Oostveldt P and Vanrompay D, 2008.** Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. Abstracts of the 6. Deutscher Chlamydien-Workshop, Ulm, Germany, on line.
- Van Droogenbroeck C, Beeckman D, Harkinezhad T, Cox E and Vanrompay D, 2008.** Evaluation of the prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis in SPF turkeys. Abstracts of the 6. Deutscher Chlamydien-Workshop, Ulm, Germany, on line.
- Van Droogenbroeck C, Beeckman D, Harkinezhad T, Cox E and Vanrompay D, 2008.** Evaluation of the prophylactic use of ovotransferrin against chlamydiosis in SPF turkeys. Proceedings of the Sixth Meeting of the European Society for Chlamydia Research. Aarhus, Denmark, p. 110.
- Van Droogenbroeck C, Beeckman DSA, Cox E and Vanrompay D, 2008.** Effect of ovotransferrin on *Chlamydophila psittaci* infection in SPF turkeys. *World's Poultry Science Journal*, Volume 64, supplement 2, XXIII, p. 616. Brisbane, Australia.
- Beeckman D, Van Droogenbroeck C and Vanrompay D, 2009.** Effect of transferrins on *Chlamydophila psittaci*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128 (1-3), p. 268.
- Beeckman DSA, Van Droogenbroeck C and Vanrompay D, 2010.** Prophylactic use of transferrins against chlamydiosis. Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Conference on Modern Mucosal Vaccines, Adjuvants & Microbicides, Dublin, Ireland, on CD only.

### Posterpresentaties

- Vanrompay D, Beeckman D, De Cock B and Van Oostveldt P, 2007.** Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. Program and abstracts of the 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, Japan, p. 302.
- Beeckman DSA, Van Droogenbroeck CMAD, De Cock BJA, Van Oostveldt P and Vanrompay D, 2007.** Effect of ovotransferrin and lactoferrins on *Chlamydophila psittaci* adhesion and invasion in HD11 chicken macrophages. Annual Meeting of the Belgian Immunological Society, Macrophage Biology. Ghent, Belgium, p. 9.