

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Zdenka KRAMLJAK

***Chlamydia psittaci* PRI PTICAH – DOKAZOVANJE  
OKUŽB Z MOLEKULARNO METODO PCR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Zdenka KRAMLJAK

***Chlamydia psittaci* PRI PTICAH – DOKAZOVANJE OKUŽB Z  
MOLEKULARNO METODO PCR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

***Chlamydia psittaci* IN BIRDS – DETECTION OF INFECTIONS WITH  
MOLECULAR METHOD PCR**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 29.8.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Jožica Marin, za somentorico asist. dr. Darja Keše in za recenzentko doc. dr. Eva Ružić - Sabljic.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin  
Somentorica: asist. dr. Darja Keše  
Recenzentka: doc. dr. Eva Ružić - Sabljic

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR - BERTOK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
Članica: prof. dr. Jožica MARIN  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo  
Članica: asist. dr. Darja KEŠE  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo  
Članica: doc. dr. Eva RUŽIĆ - SABLJIĆ  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Zdenka Kramljak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.61+616-078: 577.2.08(043)=863
- KG *Chlamydia psittaci*/klamidioze/iztrebki ptic/molekularne tehnike /DNK/"nested"  
PCR/ epidemiologija/diagnostične metode
- AV KRAMLJAK, Zdenka
- SA MARIN, Jožica (mentorica)/KEŠE, Darja (somentorica)/RUŽIČ SABLJIČ, Eva  
(recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije
- LI 2006
- IN *Chlamydia psittaci* PRI PTICAH – DOKAZOVANJE OKUŽB Z  
MOLEKULARNO METODO PCR
- TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 67 str., 2 pregl., 12 sl., 128 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen naloge je bil uvedba metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) v diagnostiko okužb s *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) pri pticah. Spomladi leta 2005 smo iz Veterinarske klinike v Ljubljani pridobili brise kloake 61 ptic (57 golobov in 4 papig) in bris očesne veznice osebe, obbolele za konjunktivitisom. Brise smo do testiranja hranili v transportnem gojišču za klamidije (2SP) pri -70 °C. DNK *C. psittaci* smo iz kužnine osamili s kompletom reagentov QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija) po navodilu proizvajalca. Pomnoževanje odseka znotraj izolirane DNK smo izvedli z metodo "nested" PCR, za kar smo uporabili kit nemškega proizvajalca Genekam Biotechnology, AG. Dobljene pridelke, značilne za bakterijo *C. psittaci*, v velikosti 127 baznih parov, smo si ogledali z elektroforezo v agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom. Rezultati so pokazali, da noben izmed 50 okrasnih pasemskih golobov 10 različnih rejcev iz Slovenije ni bil okužen s *C. psittaci*. DNK *C. psittaci* smo dokazali pri 4 od 7 preiskanih prostoživečih golobov. Prav tako smo potrdili DNK *C. psittaci* pri dveh papigah, pri katerih je bila okužba s *C. psittaci* dokazana z metodo posredne in neposredne imunofluorescence. Dokazali smo, da je PCR primerna in hitra metoda za dokazovanje okužb s *C. psittaci* pri pticah. Z epidemiološkega stališča bi v prihodnje bilo smiselno pregledovati prostoživeče golobe.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.61+616-078: 577.2.08(043)=863
- CX *Chlamydia psittaci*/chlamydiosis/feces from birds/molecular techniques/DNA/  
nested PCR/epidemiology/diagnostic methods
- AU KRAMLJAK, Zdenka
- AA MARIN, Jožica (supervisor)/KEŠE, Darja (co-advisor)/ RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva  
(reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2006
- TI *Chlamydia psittaci* IN BIRDS – DETECTION OF INFECTIONS WITH  
MOLECULAR METHOD PCR
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 67 p., 2 tab., 12 fig., 128 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of this study was to evaluate the use of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) infections in birds. In spring 2005 we acquired 61 cloacal swabs of birds (57 pigeons and 4 cockatiels) and conjunctival swab of person with conjunctivitis from Veterinary clinic in Ljubljana. The swabs were placed into 2 SP *Chlamydia* transport medium and frozen at -70 °C until testing. *C. psittaci* DNA was extracted and purified from the swabs by using QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) following the manufacturer's protocol. Amplification of the segment inside isolated DNA was performed by using nested PCR method with commercial kit produced by Genekam Biotechnology, AG (Germany). Amplified products, of 127 base pair long specific for *C. psittaci* were visualized by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. Results shows that none of the 50 tested fancy pigeons of 10 different breeders from Slovenia was not infected with *C. psittaci*. We detected *C. psittaci* DNA in 4 of 7 examined wild pigeons. The presence of *C. psittaci* DNA was confirmed in two cockatiels in which infection was previously detected with direct and indirect immunofluorescence. We concluded that PCR test is a useful and rapid method for detection of *C. psittaci* DNA. From the epidemiological point of view the wild pigeons should be further examined in the future.

## KAZALO VSEBINE

	<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
	<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
	<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
	<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
	<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN NALOGE	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1	TAKSONOMIJA KLAMIDIJ	3
2.2	MORFOLOGIJA <i>C. psittaci</i>	6
2.3	RAZVOJNI KROG KLAMIDIJ	7
2.4	GENETIKA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i>	9
2.5	CELIČNA STENA BAKTERIJE <i>C. psittaci</i>	12
<b>2.5.1</b>	<b>Antigeni <i>C. psittaci</i></b>	<b>15</b>
2.6	METABOLIZEM KLAMIDIJ	16
2.7	PERZISTENCA KLAMIDIJ V GOSTITELJU	18
2.8	OKUŽBE S <i>C. psittaci</i> PRI ŽIVALIH	21
<b>2.8.1</b>	<b>Ptice</b>	<b>21</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Sesalci</b>	<b>24</b>
2.9	OKUŽBE S <i>C. psittaci</i> PRI ČLOVEKU	25
2.10	LABORATORIJSKO DOKAZOVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO <i>C. psittaci</i>	27
<b>2.10.1</b>	<b>Izolacija bakterije <i>C. psittaci</i> iz kužnine</b>	<b>28</b>
<b>2.10.2</b>	<b>Dokazovanje antigena</b>	<b>29</b>
<b>2.10.3</b>	<b>Serološke metode</b>	<b>29</b>
<b>2.10.4</b>	<b>Dokazovanje nukleinske kisline <i>C. psittaci</i></b>	<b>31</b>
2.10.4.1	Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)	31
2.10.4.2	Različice metode PCR	34

2.10.4.2.1	"Nested" PCR	34
2.10.4.2.2	"Multiplex" PCR	35
2.10.4.2.3	"Touchdown" PCR	35
2.10.4.2.4	PCR v realnem času	36
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>37</b>
3.1	ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE	37
3.2	OSAMITEV BAKTERIJSKE DNK	37
3.3	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	39
<b>3.3.1</b>	<b>Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR</b>	<b>39</b>
3.4	DOKAZOVANJE PRIDELKOV REAKCIJE PCR	42
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava agaroznega gela in elektroforeze</b>	<b>42</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava vzorcev in nanos v vdolbinice v gelu</b>	<b>42</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Pogoji elektroforeze in fotografiranje gela</b>	<b>42</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Kontrola kontaminacije</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>44</b>
4.1	DOKAZOVANJE DNK <i>C. psittaci</i> Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO	44
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>46</b>
5.1	RAZPRAVA	46
5.2	SKLEPI	51
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>54</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Biološke lastnosti in značilnosti bakterij iz vrst <i>Chlamydia</i> spp. (Keše, 2002: 322)	4
Preglednica 2: Rezultati dokazovanja okužb s <i>C. psittaci</i> z metodo PCR pri pticah in človeku	44



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Taksonomsko drevo reda <i>Chlamydiales</i> (Bush in Everett, 2001: 204)	5
Slika 2:	Razvojni krog klamidij (Beatty in sod., 1994: 687)	8
Slika 3:	Poravnane mape plazmidnih genomov klamidij (Thomas in sod., 1997: 1850)	10
Slika 4:	Celična ovojnica ET pri <i>C. psittaci</i> (Everett in Hatch, 1995: 881)	14
Slika 5:	Inkuzija klamidij znotraj epiteljske celice gostitelja (Wyrick, 2000: 279)	17
Slika 6:	Spremenjen razvojni krog klamidij (Beatty in sod., 1994: 688)	19
Slika 7:	a) nimfca ( <i>Nymphicus hollandicus</i> ) (Golob, 1994: 45) b) par skobčevk ( <i>Melopsittacus undulatus</i> ) (Golob, 1994: 60)	21
Slika 8:	a) prostoživeči golob ( <i>Columba livia domestica</i> ) (Sharon in McLaughlin, 1995: 114) b) staronemški galebček (Grmek, 1995) c) južnonemški telovničar (Grmek, 1995) č) nemški okrasni golob (levo), golob pismonoša (Grmek, 1995)	23
Slika 9:	Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Arko, 2004: 216)	32
Slika 10:	Vsebina reakcijske mešanice za prvi korak PCR v vzorcu, v pozitivni in negativni kontroli (Genekam Biotechnology AG, 2004)	40
Slika 11:	Vsebina reakcijske mešanice za drugi PCR v vzorcu, v pozitivni in negativni kontroli (Genekam Biotechnology AG, 2004)	41
Slika 12:	Gelska elektroforeza PCR <i>C. psittaci</i>	45

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
bp	bazni par
<i>C. pecorum</i>	<i>Chlamydia pecorum</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CRP	s cisteinom bogata beljakovina (angl. cysteine-rich protein)
DnaK	stresna beljakovina iz skupine Hsp70
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfati
ELISA	encimsko-imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ET	elementarno telesce
GroEL	stresna beljakovina iz skupine Hsp60
GTP	gvanozin trifosfat
IFU	angl. inclusion forming unit
INF- $\gamma$	gama interferon
KDO	3-deoksi-D-mano-2-oktulosonska kislina
LPS	lipopolisaharid
MOMP	poglavitna beljakovina zunanje ovojnice (angl. major outer membrane protein)
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
ORI	mesto začetka podvojevanja (angl. origin of replication)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
POMP (Pmp)	polimorfna beljakovina zunanje membrane (angl. polymorphic outer membrane protein)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
RNK	ribonukleinska kislina
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina

RT                      retikularno ali mrežasto telesce

RVK                    reakcija vezave komplementa

## 1 UVOD

*Chlamydia psittaci* (v nadaljnjem besedilu *C. psittaci*) je najbolj raznolika klamidijaska vrsta, saj je razširjena med pticami in sesalci (Andersen in Tappe, 1989).

*C. psittaci* je obligatna, znotrajcelična, citoplazemska, bazofilna in kokoidna bakterija. Je negibljiva, po Gramu pa se obarva negativno (Dovč, 1995). Vsebuje tako RNK kot DNK (Moulder, 1966).

Klamidija potrebuje za svoje razmnoževanje ATP gostiteljske celice, zato jo imenujemo tudi energijski parazit (Schachter, 1978a). Razvojni cikel te bakterije je bifazičen, predstavljata ga dve obliki, elementarno telo (ET) in retikularno telo (RT) (Ward, 1983). ET je metabolno neaktivna, zunajcelična, infektivna oblika organizma, velikosti od 0,2 do 0,3  $\mu\text{m}$  (Vanrompay in sod., 1995). Nasprotno pa je RT večja (0,6 – 0,8  $\mu\text{m}$ ), znotrajcelična in metabolno aktivna oblika organizma, ki je sposobna sintetizirati nukleinske kisline in beljakovine (Vanrompay in sod., 1995).

Okužbo s *C. psittaci* pri pticah imenujemo klamidioza (Dovč, 1994). Je zelo nalezljiva zooantroponoza, ki se pojavlja pretežno kot akutna, redkeje kot kronična respiratorna in sistemska okužba divjih in domačih pernatih živali (Dovč, 1995). Okužba se prenaša tudi s ptic na človeka. Najpogosteje so opisani prenos s papig, zato se za infekcijo pogosto uporablja izraz psitakoza (Dovč, 1998b). Glavni vir klamidijaskih okužb pri ljudeh so številne ptice (papige, kanarčki, race, purani, golobi, vrabci, kokoši, morski galebi). Človek se okuži z vdihavanjem aerosolnih delcev posušenih izločkov ptic ali pri obdelavi okuženega mesa. V nevarnosti za tovrstne okužbe so predvsem ljudje, ki se poklicno ukvarjajo s pticami, torej gojitelji ptic in perutnine, delavci v živalskih vrtovih in veterinarji (Keše, 2002).

Andersen (1991) in Vanrompay s sodelavci (1993) so razdelili ptičje izolate *C. psittaci* v 6 serotipov s serovar specifičnimi monoklonskimi protitelesi - serovar A, B, C, D, E in F. Serovar A se najpogosteje pojavlja pri papigah, serovar B pri golobih, serovar C pri racah

in goseh, serovar D pri puranih, serovar E pri golobih, nojih, emujih in puranih ter serovar F pri papigah.

Seve *C. psittaci* sesalcev pa razdelimo v 9 imunotipov z uporabo poliklonskih protiteles (Perez - Martinez in Storz, 1985).

Najučinkovitejši antibiotiki pri zdravljenju okužb s *C. psittaci* pri človeku so tetraciklini in makrolidi (Keše, 2002). Zelo pomembna za preprečevanje teh okužb sta nadzor nad ilegalnim in legalnim uvozom ptic in ugotavljanje morebitne klamidijske okužbe (Mallinson, 1989; Ritchie, 1989).

## 1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil uvedba PCR metode za dokaz okužbe s *C. psittaci* pri pticah. V ta namen smo pridobili brise kloake golobov in papig, ki smo jih hranili do preiskave v transportnem gojišču za klamidije pri -70 °C.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- uspešna izolacija DNK iz kloakalnih brisov ptic
- nizek delež pozitivnih rezultatov, ker so okužbe s *C. psittaci* redke

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TAKSONOMIJA KLAMIDIJ

Klinična znamenja bolezni, povzročene s *Chlamydia psittaci* pri ljudeh, je prvi opisal Juergensen leta 1874 (Schachter, 1989). Ritter je leta 1879 odkril, da gre za zoonozo (Dovč, 1994). Bolezen so najprej poimenovali psitakoza (gr. *psittacus* - papiga), kasneje tudi klamidioza, po bakteriji *C. psittaci* (Vanrompay in sod., 1995; Kaleta, 2003). Leta 1941 je Meyer uvedel še izraz ornitoza (gr. *ornithos* - ptica), ki je označevala okužbe ljudi s *C. psittaci* z drugimi vrstami ptic (Dovč, 1998a).

Tudi za bakterijo *Chlamydia psittaci* so uporabljali različna imena, po novi taksonomiji pa naj bi se uporabljalo ime *Chlamydophila (Cp.) psittaci* (Everett in sod., 1999).

Sprva so klamidije uvrščali med viruse, saj se lahko razmnožujejo samo v živih celicah. Menili so, da gre za velike viruse, ki so občutljivi na delovanje nekaterih antibiotikov. Sčasoma se je pokazalo, da so to bakterije, saj imajo obe vrsti nukleinskih kislin (DNK in RNK), celično steno, ki je podobna celični steni po Gramu negativnih bakterij in se razmnožujejo znotraj gostiteljske celice z delitvijo na dvoje. Edina skupna lastnost z virusi je obvezni znotrajcelični parazitizem (Schachter, 1978a).

Do povečanega zanimanja za klamidije je spet prišlo ob izbruhu pandemije psitakoze v letih 1929 - 1930. Z uvedbo kultivacijskih metod so lahko izolirali povzročitelja psitakoze pri ljudeh in pticah. Uporaba celičnih kultur za izolacijo bakterij je omogočila raziskovalcem podroben pogled v mikrobiologijo, epizootiologijo, serologijo, terapijo in patogenezo klamidij (Vanrompay in sod., 1995). V približno istem času so izolirali tudi klamidijo, ki povzroča lymphogranuloma venereum (Schachter, 1978a).

Ker klamidije niso bile edine obvezne znotrajcelične bakterije, jih je bilo potrebno ločiti od drugih bakterij (rikecij), ki rastejo in se razmnožujejo le v živih celicah. Ugotovili so, da klamidije ne morejo sintetizirati visokoenergijskih molekul ATP in GTP, da nimajo

citokromov in drugih komponent dihalne verige ter imajo edinstven razvojni cikel (Ward, 1983).

Page je leta 1966 je predlagal združitev mikroorganizmov, ki povzročajo psitakozo, lymphogranuloma venereum in trahom v rod *Chlamydia*. Bakterije, ki so bile podobne klamidijam po razvojnem ciklu, kemijskih in morfoloških značilnostih so uvrščali v red *Chlamydiales* in družino *Chlamydiaceae*. Rod *Chlamydia* so razdelili v vrsti *C. trachomatis* in *C. psittaci* (Page, 1966; Storz in Page, 1971).

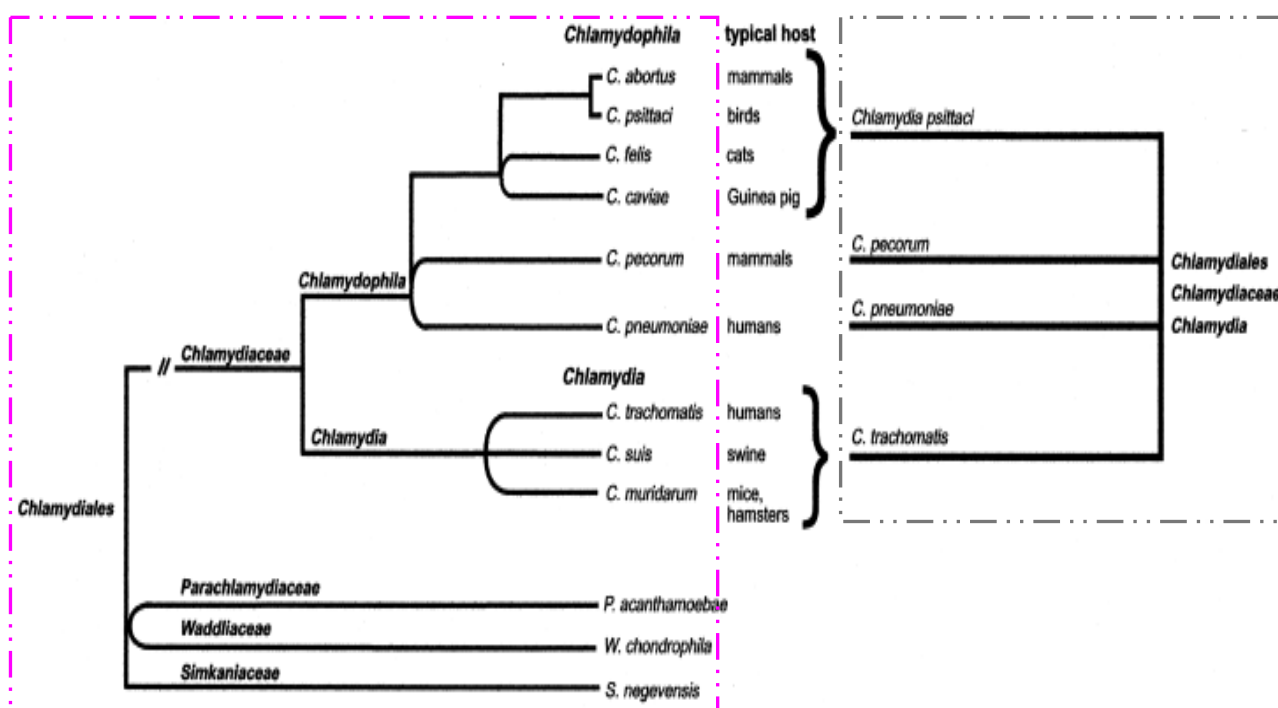
Bakterije vrste *C. trachomatis* in *C. psittaci* so ločili glede na prisotnost glikogena v inkluzijah in občutljivosti za sulfonamide. *C. trachomatis* tvori inkluzije z glikogenom (obarvanje z jodom) in je občutljiva za sulfonamide, medtem ko *C. psittaci* v inkluzijah nima glikogena in je odporna proti sulfonamidom (Ward, 1983).

Kasneje so odkrili še vrsti *C. pneumoniae* (Grayston in sod., 1989) in *C. pecorum* (Fukushi in Hirai, 1992). Kriteriji za razlikovanje teh dveh vrst so podobni: morfologija inkluzij, glikogen v inkluzijah, občutljivost za sulfonamide (Grayston in sod., 1989; Fukushi in Hirai, 1992). Kriterije za razvrstitev klamidij prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Biološke lastnosti in značilnosti bakterij iz vrst *Chlamydia* spp. (Keše, 2002: 322).

<b>ZNAČILNOSTI / VRSTE</b>	<b><i>C. trachomatis</i></b>	<b><i>C. pneumoniae</i></b>	<b><i>C. psittaci</i></b>	<b><i>C. pecorum</i></b>
<b>naravni gostitelj</b>	človek	človek	ptice in številni sesalci	govedo, ovce
<b>število serotipov</b>	15	1	1	3
<b>morfologija ET</b>	okrogla	hruškasta	okrogla	okrogla
<b>morfologija inkluzije</b>	ovalna, vakuolarna	ovalna, gosta	velika, gosta variabilna	ovalna, gosta
<b>glikogen v inkluzijah</b>	da	ne	ne	ne
<b>občutljivost za sulfonamide</b>	da	ne	ne	?

Na sliki 1b je prikazana razdelitev klamidij na osnovi biokemijskih, fizioloških, morfoloških in seroloških značilnosti ter hibridizacije DNK - DNK. Zaporedje baznih parov 16S rRNK je pri vrstah znotraj družine *Chlamydiaceae* enako v več kot 90 %. Z odkritjem štirih dodatnih klamidijam podobnih skupin, ki imajo več kot 80 % enako zaporedje 16S rRNK s klamidijami, je prišlo do reklasifikacije klamidij na podlagi 16S in 23S rRNK. V redu *Chlamydiales* so po novem štiri družine – *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* in *Waddliaceae* (Everett in sod., 1999). Novo razdelitev klamidij prikazuje slika 1a.



1a. NOVA RAZDELITEV

1b. STARA RAZDELITEV

Slika 1: Taksonomsko drevo reda *Chlamydiales* (Bush in Everett, 2001: 204).

Izpostavila bi družino *Chlamydiaceae*, ki se po novi taksonomiji razdeli na dva rodova - *Chlamydia* in *Chlamydophila*. V rodu *Chlamydia* so *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* in *Chlamydia suis*. V rodu *Chlamydophila* pa *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis* (Everett in sod., 1999). Izolate *C. psittaci*, ki so povezani s splavom pri prežvekovalcih (ovce, koze, govedo) ali z boleznimi pri mačkah



in morskih prašičkih, so po novi taksonomiji uvrstili v tri nove vrste - *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* in *Chlamydophila caviae* (Everett, 2000). Ptičji izolati *C. psittaci* pa po novi taksonomiji spadajo v vrsto *Chlamydophila psittaci* (Eidson, 2002).

## 2.2 MORFOLOGIJA *C. psittaci*

Bakterije *C. psittaci* so negibljive, imajo rigidno celično steno, ki se po Gramu obarva negativno. Njihova velikost je od 0,3 - 1,0  $\mu\text{m}$ , odvisno od tega, v kateri fazi razvojnega kroga se nahajajo (Page, 1968).

Vsebujejo DNK in RNK, prokariontske ribosome, sintetizirajo lastne proteine, nukleinske kisline in lipide, občutljive so na antibiotike (Wyrick in sod., 1989). Imajo dve morfološko različni razvojni obliki, elementarno telo (ET) in retikularno telo (RT) (Ward, 1983).

ET je majhno, sferično telo, premera 0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$ . To je infektivna oblika organizma, ki se veže na tarčno celico in vstopi vanjo. Vzrok za rigidnost ET naj bi bile disulfidne povezave med proteini zunanje membrane. Bakterije so v razvojni fazi ET negibljive, brez bičkov in pilov (Wyrick in sod., 1989).

RT je znotrajcelična, metabolno aktivna oblika, ki se deli z binarno delitvijo. Je večja od ET, premera 0,6 - 0,8  $\mu\text{m}$  in je osmotsko nestabilna. RT sintetizira lastno DNK, RNK in proteine. Imajo pa omejeno metabolično aktivnost, saj brez celice gostitelja niso sposobne pridobivati energijske ekvivalente v pentoznem ciklu ali vključiti piruvat v cikel trikarboksilnih kislin. So torej obvezni znotrajcelični zajedavci, za katere je značilen edinstven razvojni krog (Wyrick in sod., 1989).

Obe razvojni obliki imata nukleoid, citoplazemsko membrano in celično steno, vendar se molekularna sestava razlikuje (Ward, 1983).

## 2.3 RAZVOJNI KROG KLAMIDIJ

Razvojni krog klamidij lahko razdelimo na pet glavnih faz (Moulder, 1985):

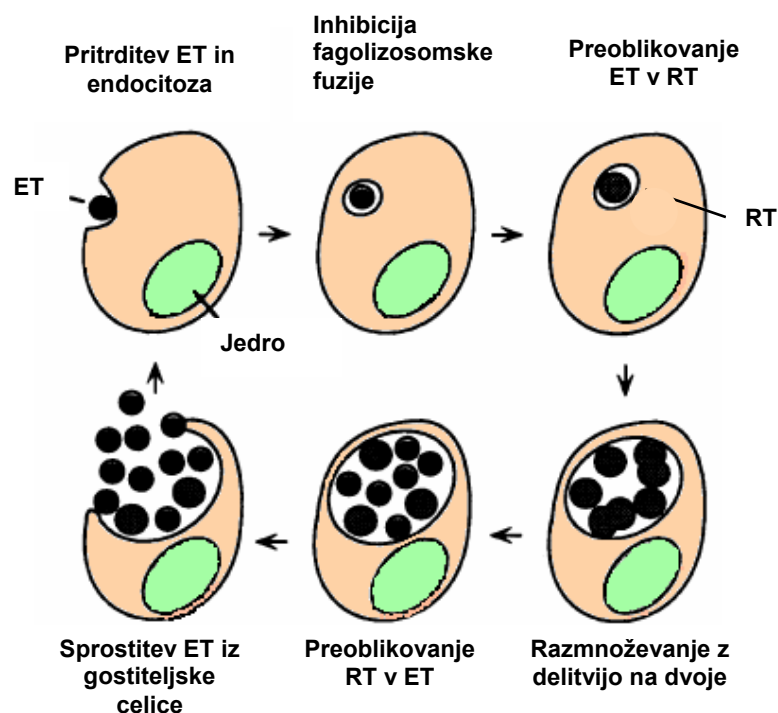
- pritrnitev in vstopanje ET v celice gostitelja - fagocitoza
- sprememba ET v metabolno aktivna RT
- rast in delitev RT
- dozorevanje neinfektivnih RT v infektivna ET
- sprostitvev ET iz gostiteljske celice

Okužba evkariontske celice se začne s pritrditvijo ET na receptorska mesta mikrovilov na epitelnih celicah. Membrane mikrovilov so področja, kjer poteka aktivni transport zunajceličnega materiala v celice. Pripenjanje bakterij na ta mesta omogoča hiter in zanesljiv vstop (Hodinka in Wyrick, 1986). Membrana gostiteljske in bakterijske celice sta hidrofobni in negativno nabiti zaradi karboksilnih skupin (Vance in Hatch, 1980). Možno je, da negativni naboj preprečuje tvorbo večjih skupkov bakterij, zato jih gostiteljska celica ne more fagocitirati (Escalante - Ochoa in sod., 1998). Pritrjevanje sevov *C. psittaci* je povečano v prisotnosti dvovalentnih kationov ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), ki zmanjšujejo elektrostatični odboj med evkariontsko in bakterijsko celico (Hatch in sod., 1981). K uspešni fagocitozi pa pripomorejo tudi hidrofobne sile (Escalante - Ochoa in sod., 1998). Pri vezavi klamidij so pomembni glikoproteini na površini bakterij in gostitelja (Schachter in Caldwell, 1980; Ward, 1983). Novejše raziskave kažejo pomembnost poglavitne beljakovine zunanje ovojnice (MOMP) pri vstopu klamidij v celice gostitelja. MOMP (angl. major outer membrane protein) deluje kot adhezin. Poveča nespecifične elektrostatične interakcije z evkariontsko celico, kar vodi v bolj specifične hidrofobne interakcije. Ena izmed možnosti je, da aminokislinski ostanki znotraj hidrofobne regije variabilne domene IV MOMP določajo specifičnost receptorja pri vezavi na gostiteljsko celico (Su in sod., 1990).

ET vstopijo v gostiteljsko celico z endocitozo in se nahajajo v inkluziji, ki nastane iz gostiteljeve citoplazemske membrane (Slika 2) (Beatty in sod., 1994; Keše, 2002). Do fuzije fagosoma z lizosomom ne pride (Friis, 1972). Zeichner (1983) je odkril 70 kDa velik protein na površini inkluzije, ki vsebuje ET, ki bi lahko imel vlogo pri preprečevanju

fuzije. Bakterije so obdane in zaščitene z membrano endosoma skozi ves razvojni krog (Wyrick in sod., 1989).

Približno 6 - 9 ur po vstopu se ET znotraj inkluzije povečajo, sintetizirajo ribosome in tvorijo RT (Ward, 1983). Začetno diferenciacijo ET v RT spremljajo spremembe strukture zunanje membrane. Pride do reduktivne cepitve disulfidnih prečnih povezav med beljakovino MOMP in drugimi proteini v zunanji membrani. Posledici reduktivnih sprememb sta povečana fluidnost in porinska aktivnost, kar omogoča večjo prepustnost, transport hranil in metabolno aktivnost RT. Le ta so osmotsko zato manj stabilna in mehansko bolj občutljiva. RT se nato delijo z binarno delitvijo, njihov podvojevalni čas traja približno 2 uri (McClarty, 1994). ATP, ki ga dobijo od gostiteljske celice, je potreben za transport lizina in drugih ključnih hranil v bakterijo. Delitev bakterijskih celic je tako v ravnovesju z metabolno aktivnostjo gostiteljske celice (Ward, 1983).



Slika 2: Razvojni krog klamidij (Beatty in sod., 1994: 687).

(ET = elementarno telo, RT = retikularno telo)

Po 16 do 20 ur po okužbi, se nekatera RT še podvajajo, medtem ko so druga že v procesu diferenciacije nazaj v infektivna ET. Poleg RT in ET lahko v tej fazi opazimo mnogo različnih vmesnih oblik, ki predstavljajo prehodne stopnje v diferenciaciji (McClarty, 1994).

Razvojni krog se zaključi, ko pride do lize gostiteljske celice ali do eksocitoze ET. V primeru *C. psittaci* so gostiteljske celice običajno močno poškodovane in so ET v 48 urah po začetni okužbi sproščene z lizo (Wyrick, 1989). Dolžina celotnega cikla klamidij variira od 48 do 72 ur, odvisno od bakterijskega seva, gostiteljske celice in pogojev v okolju (Beatty in sod., 1994).

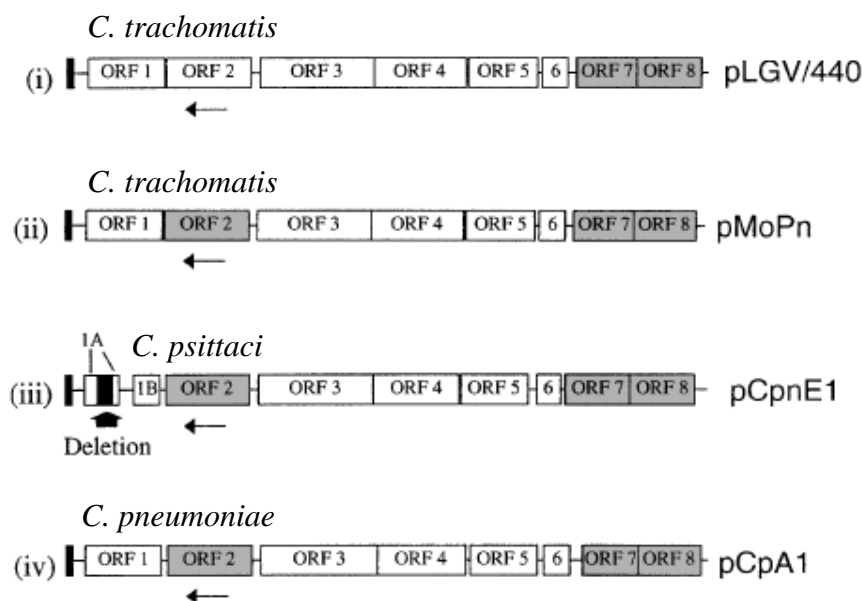
#### 2.4 GENETIKA BAKTERIJE *C. psittaci*

DNK – DNK hibridizacijske analize so pokazale, da je homologija DNK med različnimi sevi *C. psittaci* od 14 do 95 % (Fukushi in Hirai, 1989), medtem ko je med različnimi vrstami rodu *Chlamydia* manj kot 10 % odstotkov (Kingsbury in Weiss, 1968).

Sekvence genomske DNK v družini *Chlamydiaceae* so bile do sedaj objavljene za *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. pneumoniae*, *C. caviae* in *C. abortus*. Frutos in sod. (1989) so z uporabo pulzne gelske elektroforeze ocenili, da je velikost genoma *C. psittaci* 1,450,000 baznih parov.

Pri večini ptičjih izolatov *C. psittaci* so odkrili 7553 baznih parov velik plazmid, ki je enak na glede na ptičjega gostitelja (McClenaghan in sod., 1984; Thomas in sod., 1997). Poimenovali so ga pCpA1 (Thomas in sod., 1997). V nasprotju pa so v izolatih *C. psittaci* pri mačkah, konjih in prašičih našli plazmide različnih velikosti, medtem ko jih v izolatih *C. abortus*, ki povzroča splav pri sesalcih, sploh niso našli (Wyrick, 1989). Plazmidi klamidij vsebujejo 8 glavnih odprtih bralnih okvirjev (ORF1 - ORF8), dolžine več kot 100 aminokislin in kratke nekodirajoče regije med ORF, kar lahko vidimo na sliki 3. V znotrajgenski regiji med ORF1 in ORF2 se nahajajo 22 baznih parov dolge tandemske ponovitve, ki so močno ohranjene. ORF1 se nahaja takoj za mestom začetka podvojevanja (ORI). Obe verigi plazmida vsebujeta kodirajoče sekvence, ORF2 pa se nahaja na

komplementarnem delu verige (Thomas in sod., 1997). Vloga plazmidnih genov še ni znana, čeprav je prišlo med infekcijo *C. psittaci* v celični kulturi do izražanja nekaterih plazmidnih genskih produktov (Vanrompay, 1995). Izolati klamidij brez plazmidov kažejo, da le ti niso nujni za obstoj klamidij, lahko pa vplivajo na njihovo rast in virulenčne značilnosti (Thomas in sod., 1997).



Slika 3: Poravnane mape plazmidnih genomov klamidij (Thomas in sod., 1997: 1850).

Ob izbruhu ornitose v Angliji so v celicah rabe, ki je bila okužena s *C. psittaci*, s transmisijskim elektronskim mikroskopom pri klamidijah prvič opazili bakteriofag. Poimenovali so ga klamidiafag 1 (Chp1). Gre za 22 nm velik ikozaedrični virus, ki se podvaja v RT in spada v virusno družino *Microviridae*. Vsebuje enoverižno krožno DNK velikosti 4877 baznih parov, ki kodira 11 proteinov. Drugi podrobneje raziskan bakteriofag je bil klamidiafag 2 (Chp2) seva *C. psittaci*, ki okužuje ovce. Chp2 je prav tako krožen, vsebuje pa 4567 baznih parov. Njegova morfologija je podobna kot pri Chp1, povzroča pa drugačne citopatogene učinke v RT. Vloga beljakovin obeh klamidiafagov do sedaj še ni poznana, vendar pa primerjava Chp1 in Chp2 kaže ohranjenost glavnih značilnosti bakteriofagnega genoma. Ti podatki bodo v pomoč pri oblikovanju fagov kot vektorjev za klamidije (Liu in sod., 2000).

Tekom razvojnega kroga *C. psittaci* se izražajo različni geni in glede na to njihove produkte razdelimo v tri skupine - zgodnje, srednje in pozne.

Zgodnji prepisi začnejo nastajati 1 - 2 uri po okužbi. Med produkte zgodnjih prepisov spadajo homolog bakterijske glutamil - tRNK sintetaze, klamidijski S1 ribosomalni protein in proteina homologna GroEL in DnaK. GroEL in DnaK sta beljakovini stresnega odziva, njuna vloga je pravilno zvijanje in translokacija proteinov. Sinteza beljakovin stresnega odziva je ključna za obstoj in preobrazbo ET (Beatty in sod., 1994).

Wichlan in Hatch (1993) sta pri *C. psittaci* odkrila gen, ki se prav tako izraža zgodaj v razvojnem krogu in vsebuje odprt bralni okvir (ORF - open reading frame) dolžine 182 kodonov. Poimenovala sta ga *euo* (early upstream ORF). Gen *euo* od operona *crp* loči le gen, ki vsebuje zapis za homologa bakterijske glutamil - tRNK sintetaze. Homologe gena *euo* so kasneje odkrili še pri serovarih *C. trachomatis* D in L2 in pri sevu *C. psittaci* GPIC (angl. guinea pig inclusion conjunctivitis) (Zhang in sod., 1998). Beljakovina EUO naj bi imela pomembno vlogo v preobrazbi metabolno neaktivnih ET v aktivno deleča se RT, zato predvidevajo, da ta gen nima homologa pri prosto živečih, neparazitskih, organizmih in ga v genski bazi podatkov tudi niso našli (Wichlan in Hatch, 1993). Proteina EUO je količinsko manj kot beljakovine MOMP in ga ne najdemo v ET, nastane pa kmalu po vstopu ET v gostiteljsko celico. Količina beljakovine EUO doseže vrh na sredini razvojnega kroga in se zmanjšuje proti koncu kroga, ko se RT pretvorijo v ET (Zhang in sod., 1998). Kaul in sod. (1997) so pokazali, da je produkt gena *euo* proteaza, ki specifično reže končni karboksilni konec Hc1, kar povzroči razpad kompleksa DNK – Hc1. Posledica je dekonenzacija kromatina. Pri tem ostane N - terminalni del Hc1 nedotaknjen (Kaul in sod., 1997).

Srednji prepisi nastanejo 6 ur po okužbi, ko RT rastejo in se delijo. Najpomembnejši protein, ki nastane v tej fazi je glavni protein zunanje membrane (MOMP) (Millman in sod., 2001). Gen *ompA* (včasih imenovan *omp1*), ki kodira MOMP, vsebuje pet relativno ohranjenih in štiri variabilna področja (VS1 - VS4) (Vretou in sod., 2001; Millman in sod., 2001). Variabilna področja vsebujejo epitope, specifične za podvrsto in serovar bakterije *C. psittaci* (Millman in sod., 2001). Promotorjev za gen *ompA* pri *C. psittaci* je več in

zagotavljajo dodatne prepise tega gena do začetka binarne delitve RT. Sekvenčna analiza promotorskih zaporedij je pokazala, da so bogata z nukleotidoma A (adenin) in T (timin), kar omogoča vezavo polimeraze RNK (Yuan in sod., 1990). Sekvenčna podobnost gena *ompA* pri *C. psittaci* in *C. trachomatis* je 68 %, pri *C. psittaci* in *C. pneumoniae* pa 71 %. Makromolekule kot je MOMP, ki so ohranjene znotraj rodu *Chlamydia*, služijo kot molekularni kronometri za ugotavljanje evolucijske oddaljenosti med vrstami (Kaltenboeck, 1993).

Pozni prepisi nastanejo 20 ur po okužbi, ko pride do spremembe RT v ET. Produkti so proteini ovojnice, DNK vezavni proteini, s cisteinom bogati proteini, homologa evkariontskega histona H1 (Beatty in sod., 1994). V pozni fazi razvojnega kroga pride do aktivacije operona *crp*. Le ta vsebuje zapis za dva s cisteinom bogata proteina ovojnice (*omcA*, *omcB*) in dva gena, ki kodirata histonom podobna proteina, Hc1 in Hc2. Prepisovanje genov v operonu *crp* je odvisno od glavnega sigma faktorja klamidij. Regulacija tako ne poteka preko kaskade alternativnih sigma faktorjev, kot pri bakterijah z drugačnimi razvojnimi značilnostmi (Zhang in sod., 1998).

Kromatin je v ET stabiliziran s proteini, ki kažejo sekvenčno homologijo z evkariontskim histonom H1. Hc1 (*hctA*) in Hc2 (*hctB*) imata pomembno vlogo pri vzpostavitvi strukture nukleoida in pri regulaciji ekspresije genov, ko se RT pretvarjajo nazaj v ET. Izražanje gena *hctA* in aktivnost Hc1 sta regulirana transkripcijsko in post - transkripcijsko. Proteina delujeta tudi kot globalna regulatorja izražanja genov klamidij tako, da preprečita prepisovanje DNK (Grleshaber in sod., 2006). Znotraj vrste je gen *hctA* popolnoma ohranjen, medtem ko se med različnimi vrstami klamidij kažejo razlike. Tako je pri *C. psittaci* protein Hc1 iz 117 aminokislin, pri *C. trachomatis* pa iz 125 aminokislin (Kaul in Wenman, 1998).

## 2.5 CELIČNA STENA BAKTERIJE *C. psittaci*

Vsebnost sestave lipidov in aminokislin v celični steni klamidij je podobna tisti pri po Gramu negativnih bakterijah, v zunanji membrani najdemo tudi lipopolisaharid (McCoy in sod., 2003).

Med znanstveniki se še danes poraja vprašanje ali celična stena klamidij vsebuje peptidoglikan, ki ga običajno najdemo pri po Gramu negativnih bakterijah. Beatty in sod. (1994) navajajo, da so klamidije med redkimi prokarionti, ki v celični steni nimajo peptidoglikana, temveč imajo verjetno pentapeptidu podobne strukture. Številni neuspeli poskusi detekcije peptidoglikana pri klamidijah kažejo na njegovo odsotnost. Niso ga uspeli zaznati z elektronsko mikroskopijo, protitelesa proti peptidoglikanu niso reagirala s klamidijami, s plinsko - kromatografsko spektrometrijo niso zaznali muraminske kisline, označevalca za peptidoglikan. Kljub temu, da klamidije ne vsebujejo peptidoglikana, imajo v genomu zapis za gene potrebne za sintezo peptidoglikana (McCoy in sod., 2003). Tudi če so prisotne analitsko nedokazljive količine peptidoglikana, le ta ni pomemben pri ohranjanju strukturne celovitosti ET in RT. Obstaja možnost, da ima peptidoglikan primarno vlogo pri delitvi RT in morda pri prehodu RT v ET. Klamidije v svojem genomu nimajo gena *ftsZ*, ki je močno ohranjen pri drugih bakterijah in ima pomembno vlogo pri celični delitvi. Posledično ima morda zato peptidoglikan netipično vlogo pri celični delitvi klamidij (Chopra in sod., 1998).

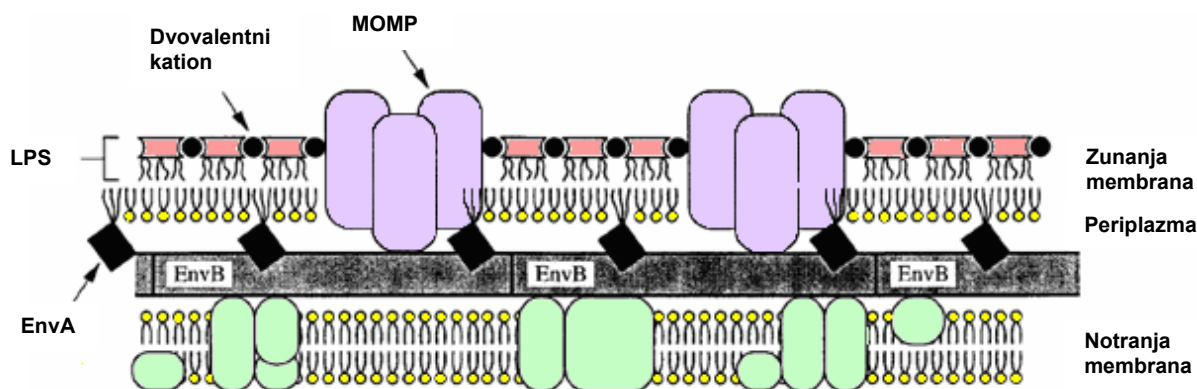
Vsekakor pa v celični steni klamidij opazimo strukturo, ki spominja na peptidoglikan. Celično ovojnico pri ET in RT sestavljata zunanja in notranja, citoplazemska, membrana. Rigidnost in osmotsko stabilnost ET naj bi omogočala prisotnost 40 kDa velike poglavitne beljakovine zunanje ovojnice (MOMP) in najmanj treh beljakovin bogatih s cisteinom v ovojnici ET, ki so med seboj prečno povezani z disulfidnimi vezmi v supramolekularno mrežo. Nasprotno pa v zunanji membrani RT ni dovolj proteinov bogatih s cisteinom in beljakovine MOMP, zato ne pride do močnih prečnih povezav (Hatch in sod., 1986).

Proteini zunanje membrane so najpomembnejše virulenčne determinante klamidij, saj so ključni v procesu pripenjanja, vstopanja in pri preprečevanju zlitja z lizosomi (Wyllie in sod., 1998). Prevladujoči proteini v prečno povezanem kompleksu so proteini MOMP, ki predstavljajo 60 % odstotkov proteinov zunanje membrane (McClarty, 1994). MOMP naj bi bil lociran v zunanji membrani in je izpostavljen na površini. Izpostavljen pa je tudi periplazmi, kar sovpada z domnevo, da je MOMP porin. MOMP je prav tako navzoč v RT v času delitve, vendar ne tvori prečnih povezav (Everett in Hatch, 1995). Sekundarno strukturo MOMP predstavljajo  $\beta$  - lističi (62 %), kar je značilnost bakterijskih porinov.



Vgradnja MOMP v lipidni dvosloj naj bi bila avtokatalitična, podobno kot pri drugih bakterijskih porinih. Vsaka molekula MOMP se usidra v dvosloj kot trimer. Spremembo ET v RT spremlja redukcija disulfidnih vezi v zunanji membrani, kar poveča njeno prepustnost. Porinska funkcija MOMP je uporabljena v fazi RT in omogoča sprejem gostiteljskega ATP in drugih hranil (Wyllie in sod., 1998).

V nasprotju pa s cisteinom bogate beljakovine najdemo v celični ovojnici le pozno v razvojnem krogu, to je 18 - 24 ur po okužbi, ko se podvojevanje RT upočasni in se začnejo spreminjati nazaj v ET. S cisteinom bogata beljakovina *C. psittaci* (EnvA), velika 12 kDa, je lipoprotein s podoben strukturo kot jo ima Braunov lipoprotein pri *Escherichia coli*. Večja s cisteinom bogata beljakovina *C. psittaci* (EnvB) je posttranslacijsko modificirana v dva proteina, velika približno 60 kDa. EnvA in EnvB sta prostorska in funkcionalna analoga mureinskega lipoproteina in peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah. Oba proteina vsebujeta tipični signalni peptidazi z različnim mestom rezanja. Prisotnost sekvenc za signalno peptidazo nakazuje, da se nahajata v notranji, zunanji membrani ali v periplazemskem prostoru (Everett in Hatch, 1995). Model celične ovojnice *C. psittaci* je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Celična ovojnica ET pri *C. psittaci* (Everett in Hatch, 1995: 881).

Lipopolisaharid (LPS) klamidij sestavljata lipid A, na katerega je vezan središčni polisaharid. Središčni polisaharid je trisaharid KDO(2-8)KDO(2-4)KDO, katerega osnova je 3-deoksi-D-mano-2-oktulosonska kislina (KDO), ki se povezuje z (2-8) in (2-4) vezmi. Vez (2-8) je specifična za klamidije in je pri ostalih, po Gramu negativnih bakterijah, ne

zasledimo (Heine in sod., 2003). Analize zgradbe LPS pri *C. psittaci* so pokazale, da so KDO, glukozamin, organsko vezan fosfat in maščobne kisline prisotne v razmerju 3,3 : 2 : 1,8 : 4,6 (Rund in sod., 2000). LPS pri bakteriji *C. psittaci* in *C. trachomatis* se razlikuje v vsebnosti KDO. Pri prvi ga je 28 % odstotkov, pri drugi pa 20 % odstotkov. Pri omenjenih bakterijah je prisoten tudi različen vzorec acilacije lipida A. Profil maščobnih kislin pri *C. psittaci* je pokazal tudi navzočnost neobičajnih 3 - hidroksi maščobnih kislin z 18 - 22 ogljikovimi atomi in številnih nehidroksiliranih maščobnih kislin med katerimi se nahajajo izo - in anteizo - povezane maščobne kisline (Brade in sod., 1986).

### 2.5.1 Antigeni *C. psittaci*

Klamidije imajo za tip, vrsto in rod specifične antigene (Andersen in Tappe, 1989).

Klamidijam je skupen specifičen lipopolisaharidni antigen (LPS), ki je ohranjen znotraj rodu (Rockey in sod., 2000). Zaradi taksonomskih sprememb sedaj predstavlja za družino in ne več za rod specifičen epitop (Heine in sod., 2003). LPS klamidij je najbolj podoben nekaterim antigenom po Gramu negativnih bakterij, kar je eden od možnih vzrokov za lažno pozitivne reakcije v diagnostiki klamidijskih okužb. LPS antigen je termostabilen (Caldwell in Hitchcock, 1984). Na LPS antigenu so tri antigenska področja. Dva sta skupna nekaterim gramsko negativnim bakterijam, le eden pa je specifičen za rod klamidij (Fu in sod., 1992). Brade in sod. (1986) so preučevali imunogene in antigenske značilnosti LPS *C. psittaci* tako, da so imunizirali zajce s formalinom ubitimi elementarnimi telesi *C. psittaci*. Vse živali so se odzvale na tujek s produkcijo visokega titra protiteles IgM. Ugotovili so, da LPS *C. psittaci*, poleg epitopa specifičnega za rod *Chlamydia*, vsebuje tudi za vrsto specifičen epitop, ki se nahaja v ogljikohidratnem delu LPS (Brade in sod., 2000). V nasprotju z ostalimi, po Gramu negativnimi, bakterijami kaže LPS klamidij nizko endotoksično aktivnost (Heine in sod., 2003). Ena izmed možnih razlag za to je, da so se klamidije skozi evolucijo na ta način prilagodile na znotrajcelično perzistenco v gostitelju (Brade in sod., 2000).

Variabilni epitopi, ki določajo serotipe, se nahajajo na MOMP, ki je najbolj raziskan antigen klamidij. MOMP je v zunanji membrani prisoten kot disulfidno povezan oligomer.

Je glavni imunogen pri naravni okužbi. Protitelesa usmerjena proti MOMP v *in vitro* pogojih nevtralizirajo infektivnost klamidij (Pickett in sod., 1988). MOMP je porin, ki omogoča vstop ključnih molekul in hranil v bakterijsko celico in izstop virulenčnih faktorjev (Bush in Everett, 2001). Na MOMP so tudi pomembni epitopi za T - celice (Millman in sod., 2001). Protitelesa proti MOMP ščitijo pred okužbo. MOMP zato ostaja prvi kandidat za cepivo (Wyllie in sod., 1998).

V inkluzijski membrani klamidij se nahajajo tudi proteini Inc (inclusion membrane proteins). Pri *C. psittaci* so identificirali tri genske produkte - IncA, IncB, IncC. Antiserum proti vsakemu izmed proteinov Inc specifično označi klamidijsko membrano. Funkcija teh proteinov pa zaenkrat ostaja še neznanka (Rockey in sod., 2000).

V klamidijski celični steni je prisotnih tudi več proteinov POMP ali Pmp (angl. polymorphic outer membrane protein). Pri *C. psittaci* so odkrili šest različnih POMP v *in vitro* pogojih, v tkivni kulturi. Gre za antigenske molekule velikosti 90 ali 91 kDa. Ker se nekateri izmed njih nahajajo na celični površini klamidij, lahko predpostavimo njihovo vlogo pri pritrjevanju, molekularnem transportu ali pri signalizaciji. Nobena izmed teh vlog pa še ni bila dokazana v laboratoriju (Rockey in sod., 2000).

## 2.6 METABOLIZEM KLAMIDIJ

Klamidije so odvisne od energije evkariontske celice, zato jih imenujemo tudi "energijski paraziti" (Moulder, 1969). Znotraj gostitelja so obdane z membrano inkluzije, preko katere poteka transport ključnih molekul v klamidijsko celico (Wyrick, 2000).

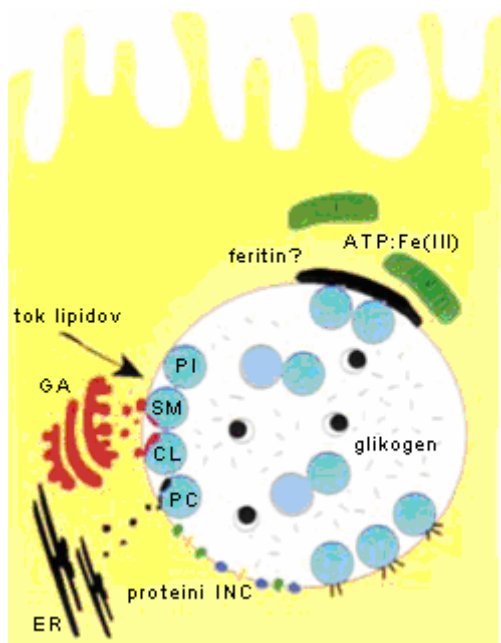
Vse bakterije potrebujejo osnovne gradnike (aminokislino, nukleotide, nukleotidne sladkorje in maščobne kisline) za izgradnjo makromolekul (proteini, DNK, RNK, lipidi, LPS in murein), ki tvorijo celico. Proizvodnja energije in redukcijske moči, ki je potrebna za biosintezo, predstavlja zahtevno nalogo za vsako celico (McClarty, 1994).

Klamidije so s prilagoditvijo na znotrajcelični način življenja izgubile lastni sistem za pridobivanje energije, obdržale pa so pomembne biosintetske zmožnosti. Tako najdemo pri

njih elemente glikolize, dihanja in biosinteze pentoz, nimajo pa encimov potrebnih za neto produkcijo ATP (Beatty in sod., 1994).

Tekom evolucije so klamidije razvile pomembno prilagoditev, ki jim omogoča uporabo ATP gostiteljske celice s pomočjo specifičnih prenašalnih proteinov. Ti transmembranski proteini katalizirajo vnos ATP gostitelja v prokariotsko celico preko bakterijske celične membrane. Le ta je drugače neprepustna za relativno velike in nabite molekule. V obratni smeri pa ti transportni proteini iznašajo bakterijski ADP nazaj v gostiteljski citosol (Schmitz - Esser in sod., 2004). Slika 5 prikazuje rast klamidij znotraj z membrano obdane inkluzije.

V mitohondriju in kloroplastih poteka vnos ADP in iznos ATP s pomočjo ATP - ADP translokaze, encima v adenilat - nukleotid transportnem sistemu. Translokaza sklopi iznos ATP, ki nastane z oksidativno ali fotosintetsko fosforilacijo, s prevzemom ADP. Pri klamidijah pa ATP - ADP translokaza deluje v obratni smeri (Moulder, 1991).



Slika 5: Inkuzija klamidij znotraj epitelijske celice gostitelja (Wyrick, 2000: 279).

(ER = endoplazemski retikulum; GA = Golgijev aparat; CL = holesterol  
PI = fosfatidilinozitol; SM = sfingomielin; PC = fosfatidilholin)

Pri okužbi evkariontskih celic s *C. psittaci* so opazili, da so mitohondriji v tesni povezavi z vakuolo klamidij. Možna razlaga za ta pojav je, da je zaradi fizične bližine pospešen prenos ATP iz mitohondrija v bakterijsko celico (Escalante - Ochoa in sod., 1998).

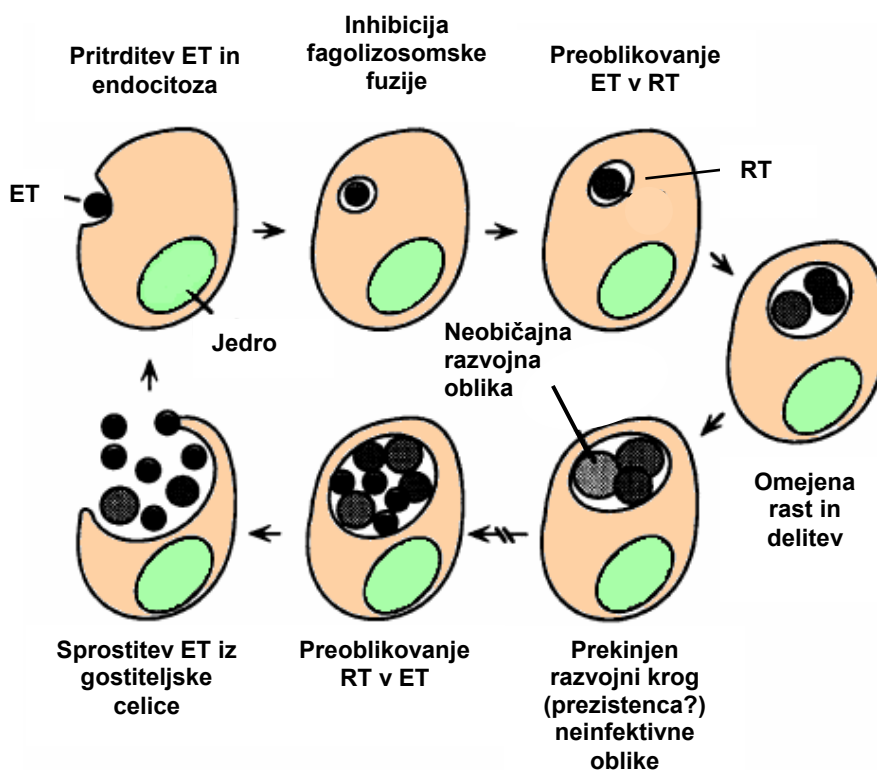
Pri nastajanju inkluzije je pomemben vnos veziklov iz Golgijevega aparata, ki vsebujejo sfingomielin, fosfatidilinozitol, fosfatidilholin in holesterol. Omenjene molekule so ključne za strukturno celovitost inkluzijske membrane. Metabolno aktivna RT proizvedejo tudi proteine Inc, ki se prav tako vgradijo v membrano in skupaj z izrastki na površini, ki kažejo podobnost z bički bakterij, omogočajo vnos železa in hranil iz gostiteljske citoplazme (Wyrick, 2000).

## 2.7 PERZISTENCA KLAMIDIJ V GOSTITELJU

Pojem "perzistenca" opisuje dolgoročno povezavo med klamidijo in njenim gostiteljem. Klamidija je prisotna v gostitelju, vendar je z gojenjem v tkivni kulturi ne moremo zaznati. Pojem "perzistentna" okužba pomeni odsotnost bakterijske rasti in razmnoževanja (Beatty in sod., 1994).

Perzistenco je potrebno razločevati od okužb, pri katerih je razmnoževanje klamidij navzoče in jih povezujemo z izrazoma "subklinična" okužba in "asimptomatska" okužba. Slednji opisujeta klamidijske okužbe, pri katerih so klinični znaki neznačilni za okužbo s klamidijami ali pa se klinični znaki ne razvijejo (Beatty in sod., 1994).

Perzistenco pri klamidijah lahko primerjamo z latenco pri virusih. Kljub precejšnim razlikam med obema mikroorganizmoma, je pri obeh normalni razvojni krog prekinjen. Prekinitve normalnega razvojnega kroga pri klamidijah so povezane z nastankom neobičajnih (aberantnih) razvojnih oblik (Beatty in sod., 1994), kar prikazuje slika 6.



Slika 6: Spremenjen razvojni krog klamidij (Beatty in sod., 1994: 688).

Odsotnost klamidijske rasti naj bi bila povezana z zmanjšanjem metabolne aktivnosti bakterije, kar omejuje rast, delitev in prepreči preoblikovanje RT v ET. V tem primeru klamidij ne moremo zaznati v celični kulturi. Zmanjšana metabolna aktivnost naj bi vplivala tudi na biokemijske in antigenske lastnosti klamidij, zaradi česar klamidij ne zaznamo niti z drugimi diagnostičnimi testi. Do spremembe RT v ET pride kasneje kot pri normalnem razvojnem krogu klamidij (Beatty in sod., 1994).

Vzrokov za pojav perzistence je več. Mnogo študij opisuje nenormalni razvojni krog klamidij po dodatku antibiotika. Na splošno velja, da učinkovina, ki deluje na bakterijsko sintezo proteinov ali sintezo RNK, lahko prepreči spremembo ET v RT ali RT v ET. To je odvisno od tega kdaj jo dodamo, koliko in ali je tarča antibiotika sinteza DNK ali sinteza peptidoglikana. Dodatek eritromicina, ki zmanjšuje aktivnost ribosomov, v prvih 12 urah po okužbi prepreči spremembo ET v RT. Če eritromicin dodamo kasneje, nastanejo povečana RT, ki se ne morejo preobraziti v ET. V nasprotju penicilin, ki preprečuje prečno povezovanje peptidoglikana, nima učinka na celice klamidij v prvih 12 urah po okužbi.

Kasnejši dodatek penicilina pa povzroči povečanje RT in nastanek netipičnih razvojnih oblik (Hogan in sod., 2004).

Perzistenco povzroča tudi pomanjkanje hranil, ki začasno zaustavi rast klamidij in gostiteljskih celic, dokler hranila niso spet na voljo (Hogan in sod., 2004). Pomanjkanje cisteina vpliva na rast bakterije in na čas spremembe RT v ET. Omenjena aminokislina je potrebna za biosintezo treh, s cisteinom bogatih beljakovin, ki so potrebne za spremembo RT v ET. Po dodatku cisteina se bakterijska rast in sprememba RT v ET spet pojavita. V pogojih, ko so molekule, potrebne za metabolne procese gostiteljskih celic omejene, klamidija ne more tekmovati za potrebne makromolekularne prekursorje in lahko preide v perzistentno stanje (Beatty in sod., 1994).

Raziskave kažejo, da perzistenco izzovejo tudi citokini (Hogan in sod., 2004). Med njimi je najpomembnejši gama interferon (INF- $\gamma$ ), ki ga izločajo T - celice imunskega odziva (Beatty in sod., 1994). Visoke koncentracije INF- $\gamma$  pred okužbo s *C. psittaci* v celični kulturi so preprečile nastanek inkluzije. Nižje koncentracije INF- $\gamma$  pa vodijo do nastanka netipičnih razvojnih oblik, ki niso infektivna. Najpomembnejši mehanizem delovanja INF- $\gamma$ , ki pojasnjuje učinek INF- $\gamma$  na rast klamidij v tkivni kulturi, je razgradnja triptofana. INF- $\gamma$  aktivira encim gostitelja, indolamin 2,3 - dioksigenazo (IDO), razcepi triptofan (Hogan in sod., 2004). V tej stopnji klamidij ne moremo zaznati v celični kulturi, lahko pa z molekularnimi metodami zaznamo molekule 16S rRNK, ki kažejo navzočnost bakterije (Dreses - Werringloer in sod., 2001).

Pri *C. psittaci* so ugotovili, da lahko perzistentno stanje povzroči tudi litična okužba faga Chp1. Opaziti je bilo mogoče nastanek povečanih, napihnjenih RT, ki niso bila infektivna (Hogan in sod., 2004).

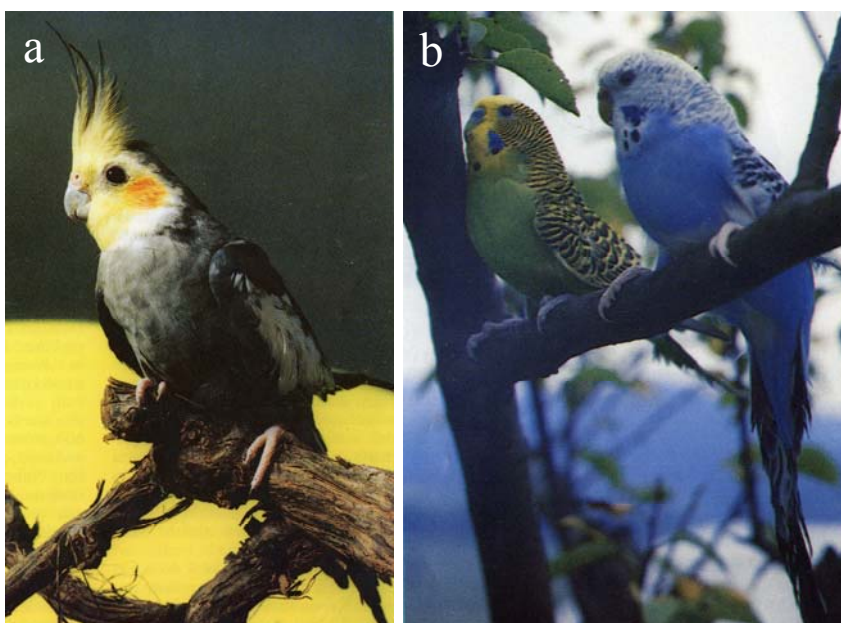
Zmožnost *C. psittaci* za razvoj perzistentne okužbe pri gostitelju ima verjetno pomembno vlogo pri razvoju kroničnih okužb, kot tudi pri neuspešnem zdravljenju z antibiotiki in imunoprofilaksi (Goellner in sod., 2006).

## 2.8 OKUŽBE S *C. psittaci* PRI ŽIVALIH

### 2.8.1 Ptice

*C. psittaci* primarno okužuje ptice (Everett, 2000). Bolezen povzroča pri več kot 130 vrstah ptic in pri 32 drugih domačih in divjih živalih (Theegarten in sod., 2004).

Polovica ptičjih vrst, dovzetnih za klamidiozo, pripada družini papig - *Psittacidae* (Dovč, 1995). Na sliki 7 sta prikazani nimfca in skobčevka. V naravi je stopnja okuženosti papagajskih vrst s *C. psittaci* nizka. Podobne okužbe pri perutnini in ostalih nepapagajskih (angl. nonpsittacine) vrstah ptic imenujemo ornitoza (Schachter, 1978b).



Slika 7: a) nimfca (*Nymphicus hollandicus*) (Golob, 1994: 45) b) par skobčevk (*Melopsittacus undulatus*) (Golob, 1994: 60).

Klamidioza zelo pogosto poteka brez vidnih kliničnih znakov, zato so okužene ptice potencialne prenašalke bakterije *C. psittaci* (Dovč, 1994; Greco in sod., 2005). Take ptice izločajo bakterije v presledkih, izločanje *C. psittaci* pa pospešujejo tudi stresni faktorji, kot so premeščanje živali z različnimi prevoznimi sredstvi iz ene države (kontinenta) v drugo, gneča med živalmi v ujetništvu, mraz in sama reja živali (Smith in sod., 2005). Stresni



faktorji lahko vodijo tudi v klinično izraženo bolezen (Greco in sod., 2005). Izolati *C. psittaci* pri pticah se razlikujejo glede virulentnosti. Ptice predstavljajo odličen vektor za prenos klamidij, ker se hranijo in prihajajo v stik z izločki in iztrebki okuženih živali, so tudi zelo mobilne in prepotujejo velike razdalje (Van Looek in sod., 2003).

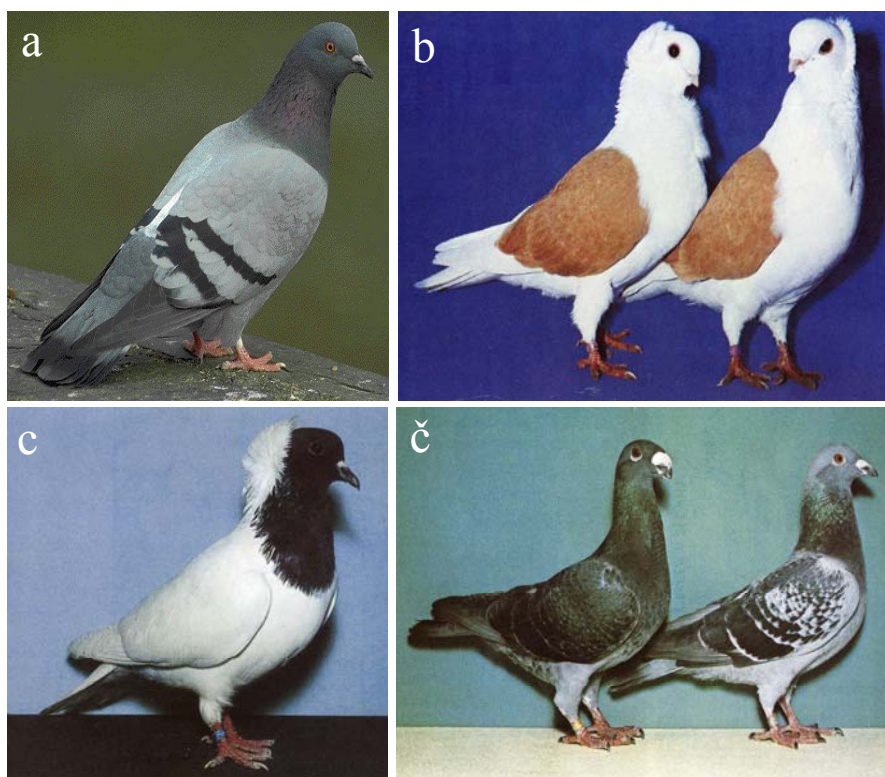
Trenutno ima *C. psittaci* 8 znanih serovarov, od teh jih je bilo 6 prvotno izoliranih iz ptic (A - F) in 2 iz sesalcev (WC in M56). Večina serovarov je gostiteljsko specifičnih (Eidson, 2002). Serovar A je endemičen med papagajskimi vrstami ptic, povzroča pa tudi sporadične zoonoze pri ljudeh, drugih sesalcih in želvah. Serovar B je endemičen med golobi, izolirali so ga tudi pri puranih, pri prežvekovalcih pa naj bi povzročil splav. Izolate serovara C (GD, MT1 in 91/1264, 91/1301, CT1 in Par1) so določili pri racah, labodih, puranih in jerebicah (Geens in sod., 2005a). Serovar D je pogost pri puranih, čapljah in galebih. Okužbe s serovarem C in D so nevarne za klavce živali in za ljudi, ki prihajajo v tesen stik z živalmi (Eidson, 2002). Serovar E so izolirali pri človeku in različnih pticah prvotno pa naj bi izviral iz golobov (Andersen, 1997; Everett, 2000). Edini izolat serovara F, VS225, je bil najden pri majhni dolgorepi papigi (angl. parakeet) (Geens in sod., 2005a).

Okužene ptice izločajo *C. psittaci* z iztrebki in nazalnimi izločki. Bakterija *C. psittaci* je v zunanjem okolju neobstoja, če pa se nahaja v organskih ostankih (iztrebek, hlevski gnoj) ali perju, ostane infektivna več mesecev (Smith in sod., 2005). Zaužitje in vdihavanje aerosolov sta dva najpomembnejša načina prenosa v naravi (Brand, 1989). Spenser (1991) navaja, da je pri papigah možen vertikalni prenos s kontaminacijo prek jajčne lupine in tudi z regurgitacijo okužene hrane, medtem ko je neposredni embrionalni prenos vprašljiv. Pri golobih je bil vertikalni prenos klamidije potrjen, izolirali pa so jo tudi iz račjih jajc (Dovč, 1995).

Inkubacijska doba bolezn pri pticah traja od tri dni do več tednov. Bolezen lahko poteka brez vidnih kliničnih znakov, v akutni ali kronični obliki, lahko pa se konča tudi s smrtjo živali. To je odvisno od vrste ptice in njene dovzetnosti, virulence bakterijskega seva, infektivne doze, stresnih faktorjev, starosti in od zdravljenja oziroma profilakse živali. Znaki ptičje klamidioze so podobni kot pri drugih sistemskih okužbah, pojavi se apatičnost, neješčnost, nasršeno perje, serozen do serozno gnojen izcedek iz nosnic in oči,

driska in zelen do zeleno - rumen seč. Izčrpane ptice lahko izločajo redke, temnozeleno kapljice, temu sledi hujšanje, dehidracija in posledično smrt (Smith in sod., 2005). Klamidioza pri pticah običajno poteka sistemsko in se občasno konča s smrtjo, smrtnost je do 30 % (Van Loock, 2005).

Klamidioza se pojavlja povsod po svetu, pogostost in razširjenost okužb pa sta odvisni od vrste ptice in serotipa. Včasih je prihajalo do večjih nenadnih izbruhov klamidioze pri puranih (predvsem v Ameriki), ki je prizadela eno ali več jat. Z vzrejo perjadi v zaprtih prostorih pa so preprečili stik z divjimi vrstami ptic in posledično se je zmanjšalo tudi število okužb in nenadnih izbruhov. V Evropi se klamidioza pri puranih endemično pojavlja v Belgiji, Nemčiji in Franciji, vendar se večinoma kaže z respiratornimi znaki, brez smrti živali. *C. psittaci* povzroča pomembne ekonomske izgube za rejce perutnine, bolj pomembno pa je, da kot zoonoza pomeni nevarnost za ljudi, ki prihajajo v tesen stik z okuženimi živalmi. Do večine okužb pride z vdihavanjem kužnih aerosolov in tudi pri nadaljnji obdelavi mesa okužene živali (Van Loock, 2005).



Slika 8: a) prostoživeči golob (*Columba livia domestica*) (Sharon in McLaughlin, 1995; 114) b) staronemški galebček (Grmek, 1995) c) južnonemški telovničar (Grmek, 1995) č) nemški okrasni golob (levo), golob pismonoša (Grmek, 1995).

V naravnem okolju se klamidioza pojavlja tudi pri golobih (Slika 8) in sicer od maja do junija ter od oktobra do decembra. Kritično obdobje nastopi spomladi zaradi izčrpanosti od valjenja in krmljenja mladičev in jeseni zaradi menjave perja in pomanjkljive prehrane (Dovč, 1994). Blato posameznih inficiranih golobov, zlasti med akutno fazo, vsebuje preko 10000 infektivnih enot na gram iztrebka, golob pa v enem letu izloči 2,5 kg iztrebkov (Dovč in sod., 2000).

Širok razpon ptičjih gostiteljev *C. psittaci* kaže, da obstajajo številni mehanizmi prenosa bakterije, odvisno od okolja in obnašanja gostitelja. Pomemben je tudi način prehranjevanja in okolje, kjer se nahaja gostitelj. To določa način prenosa in izpostavljenost okužbi (Brand, 1989).

### 2.8.2 Sesalci

*C. psittaci*, ki povzroča splav, (po novi taksonomiji *Chlamydophila abortus*), je patogena predvsem za prežvekovalce (ovce, koze, govedo), pa tudi za prašiče in konje. V Evropi najpogosteje povzroča splav pri ovcah (angl. OEA - ovine enzootic abortion) in kozah, saj je ta bakterija zmožna kolonizirati placento (Thomson in sod., 2006). Splav je posledica sistemske okužbe, do katere pride z vdihavanjem ali zaužitjem ET ter s spolnim stikom. Splav pri prežvekovalcih povzročajo *C. psittaci* serovar 1, biovar 1, sev *omp1*, ki niso gostiteljsko ali tkivno specifični in povzročajo splav tudi pri ovcah (DeGraves in sod., 2004). Okužba s *C. psittaci* ostaja ponavadi neizražena vse do splava v pozni brejosti ali do skotitve slabotnega oziroma mrtvega ploda. Okužene samice najverjetneje izločajo povzročitelja blizu časa ovulacije. Bakterija je endemična med prežvekovalci, našli pa so jo tudi kot povzročiteljico splava pri konjih, zajcih, prašičih, miših in človeku, medtem ko je pri pticah niso izolirali (Van Loock in sod., 2003).

*C. psittaci*, ki povzroča okužbe pri mačkah, (po novi taksonomiji *Chlamydophila felis*), je endemična med hišnimi mačkami povsod po svetu. Povzroča vnetje očesne veznice, rinitis in respiratorne težave. Najdemo jo tudi v želodcu in razmnoževalnem sistemu. Izolati se razlikujejo glede na patogenezo (Everett, 2000). Pogosto povzročajo kronične okužbe in

ponovne okužbe, pogini so redki. Velikokrat ugotavljajo tudi mešane okužbe z bakterijami, mačjim kalicivirusom in mačjim herpesvirusom (Dovč in sod., 1998c).

*C. psittaci*, ki okužuje morske prašičke (angl. guinea pig), se po novi taksonomiji imenuje *Chlamydophila caviae*. Našli so jo v očesni veznici morskih prašičkov, kjer je povzročila vnetje z izcedkom. Vsi znani izolati imajo enako sekvenco gena *ompA*. Izolat GPIC vsebuje ekstrakromosomalni plazmid. Primarno okužuje epitelij sluznic, ni invazivna in je specifična za morske prašičke (Everett in sod., 1999).

Za klamidiozo lahko zbolijo še psi, kunci, miši in prostoživeči sesalci, med njimi pogosto opisujejo koale (Girjes, 1993; Vanrompay in sod., 1995). Klamidiozo omenjajo tudi pri dvoživkah in plazilcih (Schnorr, 1989). Vanrompay s sod. (1994) opisuje okužbo želv (*Testudo graeca*) s ptičjim serotipom A *C. psittaci*. Pri nojih so uspeli izolirati *C. psittaci* leta 1993 v Namibiji. V okuženi jati je bil pogin 37,5 % (Kolb in sod., 1993).

## 2.9 OKUŽBE S *C. psittaci* PRI ČLOVEKU

*C. psittaci* povzroča pri človeku psitakozo, okužbo pljuč, do katere pride ob izpostavljenosti okuženim pticam (Ferreri in sod., 2004). Najpogosteje se človek okuži z vdihavanjem aerosolov posušenih iztrebkov ali izločkov respiratornega trakta okuženih ptic. Do prenosa bakterije pride tudi pri stiku ust s kljunom in pri rokovanju s ptičjim perjem ali tkivom okužene živali (Smith in sod., 2005). Posušeni iztrebki ptic so kužni tudi več mesecev. Okužba po oralni poti s hrano in vodo in okužba skozi poškodovano kožo sta dosti redkejši. Opažamo jih pri ljubiteljih ptic, ki so v neposrednem stiku s ptico. Tudi vzorci krvi, ki so namenjeni za preiskavo, so lahko potencialno nevarni za osebje laboratorija. Klamidioza ja ena od najpogosteje opisanih okužb v laboratorijih, zato je treba upoštevati vse varnostne ukrepe pri sprejemu in obdelavi potencialno kužnega materiala (Dovč, 1994). Že krajša izpostavljenost infektivnemu delcu lahko vodi do simptomatske okužbe (Smith in sod., 2005).

Najbolj so okužbi s *C. psittaci* izpostavljeni otroci, starejše osebe in nosečnice. Kljub temu je psitakozna relativno redka. CDC (angl. Center for Disease Control and Prevention) ima

podatke o manj kot 100 - ih primerih okužb na leto v letih 1992 - 1994 (Kirchner, 1997). Velikokrat se klamidioza ugotavlja pri rejcih, prodajalcih in ljubiteljih ptic. Pogosto zbolijo ljudje na perutninskih farmah in v klavnicah, veterinarji pri kliničnih pregledih in sekcijah ter laboranti pri stiku s kužnim materialom (Dovč, 1995). Gregurić in sod. (1992) poročajo o endemiji psitakoze pri prebivalcih Zagreba v letih 1987 in 1988, ki so se okužili od prosto živečih mestnih golobov. Psitakoza se lahko prenaša tudi iz človeka na človeka, vendar zelo redko (Dovč, 1995).

Inkubacijska doba navadno traja 5 - 14 dni, lahko tudi dlje. Bolezen lahko poteka brez bolezenskih znakov ali kot sistemska oblika s hudo pljučnico. Ko še ni bilo na voljo protimikrobnih sredstev je bila umrljivost 15 do 20 % odstotna. Danes umre manj kot 1 % zdravljenih ljudi. Pri osebah s simptomatsko okužbo se nenadoma pojavi vročina, mrzlica, glavobol, slabost in mišični revmatizem. Razvije se tudi suh kašelj, ki ga spremlja otežkočeno dihanje in dihalna stiska. *C. psittaci* lahko poleg respiratornega trakta prizadene tudi druge organske sisteme. Pojavi se endokarditis, miokarditis, hepatitis, artritis, keratokonjunktivitis in encefalitis. Pri okužbah nosečnic so poročali o odpovedi dihal, trombocitopeniji, hepatitisu in odmrtnju ploda (Smith in sod., 2005).

*C. psittaci* izolirana pri sesalcih ima relativno majhno kužnost za človeka, v primerjavi s ptičjimi izolati *C. psittaci*. Klinično vidne okužbe so pri ljudeh redke. Med sesalci najpogosteje opisujejo kot izvor okužbe za ljudi ovce in mačke. Pri prenosu okužbe preko mačk lahko klamidije pri ljudeh povzročajo konjunktivitise in težke sistemske okužbe, pa tudi nenormalno delovanje jeter, slabost in kašelj, poročali so prav tako o endokarditisu in glomerulonefritisu (Dovč in sod., 1998c; Eidson, 2002). *C. psittaci*, ki povzroča splav pri prežvekovalcih, ogroža predvsem noseče ženske, ki pridejo v stik z okuženo živaljo (Thomson in sod., 2006). Človek se pogosto okuži, kadar nezaščiten pomaga pri kotitvi mladičev okužene samice. Pojavijo se gripi podobni simptomi. Še posebej nevarna je okužba za nosečnico, pri kateri je verjetnost za splav velika, če se pojavijo bolezenski znaki (DeGraves in sod., 2004).

## 2.10 LABORATORIJSKO DOKAZOVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO *C. psittaci*

Zelo pomemben dejavnik v laboratorijskem dokazovanju okužbe s klamidijami je pravilen odvzem kužnine in prenos kužnine v laboratorij. Občutljivost in specifičnost diagnostičnega testa na klamidije je tako neposredno odvisna od ustreznosti kliničnega materiala. Pri neposrednem odvzemu kužnine je potrebno odvzeti celice, v katerih se klamidije razmnožujejo. Kužnina, ki vsebuje izločke ali eksudate, ne pa celic kubičnega epitela, ni primerna (Keše in sod., 1999).

Pri živih pticah dokazujemo prisotnost bakterije *C. psittaci* v kloakalnih brisih, brisih nosu in očesne veznice. Ker ptice izločajo *C. psittaci* v presledkih, je potreben odvzem 3 - 5 zaporednih vzorcev. Pri poginulih pticah lahko *C. psittaci* izoliramo iz organov kot sta jetra in vranica (Smith in sod., 2005). V laboratorij je najbolje poslati celo svežo poginulo ptico. Za ugotavljanje protiteles proti *C. psittaci* je potrebno odvzeti kri, ponavadi iz krilne vene (*venae axillaris*) (Dovč, 1995).

Pri mačkah ugotavljamo okužbo s *C. psittaci* v brisih očesne veznice, faringealnih in trahealnih brisih, v izločkih iz nosnic in oči, pri poginulih mačkah pa v patološko - anatomsko spremenjenih organih (Dovč, 1994).

Pri prežvekovalcih jemljemo vaginalne, nazalne in rektalne brise, brise očesne veznice ter kri (Jee in sod., 2004; Twomey in sod., 2006)

Pri človeku *C. psittaci* izoliramo iz izmečka, plevralne tekočine, pljučnega tkiva ali krvi med akutno fazo bolezni (Keše, 2002; Smith in sod., 2005).

Po odvzemu in med prenosom v laboratorij hranimo kužnine v posebnem prenosnem gojišču za klamidije pri 4 °C (Smith in sod., 2005). Če vzorcev v tem času ne moremo prenesti v laboratorij, jih zamrznemo pri -70 °C (Pearson in sod., 1989).

Prenosno gojišče za klamidije je iz fosfatnega pufra (2SP: sukrozno fosfatni pufer), kateremu je dodan fetalni telečji serum in antibiotiki, ki zavrejo prehitro rast nezaželenih bakterij in ne vplivajo na rast klamidij (Domeika in Mardh, 1993).

### 2.10.1 Osamitev bakterije *C. psittaci* iz kužnine

Ker je *C. psittaci* obvezna znotrajcelična bakterija, jo lahko izoliramo le v tkivni kulturi ali v kokošnjih zarodkih (Smith in sod., 2005).

Klamidije rastejo na številnih mišjih, ptičjih in humanih celičnih linijah in tkivnih kulturah.

Primerne celice za rast *C. psittaci* v tkivnih kulturah so (Dovč, 1995):

- McCoy celice - heteroploidna mišja linija
- HeLa celice - izvor iz humanega cervikalnega karcinoma
- mišji fibroblasti, klon L - 929
- primarna kultura piščančjih zarodnih celic

Za izolacijo ptičjih sevov *C. psittaci* Vanrompay in sod. (1995) navajajo uporabo celičnih kultur Vero celic, McCoy in Buffalo Green Monkey.

V celicah tkivne kulture po inokulaciji kužnine nastanejo inkluzije, ki jih lahko obarvamo z različnimi barvili (akridin oranž, Giemsa, Gimenez, Macchiavello) (Vanrompay in sod., 1995). Uporabimo lahko tudi s fluoresceinom označena protitelesa (Pearson in sod., 1989). Pri barvanju po Giemsi se ET obarvajo rdečkasto - vijolično (DNK), RT pa temno modro (RNK) (Page, 1975). Prvi rezultati so lahko vidni že po 48 urah, pri počasi rastočih izolatih je včasih potrebna tudi 4 - 5 dnevna inkubacija (Pearson in sod., 1989). Zanesljiv dokaz inkluzije v celični kulturi pomeni prisotnost živih klamidij (Vanrompay in sod., 1995).

Ker izločanje klamidij v feces poteka v presledkih, ena negativna kultura še ne pomeni, da ptica ni nosilec *C. psittaci* (Vanrompay in sod., 1995). Glede na to, da je *C. psittaci* izredno virulentna, je izolacija bakterije možna le v posebno opremljenih laboratorijih. Zato je v večini laboratorijev še vedno najbolj uporabna serološka metoda v dokazovanju okužbe s

*C. psittaci* (Keše in sod., 1999). Klamidioza je ena najpogosteje opisanih okužb v laboratorijih. Treba je strogo upoštevati vse varnostne ukrepe (Dovč, 1994).

### 2.10.2 Dokazovanje antigena

Metode za dokazovanje antigena so hitrejše in ne zahtevajo živih, viabilnih organizmov. Antigene *C. psittaci* (MOMP, LPS) dokazujemo s specifičnimi protitelesi, ki prepoznajo značilne epitope. Uporabimo lahko test ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay) ali direktni imunofluorescentni test. Pri imunofluorescentni metodi uporabimo monoklonska ali poliklonska protitelesa označena s fluoresceini, ki se vežejo na antigen, kar lahko opazujemo s fluorescentnim mikroskopom (Smith in sod., 2005).

Slabost teh metod so lažno pozitivni rezultati, do katerih pride zaradi navzkrižne reaktivnosti antigenov ostalih klamidij. Lažno negativni rezultati se pojavijo, kadar ni dovolj antigena ali ko gostitelj izloča *C. psittaci* v presledkih. Rezultate testa je potrebno ovrednotiti skupaj s klinično sliko obolele živali. Če je pri ptici rezultat testa ELISA pozitiven, a je le ta klinično zdrava, je potrebno bakterijo *C. psittaci* dokazati z izolacijo. Kadar pa je pri oboleli ptici test ELISA negativen, moramo okužbo s *C. psittaci* izključiti še z drugimi testi (kultivacija, serološke metode, PCR) (Smith in sod., 2005).

### 2.10.3 Serološke metode

Za ugotavljanje protiteles proti *C. psittaci* v serumu ptice so v literaturi opisane naslednje serološke metode (Dovč, 1995):

- reakcija vezave komplementa (RVK) - neposredna, posredna
- inhibicija hemaglutinacije
- aglutinacija
- mikroaglutinacija
- lateks aglutinacija
- precipitacija v agaroznem gelu
- nevtralizacijski preizkus



- posredna imunofluorescenca
- test ELISA
- mikro - imunofluorescenca

Reakcija vezave komplementa (RVK) je standardni serološki postopek za dokazovanje specifičnih protiteles proti *C. psittaci* pri pticah. Pri tej metodi se uporablja za rod specifičen antigen. Dobre rezultate te metode dosežemo s pregledom cele jate ptic. V kolikor pri večini pregledanih ptic dokažemo visok titer protiteles proti in imajo le te tudi klinične znake značilne za klamidiozo, lahko potrdimo okužbo s *C. psittaci*. Druge serološke metode kot so ELISA, lateks aglutinacija, mikro - imunofluorescenca, imunodifuzija v gelu, naj bi uporabljali le v posebnih primerih (Vlahović in sod., 2002). Metoda RVK v diagnostiki klamidij je uporabna pri številnih živalskih vrstah. Težave se pokažejo pri dokazovanju specifičnih protiteles pod nivojem rodu. Problemi nastopijo tudi pri občutljivosti te metode, ko imamo opravka z živalmi z nizkim titrom protiteles (Vlahović in sod., 2001).

Pozitiven serološki test kaže, da je bila žival okužena s *C. psittaci*, ni pa nujno, da pri živali tudi trenutno poteka aktivna okužba. Lažno negativni rezultati pri živali z akutno okužbo se pokažejo, kadar so vzorci odvzeti pred serokonverzijo. Zdravljenje s protimikrobno učinkovino lahko zmanjša odgovor protiteles. Več kot 4 kratno povečanje titer protiteles pri parnih serumskih vzorcih ali kombinacija določanja titra protiteles in dokaz antigena potrjuje okužbo s *C. psittaci*. Visoki titri protiteles lahko ostanejo tudi po končanem zdravljenju, kar otežkoča interpretacijo opravljenih testov (Smith in sod., 2005).

Pri ljudeh protitelesa proti *C. psittaci* dokazujemo s testom mikro – imunofluorescence (mikro – IF) ali z metodo reakcije vezave komplementa (RVK). Z mikro – IF dokazujemo vrstno specifična protitelesa. Značilen porast protiteles IgG ali navzočnost protiteles IgM nakazuje na okužbo s *C. psittaci*. Protitelesa navadno začno naraščati ob koncu drugega tedna bolezni. Ker pri testu RVK dokazujemo protitelesa proti klamidijškemu antigenu LPS, ki je za rod specifičen, ta test nima večje veljave v diagnostiki klamidijških okužb pri ljudeh (Keše in sod., 1999).

Krvni vzorci, ki prihajajo v preiskavo v laboratorij, so lahko potencialno nevarni za laboratorijsko osebje. Nevarnost za laboratorijske delavce obstaja tudi pri pipetiranju svežih serumov s klamidiozo okuženih živali z ustvarjanjem aerosolov (Dovč, 1994).

#### **2.10.4 Dokazovanje nukleinske kisline *C. psittaci***

Direktni dokaz *C. psittaci* v celični kulturi predstavlja nevarnost za osebje laboratorija in zahteva delo v laboratoriju tretje varnostne stopnje. Interpretacija serodiagnostike je včasih težka zaradi navzkrižnih reakcij z drugimi vrstami iz rodu *Chlamydia* in visoke prevalence *Chlamydiae pneumoniae* v populaciji. Zato tehnike molekularne biologije predstavljajo neprecenljivo orodje v diagnostiki klamidij (Menard in sod., 2006).

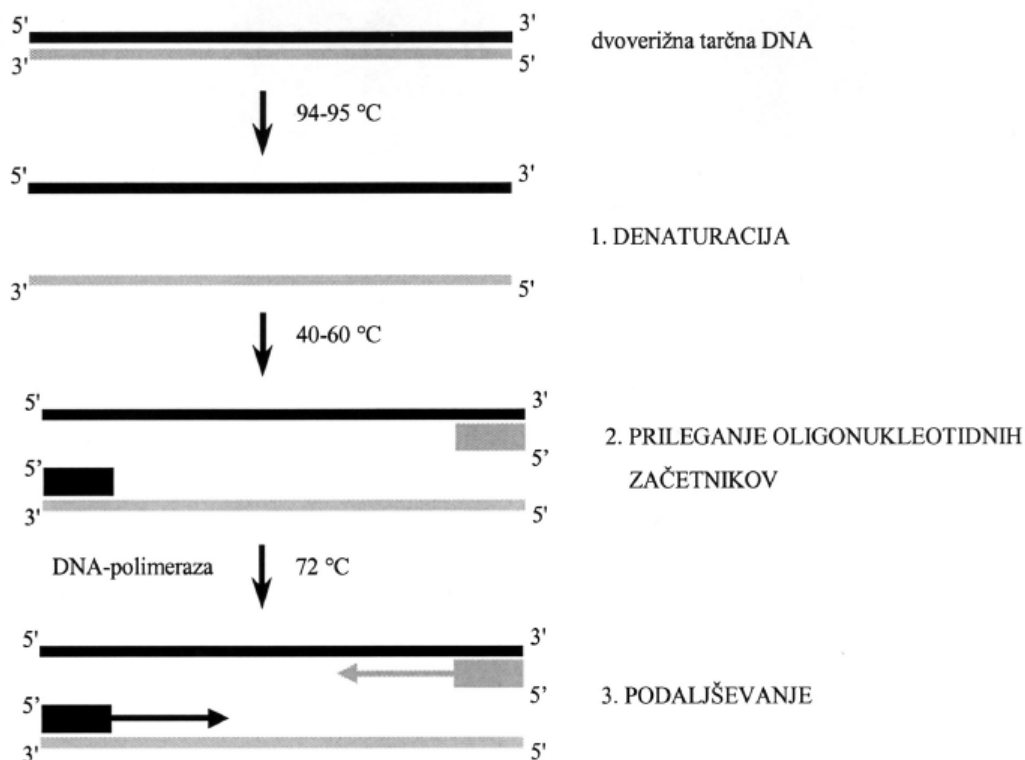
##### **2.10.4.1 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)**

PCR (angl. polymerase chain reaction) je *in vitro* metoda za pomnoževanje nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNK. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije, kjer analiziramo nepomnoženo DNK oziroma RNK in potrebujemo večje količine celic ali tkiv (Arko, 2004). Z metodo PCR lahko dokažemo prisotnost že samo 10 klamidijskih ET (Kaltenboeck in sod., 1991).

Predpogoj za uspešno izvajanje metode PCR je izolacija klamidijske DNK iz kužnine. Na tržišču je veliko komercialno dostopnih kompletov reagentov za izolacijo DNK (Yang in sod, 2006). Reakcijsko mešanico poleg DNK, ki služi kot matrica, sestavljata dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleozid - trifosfati, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNK, Mg<sup>2+</sup> ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNK - polimeraza. Najpogosteje se uporablja Taq DNK polimeraza, ki je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Peake, 1989).

Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj (Ieven in Goossens 1997), kot kaže slika 9 :

- denaturacije
- prileganja oligonukleotidnih začetnikov
- izgrajevanja komplementarne verige



Slika 9: Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Arko, 2004: 216).

V stopnji denaturacije s segrevanjem na 94 - 95 °C razklenemo verigi DNK in iz dvoverižne dobimo enoverižni DNK. Nato znižamo temperaturo na 40 - 60 °C, pri čemer pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNK. Temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje termostabilne DNK – polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNK. DNK, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. Teoretično se torej z vsakim ciklom število kopij želenega odseka DNK podvoji. Navadno izvedemo 20 - 40 ciklov (Arko, 2004).

Preden uporabimo metodo PCR moramo vedeti, kateri del DNK želimo pomnožiti in izbrati ustrezne začetne oligonukleotide. Pomembna je tudi sama kužnina iz katere želimo izolirati nukleinsko kislino, način izolacije DNK, dokazovanje in odstranitev morebitno navzočih inhibitorjev (pigmenti, urea) ter nukleaz, kot tudi metoda, ki jo izberemo za dokazovanje pridelkov PCR (Ieven in Goossnes, 1997). Slabost metode PCR je možnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije matrične DNK ali produktov PCR. Tveganje za kontaminacijo vzorca zmanjšamo z minimalno predhodno obdelavo vzorcev, na primer z enostavno lizo in proteolitično razgradnjo vzorcev (McElnea in Cross, 1999). Lažno negativni rezultati so največkrat posledica temperaturno obstojnih inhibitorjev (lipidi, polisaharidi, hem, idr.) v kužnini. Zaradi tega je potrebna uporaba pozitivnih in negativnih kontrol (Betsou in sod., 2003).

Z metodo PCR lahko dokažemo že 60 - 600 femto gramov (femto -  $10^{-15}$ ) klamidijske DNK, kar je ekvivalentno 6 - 60 organizmov na vzorec. Pozitivni rezultat testa PCR potrjuje okužbo s *C. psittaci* (Hewinson in sod., 1997). Občutljivost in specifičnost metod PCR se zelo razlikuje, kar je verjetno posledica različnih vrst kužnin, priprave vzorcev, metod za izolacijo DNK, uporabljenih začetih nukleotidov in različic metode PCR (Berg in sod., 2003). Na rezultate testa PCR lahko vplivajo tudi napake pri vzorčenju. Predolgo shranjevanje, večkratno zamrzovanje in odtajanje sta še dva pomembna dejavnika, ki lahko vplivata na občutljivost metode PCR, saj pride s tem do izgube DNK v vzorcu (Tong in Sillis, 1993). Z občutljivo metodo PCR lahko dokažemo prisotnost perzistentnega, neviabilnega organizma v kužnini (Tong in sod., 1999).

Začetni oligonukleotidi, ki so najpogosteje uporabljeni, so komplementarni odsekom genov *ompA* (CP1/CP2, CPsittF/CPsittR) (Tong in sod., 1999; Heddema in sod., 2006), *omp2* (PCR-D1/PCR-D2, PCR-Av, PCR-Ab) (Watson in sod., 1991, Sheehy in sod., 1996), 16S rRNK in "spacer" genom 16 - 23S rRNK (CPS100/CPS101) (Messmer in sod., 1997; Madico in sod., 2000) in odsekom genov RNaze P RNK (BH1/BH2) (Herrmann in sod., 1996).

## 2.10.4.2 Različice metode PCR

### 2.10.4.2.1 "Nested" PCR

Metoda "nested" PCR je bolj občutljiva in specifična kot klasična metoda PCR (Messmer in sod., 1997). Posebnost te metode je uporaba dveh parov začetnih oligonukleotidov. Najprej pomnožujemo tarčni odsek DNK z zunanjim parom začetnih oligonukleotidov. Dobljen pridelek nato pomnožujemo še z notranjim parom začetnih oligonukleotidov (Kaltenboeck in sod., 1991). Pri klamidijah s prvim parom oligonukleotidnih začetnikov pomnožujemo zaporedje, ki je skupno rodu *Chlamydia*. V drugem koraku PCR pa uporabimo "ugnezdene" (angl. nested) oligonukleotidne začetnike, s pomočjo katerih dobimo pridelek, ki je po številu baznih parov krajši, in je specifičen za vrsto, npr. za *C. psittaci* (Messmer in sod., 1997; Herrmann in sod., 2006).

Za dokazovanje specifičnosti pridelka metode "nested" PCR se uporabljajo različne metode. Najpogosteje se za ločevanje pridelkov uporablja elektroforeza v agaroznem gelu, v katerega dodamo etidijev bromid, ki fluorescira pod UV (ultravijolično) svetlobo (Tong in Sillis, 1993; Messmer in sod., 1997). Namnožene produkte lahko predhodno podvržemo še restrikciji, z metodo RFLP (angl.: restriction fragment length polymorphism), in nato z elektroforezo ločimo dobljene fragmente. Kaltenboeck in sod. (1991) so z metodo PCR pomnoževali odsek gena *omp1* in nato z analizo RFLP dokazali in med seboj ločili različne izolate *C. psittaci*. Sheehy in sod. (1996) pa so pomnoževali odsek gena *omp2* in z metodo RFLP ločili med seboj različne izolate *C. psittaci* in *C. pecorum*. Van Loock in sod. (2005) so pridelke "nested" PCR (fragment *ompA*), ki so bili na 5' koncu označeni s fluoresceinom in na 3' koncu z biotinom, zaznali z encimsko imunsko reakcijo.

Slabost metode je večja verjetnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi možnosti navzkrižne kontaminacije. Za minimizacijo lažno pozitivnih rezultatov je potrebno vsak korak te metode izvesti na fizično ločenih lokacijah in uporabiti tehniko sterilnega dela v zaščitni komori (Messmer in sod., 1997). Ker klinični vzorci pogosto vsebujejo inhibitorje metode PCR, PCR v dveh korakih navadno prepreči učinek inhibitorjev. Tudi če v prvem koraku metode PCR dobimo premajhno količino pridelka za dokaz z etidijevim bromidom,

dobljena količina zadostuje za pomnoževanje in detekcijo pridelka v drugem koraku PCR. Z uporabo metode "nested" PCR so dokazali večje število vzorcev ptic pozitivnih za *C. psittaci* kot pri uporabi metode tkivne kulture in tradicionalnih histokemičnih in imunohistokemičnih barvanj (Messmer in sod., 1997).

#### 2.10.4.2.2 "Multiplex" PCR

Multiplex PCR je različica metode PCR, ki omogoča hkratno pomnoževanje več različnih tarč v eni reakciji PCR z uporabo več različnih oligonukleotidnih začetnikov. Tong in sod. (1999) so razvili "multiplex" PCR za sočasno dokazovanje *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* in *Chlamydia psittaci* v kužninah respiratornega trakta. Povzročitelje, ki jih dokazujemo v reakciji PCR, ločimo po različni dolžini pomnoženega fragmenta (Tong in sod, 1999). Temperature prileganja začetnih oligonukleotidov se običajno razlikujejo, zato nastopi problem specifičnosti (Ieven in Goossens, 1997).

"Multiplex" PCR ima nižjo občutljivost kot PCR z eno vrsto začetnih oligonukleotidov. Občutljivost je več kot 82 %, specifičnost pa 100 %. Meja detekcije "multiplex" PCR je med 10 - 20 organizmi, kar je sprejemljivo za diagnostične namene. Občutljivost te metode lahko izboljšamo z optimizacijo pogojev reakcije PCR (koncentracija oligonukleotidnih začetnikov, koncentracija magnezijevih ionov, temperatura vezave začetnih oligonukleotidov). Občutljivost lahko povečamo tudi s "hot start" polimerazo ali s temperaturno aktivirano polimerazo DNK (Tong in sod, 1999).

#### 2.10.4.2.3 "Touchdown" PCR

Pri metodi "touchdown" PCR postopno znižujemo temperaturo vezave začetnih oligonukleotidov, s čimer povečamo specifičnost njihove vezave in s tem tudi specifičnost same metode. Postopna aktivacija polimeraze DNK med termičnim ciklom omogoča pomnoževanje tarčnih zaporedij 60 ciklov. Na ta način povečamo občutljivost metode. Polimerazo DNK lahko damo v reakcijsko mešanico tik pred začetkom reakcije PCR, da se izognemo nespecifični vezavi začetnih oligonukleotidov ("hot start" polimeraza). Touchdown PCR omogoča detekcijo najmanj 0,004 - 0,063 IFU (angl. inclusion forming

unit), zato je občutljivost boljša kot pri konvencionalnem PCR in enaka kot pri "nested" PCR (0,063 IFU) (Madico in sod., 2000).

#### 2.10.4.2.4 PCR v realnem času

PCR v realnem času (angl. real - time PCR) predstavlja nadgradnjo konvencionalnega PCR (Arko, 2004). Omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Prednost te metode je, da pomnoževanje in detekcija produktov PCR potekata hkrati in v zaprtem sistemu, kar zmanjša možnost kontaminacije (Geens in sod., 2005b). Dokazovanje pridelkov temelji na merjenju fluorescence. Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred konvencionalnim PCR je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin (Arko, 2004).

Geens in sod. (2005b) so prikazali uporabo PCR v realnem času za specifično detekcijo ptičjih izolatov *C. psittaci* in vseh njenih genotipov. Pri ptičjih izolatih *C. psittaci* ločimo 9 različnih *ompA* genotipov (A - F, E/B, WC in M56). Z metodo RFLP lahko identificiramo vse genotipe, razen genotipa E/B, saj ima enak restrikcijski vzorec kot genotip E. Genotip E/B lahko določimo s sekveniranjem gena *ompA* in sedaj tudi z PCR v realnem času. PCR v realnem času je primeren v diagnostiki psitakoze pri človeku, saj omogoča razločevanje *C. psittaci* od *C. trachomatis* in *C. pneumoniae* kot tudi od povzročiteljev zoonoz *C. felis* in *C. abortus*. Uporaben je tudi v diagnostiki klamidioze pri živalih in seveda v epidemioloških študijah pri človeku in pticah (Geens in sod., 2005b).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 ZBIRANJE IN SHRANJEVANJE KUŽNINE

Iz Veterinarske klinike v Ljubljani smo pridobili kloakalne brise 61 ptic (57 golobov in 4 papige) in bris očesne veznice pri osebi s sumom na klamidijski konjunktivitis. Brise smo do testiranja hranili v transportnem gojišču 2SP (0,2 M glukoza, 0,02 M fosfatni pufer pH 7 in 10 % fetalni telečji serum) pri -70 °C.

#### 3.2 OSAMITEV BAKTERIJSKE DNK

Postopek izolacije genomske DNK iz dobljenih brisov smo izvajali v zaščitni sterilni komori LFV91T (Iskra PIO d.o.o., Slovenija). Pri tem smo uporabljali rokavice in aseptično tehniko dela. Na ta način smo zmanjšali verjetnost za morebitno okužbo s *C. psittaci* in prav tako možnost kontaminacije vzorcev med osamitvijo.

Osamitev smo izvedli s kompletom reagentov QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija), po opisanem protokolu za osamitev iz tkiv (angl. tissue protocol). Sledili smo navodilu proizvajalca z modifikacijo v prvem koraku postopka. Brise smo predhodno odtajali pri sobni temperaturi.

Oprema in reagenti:

- toplotni stresalnik mikrotubic Thermomixer 5436 (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5403 (Eppendorf, Nemčija)
- stresalnik
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- sterilni nastavki za pipete (Eppendorf)
- stojalo za mikrotubice (Eppendorf)
- sterilne mikrotubice (1,5 ml)
- mikrokolone (QIAamp Spin Column, priložene kitu) z 2 ml zbiralnimi epruветami
- pufer ATL (angl. Tissue Lysis Buffer)



- pufer AL (angl. Lysis Buffer)
- pufer AW1 (angl. Wash Buffer 1)
- pufer AW2 (angl. Wash Buffer 2)
- pufer AE (angl. Elution Buffer)
- proteinaza K
- etanol (96 – 100 %)

V 1,5 ml tubico smo prenesli 200 µl kužnine (bris kloake v 2SP). Nato smo vsebino centrifugirali pri 15000 obratih/minuto 20 minut. Po končanem centrifugiranju smo zavrgli 100 µl supernatanta, dodali 180 µl pufra ATL in usedlino resuspendirali. V tem koraku smo pripravili tudi negativno kontrolo, ki je vsebovala 200 µl sterilne destilirane vode in 180 µl pufra ATL.

Kužnini smo dodali 20 µl proteinaze K. Mešanico smo dobro premešali z vorteksiranjem in jo inkubirali pri 56 °C na stresalniku čez noč.

Po lizi bakterijskih celic smo tubice centrifugirali 1 - 2 sekundi, da smo odstranili kapljice iz notranjih sten epruvete. Nato smo dodali 200 µl pufra AL, premešali z vorteksiranjem (15 s) in inkubirali 10 minut pri 70 °C. Po inkubaciji smo tubico centrifugirali 1 - 2 sekundi.

Mešanici smo dodali 200 µl 96 - 100 % etanola in vsebino premešali.

Lizat smo previdno prenesli v mikrokolono (QIAamp Spin Column) vloženo v 2 ml zbiralno tubico. Nato smo 1 minuto centrifugirali pri 8000 obratih/minuto. Izpirek (eluat) in zbiralno tubico smo zavrgli, mikrokolono z vezano DNK pa prenesli v novo zbiralno epruveto.

V tubico smo dodali 500 µl izpiralnega pufra AW1. Sledilo je ponovno centrifugiranje 1 minuto pri 8000 obratih/minuto. Izpirek in zbiralno tubico smo ponovno zavrgli in mikrokolono prestavili v novo zbiralno tubico.

Dodali smo 500 µl izpiralnega pufra AW2 in centrifugirali 3 minute pri 14000 obratih/minuto.

Izpirek in zbiralno tubico smo zavrgli in mikrokolono prenesli v novo zbiralno tubico. Dodali smo 100 µl pufra AE in vzorec inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Izolirano DNK *C. psittaci* smo eluirali iz membrane kolone s centrifugiranjem 2 minuti pri 8000 obratih/minuto. Mikrokolono smo nato zavrgli. Izolirano DNK smo do nadaljnje obdelave hranili pri - 20 °C .

### 3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

#### 3.3.1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR

Za pomnoževanje izolirane DNK *C. psittaci* z metodo PCR smo uporabili komplet reagentov nemškega proizvajalca Genekam Biotechnology, ki v prvem koraku PCR omogoča dokazovanje DNK *Chlamydia* sp., v drugem koraku pa DNK *C. psittaci*. Za pravilno izvedbo metode smo sledili priloženemu navodilu proizvajalca.

Za učinkovito pomnoževanje DNK morajo biti v reakcijski mešanici ustrezne koncentracije pufra, deoksiribonukleotidov (dNTP), začetnih oligonukleotidov, MgCl<sub>2</sub>, polimeraze Taq in vzorca. V našem primeru so bile omenjene sestavine v ustreznih koncentracijah pripravljene v kompletu reagentov za pomnoževanje DNK.

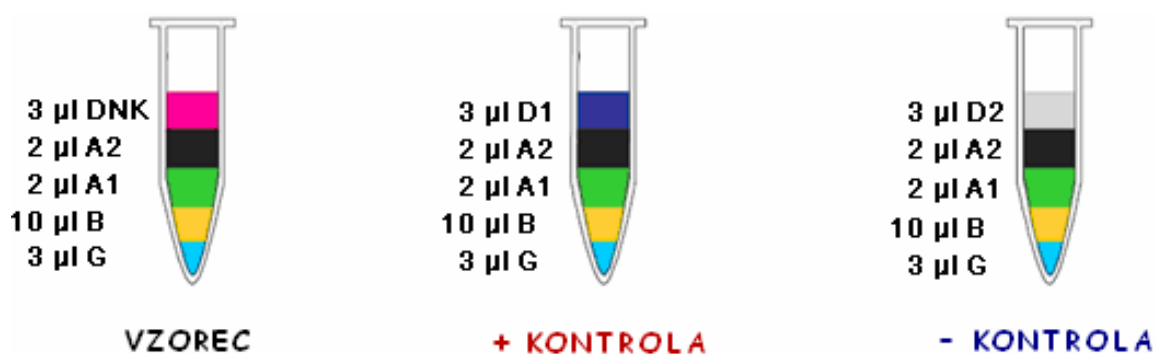
Oprema in reagenti:

- mikrotubice (0,2 ml)
- reagent A1 in A2
- reagent C1 in C2
- pozitivna kontrola (tubica D1)
- negativna kontrola (tubica D2)
- označevalec molekulske mase (tubica E)
- barvilo (tubica F)

- reagent G
- termični pomnoževalnik PE 9600 (PE Applied Biosystems, ZDA)
- centrifuga
- pipete
- sterilni nastavki za pipete z in brez filtra (20 µl, 5 µl, 1 µl)

Do uporabe morajo biti vsi reagenti shranjeni v zamrzovalniku. Med pripravo reakcijske mešanice smo reagente hranili pri -20 °C v posebnem hladilnem bloku, ki ohranja nizko temperaturo tudi, ko ga vzamemo iz hladilnika.

Reakcijska mešanica za prvo reakcijo PCR (pomnoževanje z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za rod *Chlamydia*) je vsebovala reagent G, B, A1, A2, ki smo jim na koncu dodali še osamljeno DNK (Slika 10). Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo namesto osamljene DNK nazadnje dodali reagent D2, pozitivni kontroli pa smo dodali reagent D1. Skupni volumen reakcijske mešanice je znašal 20 µl.



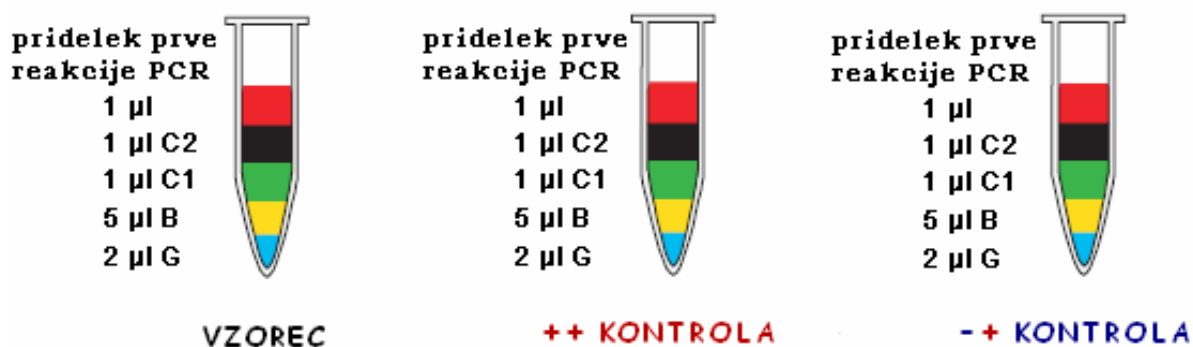
Slika 10: Vsebina reakcijske mešanice za prvi korak PCR v vzorcu, v pozitivni in negativni kontroli (Genekam Biotechnology AG, 2004).

Pomnoževanje 436 baznih parov dolgega zaporedja DNK smo izvedli v termičnem pomnoževalniku PE 9600 s 35 - kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij:

- 1) 120 sekund: 95 °C
  - 2) 60 sekund: 94 °C - denaturacija
  - 30 sekund: 55 °C - naleganje
  - 60 sekund: 72 °C - podaljševanje
- 35 - krat

Po končanem pomnoževanju smo produkte reakcije PCR ohladili pri 4 °C in jih uporabili v naslednji reakciji PCR.

Reakcijska mešanica za drugo reakcijo PCR (pomnoževanje z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za *C. psittaci*) je vsebovala reagent G, B, C1, C2, katerim smo na koncu dodali še pridelek iz prve reakcije PCR (Slika 11). Pozitivno kontrolo smo pripravili tako, da smo dodali pridelek pozitivne kontrole iz prve reakcije PCR, negativni kontroli pa pridelek negativne kontrole iz prve reakcije PCR. Skupni volumen reakcijske mešanice je znašal 10 µl.



Slika 11: Vsebina reakcijske mešanice za drugi PCR v vzorcu, v pozitivni in negativni kontroli (Genekam Biotechnology AG, 2004).

Pomnoževanje 127 baznih parov dolgega zaporedja DNK smo prav tako izvedli s 35 - kratno ponovitvijo temperaturnega ciklusa PCR sestavljenega iz treh zaporednih inkubacij kot pri prvi reakciji PCR. Dobljene pridelke PCR smo do nadaljnje obdelave shranili pri 4 °C.

## 3.4 DOKAZOVANJE PRIDELKOV REAKCIJE PCR

### 3.4.1 Priprava agaroznega gela in elektroforeze

Pridelke PCR smo ločevali z vodoravno elektroforezo (HE33 mini horizontal submarine unit Hoefer<sup>TM</sup>, Nemčija) v 1 % agaroznem gelu. Uporabili smo Nusieve 3:1 (BioZym, ZDA) agarozo v prahu, ki smo jo raztopili v 1 - krat koncentriranem pufru TAE (0'04 M Tris-HCl, 0'02 M NaCl, 2 mM EDTA, 0'02 M Na-acetat pH 8'3). Pripravljeno raztopino smo v mikrovalovni pečici segreti do vrelišča in pustili vreti nekaj sekund. Preverili smo ali se je agarosa v celoti raztopila in nato pod tekočo vodo ohladili do približno 40 °C. Nato smo dodali etidijev bromid (Gibco BRL, ZDA) v koncentraciji 0,1 mg/ml in gel nalili v kadičko z glavnikom.

### 3.4.2 Priprava vzorcev in nanos v vdolbinice v gelu

V vdolbinice gela smo nanесли po 10 µl pridelka PCR, ki smo mu dodali še 1 µl barvila iz tubice F (priloženo kompletu reagentov za PCR).

V prvo in zadnjo vdolbinico smo nanесли 10 µl označevalca molekulske mase iz tubice E, ki vsebuje odseke DNA v velikosti mnogokratnika 100 baznih parov. Nanesli smo tudi pozitivno in negativno kontrolo.

### 3.4.2 Pogoji elektroforeze in fotografiranje gela

Elektroforeza je potekla pri sobni temperaturi v električnem polju 100 Voltov 55 minut. Po končani elektroforezi smo gele pregledovali v transiluminatorju LKB MacroVue (Pharmacia, Švedska) z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in jih fotografirali s polaroidno kamero Polaroid DS 34 (direct screen instant camera) (Polaroid, ZDA).

Velikost pridelkov reakcije PCR smo določili s primerjavo njihove lege glede na fragmente DNK označevalca molekulske mase znane velikosti in glede na pozitivno kontrolo.

### 3.4.3 Kontrola kontaminacije

Vsi postopki, osamitev nukleinske kisline iz bioloških vzorcev, priprava mešanice za reakcijo PCR, pomnoževanje in analiza pomnoženih pridelkov so potekali v ločenih prostorih. Pipet in drugega potrošnega materiala nismo prenašali v druge prostore, prav tako smo oboje uporabljali le za določen korak. Reagente za PCR smo shranjevali v majhnih količinah. Pri pripravi DNK in mešanice za PCR smo poleg vzorcev vedno vključili še negativne kontrole.

## 4 REZULTATI

Za izvedbo naloge smo pridobili brise kloake 50 okrasnih golobov 10 različnih rejcev iz Slovenije, 7 brisov kloake prostoživečih mestnih golobov, 4 brise kloake papig in bris očesne veznice pri osebi s konjunktivitisom.

### 4.1 DOKAZOVANJE DNK *C. psittaci* Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

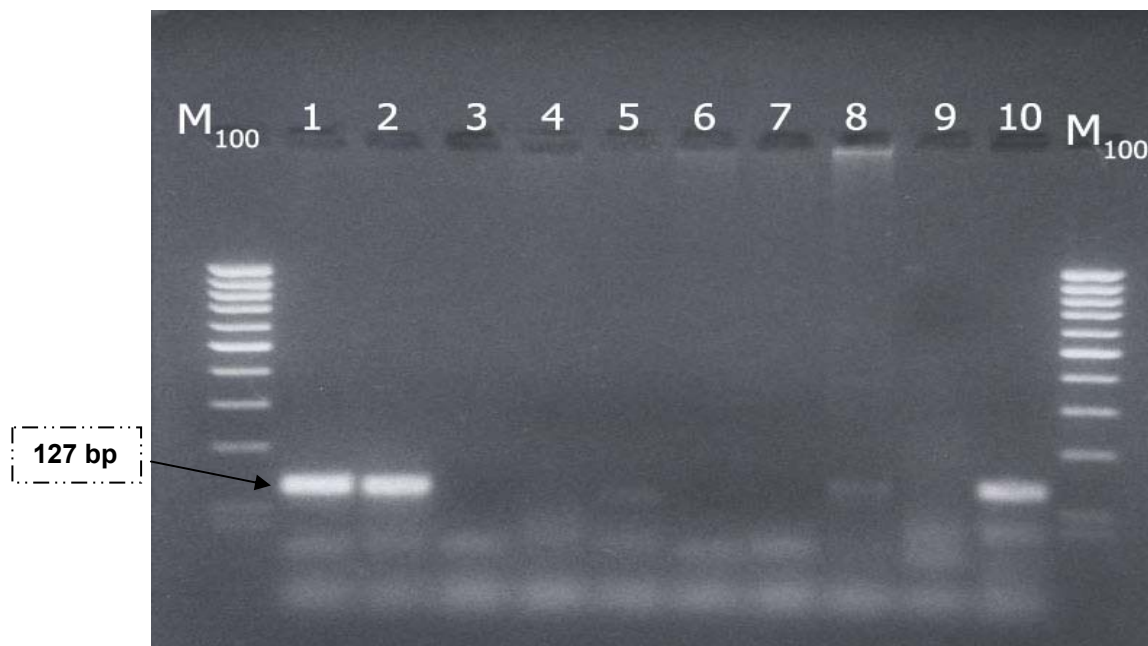
Za pomnoževanje izolirane DNK *C. psittaci* z metodo PCR smo uporabili kit nemškega proizvajalca. V prvem koraku PCR smo uporabili par oligonukleotidnih začetnikov, specifičen za rod *Chlamydia*, pri čemer smo dobili pridelek velikosti 436 baznih parov. Ta pridelek smo nato uporabili v drugi reakciji PCR, v kateri smo dobili pomnožen 127 baznih parov dolg fragment. Velikost pridelkov PCR smo določali glede na velikost DNK označevalca molekulske mase (100 baznih parov). Vzorce, pri katerih smo po končani elektroforezi dokazali 127 baznih parov velik fragment DNK, smo označili kot pozitivne za *C. psittaci*.

Preglednica 2: Rezultati dokazovanja okužb s *C. psittaci* z metodo PCR pri pticah in človeku.

	mesto odvzema brisa	število pregledanih	število pozitivnih	število negativnih
<b>okrasni golobi</b>	kloaka	50	0	50
<b>mestni golobi</b>	kloaka	7	4	3
<b>papige</b>	kloaka	4	2	2
<b>človek</b>	očesna veznica	1	0	1

V preglednici 2 so prikazani dobljeni rezultati. Z metodo PCR pri nobenem od 50 pregledanih okrasnih golobov nismo detektirali DNK *C. psittaci*, medtem ko smo dokazali *C. psittaci* v brisih kloake pri 4 prostoživečih golobih. Pri dveh papigah, pri katerih je bila okužba s *C. psittaci* dokazana z metodo posredne in neposredne imunofluorescence, smo potrdili okužbo. Brisa kloake preostalih dveh papig pa sta bila negativna. Prav tako okužbe s *C. psittaci* nismo dokazali pri osebi, oboleli za konjunktivitisom.

Na sliki 12 lahko vidimo tri primere pozitivnih vzorcev (progi 1 in 2 - prostoživeča goloba, proga 8 - nimfica).



Slika 12: Gelska elektroforeza PCR *C. psittaci*. ( $M_{100}$ : označevalec molekulske mase v velikosti mnogokratnika 100 baznih parov, Gibco BRL); proge 1-2, 8 so pozitivni vzorci; proge 3-7 so negativni vzorci; proga 9 je negativna kontrola in proga 10 pozitivna kontrola).



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

*C. psittaci* je znotrajcelična bakterijska vrsta, ki povzroča klamidiozo pri pticah in psitakozo pri človeku. Okužba pri pticah zelo pogosto poteka brez bolezenskih znakov, vendar so ptice kljub temu prenašalke *C. psittaci* in jo občasno izločajo. Človek se okuži z vdihavanjem aerosolov z izločki in prahom iz perja okuženih ptic. Okužba pri ljudeh je navadno asimptomatska, lahko pa se razvije težka oblika pljučnice in prizadetost drugih organov (Van Loock in sod., 2003; Menard in sod., 2006). V stiku s kužnino, ki vsebuje *C. psittaci*, se lahko okuži tudi osebje laboratorija (Menard in sod., 2006).

Sama diagnostika klamidioze je težavna. Osamitev in identifikacija povzročitelja okužbe sta zlati standard za večino infektivnih bolezni (Elder in Brown, 1999). Ta metoda je pri dokazovanju *C. psittaci* težje izvedljiva, saj se bakterija prenaša z aerosoli, zaradi česar mora delo potekati v laboratoriju tretje varnostne stopnje (Menard in sod., 2006). Za gojenje *C. psittaci* potrebujemo specializirane celične linije ali oplojena kokošja jajca, poleg tega je potrebno izvajanje inokulacijskih tehnik, ki niso na voljo v vseh laboratorijih. Ker se klamidije izločajo v iztrebkih ptic v presledkih, lahko en sam poskus osamitve na celični kulturi vodi v lažno negativen rezultat (Elder in Brown, 1999).

V diagnostiki klamidij so na voljo tudi številni serološki testi (Elder in Brown, 1999). S serološkimi metodami pri pticah dokazujemo protitelesa proti *C. psittaci* (Dovč in sod., 2000), pri čemer se uporablja klamidijam skupen lipopolisaharidni antigen (Vlahović in sod., 2002). Rezultate seroloških metod je včasih zato težko interpretirati zaradi možnih navzkrižnih reakcij z drugimi vrstami v rodu *Chlamydia*, zaradi česar dobimo lažno pozitivne rezultate (Menard in sod., 2006). Tudi LPS nekaterih enterobakterij, ki jih pogosto izoliramo iz prebavil ptic, pogosto navzkrižno reagira s protitelesi, usmerjenimi proti LPS klamidij (McElnea in Cross, 1999). Serološki odzivi pri okužbah ptic s *C. psittaci* so zelo različni, zato so lahko rezultati seroloških metod v zgodnji fazi okužbe negativni (Elder in Brown, 1999).

Imunološka reaktivnost na okužbo s *C. psittaci* pri pticah ni vedno zanesljiv kriterij okuženosti jate. Nizki titri protiteles lahko nakazujejo staro, prebolelo, okužbo ali akutno črevesno okužbo. Prav tako pa so nizki titri protiteles možni pri okuženi ptici, kjer še ni vzpostavljenega protitelesnega imunskega odziva. Ob stresnih situacijah in drugih sočasnih infekcijah *C. psittaci* prodre v kri in povzroči sistemsko okužbo s protitelesnim imunskim odzivom (Dovč in sod., 2000).

Danes prihajajo vse bolj v ospredje tehnike molekularne biologije, ki predstavljajo neprecenljivo orodje v diagnostiki okužb s *C. psittaci* (Menard in sod., 2006). Dokazovanje ptičje klamidioze s PCR ima številne prednosti pred drugimi metodami, ki dokazujejo antigen *C. psittaci*. Z metodo PCR lahko zaznamo že eno samo celico *C. psittaci* v vzorcu kužnine. Edina druga metoda, ki se približa tej stopnji občutljivosti, je osamitev bakterije v celični kulturi. V nasprotju pa osamitev v tkivni kulturi zahteva infektivno obliko *C. psittaci*, vzorec pa lahko razglasimo za negativnega šele v 2 - 3 tednih. Test PCR je hiter, lahko ga zaključimo že v 1 - 2 dneh. Ustrezno izbrani oligonukleotidni začetniki omogočijo specifičnost reakcije. Restriksijska analiza in sekveniranje pridelkov PCR daje tudi informacijo o epidemiologiji določenega izolata (McElnea in Cross, 1999).

Pomembna značilnost metode PCR je visoka občutljivost in specifičnost. Zelo dobra občutljivost metode PCR je lahko tudi slabost, če je ne izvajamo pod strogimi pogoji. Lažno pozitivne rezultate lahko dobimo pri navzkrižni kontaminaciji med samo reakcijo PCR. Zato moramo biti posebej pozorni, da priprava reakcijske mešanice, dodajanje vzorca DNK in procesiranje pridelkov PCR poteka v ločenih prostorih. Minimalno procesiranje vzorcev, kot sta enostavna liza in proteolitska razgradnja, zmanjšuje tveganje za kontaminacijo. Vzorci iztrebkov vsebujejo tudi visoke koncentracije inhibitorjev reakcije PCR (pigmenti, urea), zato je v takem primeru smiselno uporabiti še interne kontrole, s katerimi je moč dokazati morebitno navzoče inhibitorje (McElnea in Cross, 1999).

Cilj našega raziskovanja je bil, da bi z metodo PCR ugotovili, kako pogosta je okužba s *C. psittaci* med okrasnimi golobi. Ker smo to metodo preizkušali prvič, smo poleg pozitivnih in negativnih kontrol v sami reakciji PCR želeli vključiti tudi vzorce, v katerih je bila s serološko metodo dokazana navzočnost *C. psittaci*. V ta namen smo z Veterinarske

fakultete pridobili brise kloake 2 papig, pri katerih je bila okužba s *C. psittaci* dokazana z metodo posredne in neposredne imunofluorescence. Poleg tega smo DNK *C. psittaci* ugotavljali tudi v brisih kloake prostoživečih mestnih golobov, pri katerih je klinična slika kazala sum na klamidiozo.

V naši nalogi smo za pripravo reakcijske mešanice za PCR izbrali komercialno dostopen komplet reagentov nemškega proizvajalca Genekam Biotechnology, AG. Le ta je vseboval vse potrebne reagente za izvedbo "nested" PCR, vključno z oligonukleotidnimi začetniki. Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov je skrivnost proizvajalca, vse kar vemo je, da smo v prvem koraku PCR uporabili za rod *Chlamydia* specifična začetna oligonukleotida in tako dobili 436 baznih parov dolge pridelke. V drugem koraku PCR pa smo pomnoževali z oligonukleotidnimi začetniki specifičnimi za vrsto *C. psittaci*. Pridelki PCR so bili dolgi 127 baznih parov. Dobljene pridelke smo ločili z gelsko elektroforezo. Za kontrolo našega dela in rezultatov smo hkrati pripravili še pozitivno in negativno kontrolo, po navodilu proizvajalca. Vsak korak metode (izolacija DNK, priprava reakcijske mešanice, dodajanje DNK, PCR) smo izvedli na fizično ločenih lokacijah in uporabili tehniko aseptičnega dela v sterilni zaščitni komori.

Pomembna prednost metode PCR v dveh korakih z dvema paroma začetnih oligonukleotidov je visoka specifičnost in občutljivost. Izvedemo jo lahko v enem dnevu, pri čemer ne potrebujemo dodatnih tehnik za dokazovanje pomnoženih pridelkov, kot so hibridizacija po Southernu ali hibridizacija na osnovi encimsko imunske metode (Kaltenboeck in sod., 1991).

Občutljivost in specifičnost metod PCR se zelo razlikuje, kar je verjetno posledica različnih vrst kužnin, količin bakterij v kužnini, priprav vzorcev, metod izolacije DNK, uporabljenih parov začetnih oligonukleotidov in različnih metod PCR (Berg in sod., 2003). Na rezultate testa lahko vplivajo tudi napake pri vzorčenju. Predolgo shranjevanje, večkratno zamrzovanje in odtajanje sta še dva pomembna dejavnika, ki lahko vplivata na občutljivost metode PCR, saj pride s tem do izgube DNK v vzorcu (Tong in Sillis, 1993).

Messmer in sod. (1997) v svoji študiji opisujejo uporabo "nested, multiplex" metode PCR, s katero so hkrati dokazovali in ločili med sabo *C. pneumoniae*, *C. psittaci* in *C. trachomatis*. Pri tem so v prvem koraku PCR uporabili oligonukleotidne začetnike, s katerimi so dobili pridelke velikosti 436 baznih parov in so omogočili dokaz bakterij rodu *Chlamydia*. V drugem koraku so nato s tremi pari različnih oligonukleotidnih začetnikov ločili med sabo tri vrste znotraj rodu *Chlamydia*. Velikost pridelka PCR, značilnega za dokaz *C. psittaci*, je bila 127 baznih parov, kot v našem primeru. Mejna vrednost detekcije z uporabljenimi pari začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na odsek gena 16S rRNK, je bila v omenjeni študiji manj kot 5 IFU (angl. inclusion forming unit). Ne notranji in ne zunanji oligonukleotidni začetniki niso navzkrižno reagirali z drugimi respiratornimi patogeni, ki so jih preskusili. Pridelke PCR so opazovali z elektroforezo v agaroznem gelu (Messmer in sod., 1997).

Van Loock in sod. (2005) so razvili "nested" PCR - encimsko imunski test za dokazovanje okužb s *C. psittaci* pri puranih. Gre za semi kvantitativno metodo dokazovanja pomnoženega gena *ompA*, v katero so vključili tudi notranjo kontrolo inhibicije, da bi preprečili možnost lažno pozitivnih rezultatov. Uporabili so faringealne brise puranov. Izvedbo "nested" PCR encimsko imunske metode so primerjali z "nested" PCR, katerega tarča je bil gen za 16S rRNK. Pri "nested" PCR encimsko imunski metodi je bila specifičnost 100 %, saj so dokazali vse genotipe *C. psittaci*, ne pa DNK *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. abortus* ali *C. felis*. Poleg tega niso zaznali nobene navzkrižne reaktivnosti z drugimi bakterijskimi respiratornimi patogeni, ki jih najdemo v ptičjem respiratornem traktu. "Nested" PCR so izbrali, da bi dosegli visoko občutljivost in specifičnost. Pomnoževanje notranje DNK kontrole je pripomoglo k temu, da so potrdili negativne rezultate, saj so z negativno kontrolo izločili navzočnost inhibitorjev pomnoževanja DNK. Njihova primerjava je pokazala, da je "nested" PCR encimsko imunska metoda 50 krat bolj občutljiva od metode "nested" PCR, ki jo opisujejo Messmer in sod. (1997) (Van Loock in sod., 2005). Iz teh ugotovitev so zaključili, da je pri pticah boljše pridobiti faringealne brise kot brise kloake, saj se *C. psittaci* iz kloake izloča v presledkih, medtem ko se *C. psittaci* iz dihal odstrani kasneje. Patogeneza *C. psittaci* je tudi pokazala, da so lateralne nazalne žleze lahko okužene dlje časa (Van Loock in sod., 2005). Andersen (1996) je v svoji študiji primerjal delež pozitivnih rezultatov izolacije *C. psittaci* na celični kulturi iz faringealnih

briso, iztrebkov in briso kloake domnevno okuženih ptic. Pokazalo se je, da so faringealni brisi najprimernejša kužnina za dokaz *C. psittaci* pri živih pticah, saj je bilo v brisih farinksa mogoče zaznati višji odstotek okuženih ptic (Andersen, 1996).

Latentno okužene ptice lahko nosijo povzročitelja več let preden se pokažejo bolezenski znaki. Ves ta čas so lahko nevarne za okužbo človeka. Med pticami so pomemben izvor okužbe s *C. psittaci* divje ptice, ki se družijo v večjih skupinah. Med njimi so pogosto omenjene ptice selivke, ptice pevke, divje race in prostoživeči golobi (Dovč, 1994). Neposreden kontakt prostoživečih in pasemskih golobov ima z epizootiološkega stališča velik pomen, saj se obolenje zlahka prenaša na pasemske golobe, s katerimi so gojitelji v tesnem stiku (Dovč in sod., 2000). Zato je potreben stalen nadzor nad velikostjo rej in pravilnim odvzemom vzorcev za redne preglede pred prodajo in pred razstavami ptic. Potrebno je tudi tesno sodelovanje z rejci papig in golobov, pri katerih so bile okužbe s *C. psittaci* v preteklosti pogoste (Dovč, 1994).

Ker so danes reje okrasnih golobov pod stalnimi veterinarskim nadzorom, smo v naši študiji pričakovali nizek delež s *C. psittaci* okuženih okrasnih golobov. Z epidemiološkega stališča je pomembna situacija klamidioze pri prostoživečih mestnih golobih.

Analiza briso kloake ali vzorcev iztrebkov s testom PCR je enostavna, hitra in uporabna metoda, ki omogoča dokaz *C. psittaci* pri živalih, ki jo izločajo v okolje. Na prenos *C. psittaci* iz okuženih živali na človeka lahko sklepamo kadar se pojavljajo epizodni izbruhi psitakoze pri ljudeh, ne glede na to ali so pri pticah izraženi ali ne (Greco in sod., 2005).

Zaradi možnega prenosa *C. psittaci* iz živali na človeka je potrebno postaviti hitro in nedvoumno diagnozo pri okuženih pticah. Za uporabnost metode PCR v diagnostiki klamidijskih okužb je potrebna standardizacija postopkov osamitve DNK, izbora začetnih oligonukleotidov in metodologije pomnoževanja. Standardizacija teh postopkov zagotavlja kredibilnost metode PCR in možnost primerjave rezultatov med različnimi laboratoriji (Trevejo in sod., 1999).

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi naše raziskave smo prišli do naslednjih zaključkov:

- PCR je uporabna in hitra metoda za dokazovanje DNK *C. psittaci* v kužnini
- pri okrasnih golobih nismo dokazali okužb s *C. psittaci*
- v prihodnosti bi bilo smiselno pregledovati prostoživeče mestne golobe, ki prav tako predstavljajo potencialen vir *C. psittaci* za človeka

## 6 POVZETEK

*C. psittaci* je obvezna znotrajcelična bakterija, ki povzroča klamidiozo pri različnih vrstah ptic. Najpogosteje so okužene papige, purani, golobi in galebi. Bakterija se lahko preko aerosolov, ki vsebujejo posušene iztrebke, nazalne izločke in delce iz perja okuženih ptic, prenese tudi na človeka, kjer povzroča psitakozo, ki se lahko razvije v hudo obliko pljučnice, pride pa lahko tudi do drugih zdravstvenih težav. Ogroženi so predvsem rejci, prodajalci in ljubitelji ptic, ki so v neposrednem in tesnem stiku s pticami. Za preprečevanje teh okužb sta zelo pomembna nadzor nad uvozom ptic in njihovo testiranje na morebitno klamidijško okužbo.

Do sedaj so se v diagnostiki tovrstnih okužb uporabljale metode osamitve bakterije iz kužnine ptic, najpogosteje pa serološke metode. Glede na to, da je bakterija izredno virulentna, je osamitev možna le v posebno opremljenih laboratorijih. Tudi serološke metode imajo svoje omejitve, saj je pri pticah precej otežkočeno že samo pridobivanje krvi, problem pa predstavlja tudi interpretacija serodiagnostike. Zato imajo v dokazovanju okužb s *C. psittaci* vedno večji pomen molekularno biološke metode, kot je PCR. Prednost teh metod je predvsem v tem, da so hitre, občutljive in specifične.

V tej diplomski nalogi smo za dokaz okužbe s *C. psittaci* pri pticah uvedli metodo PCR. Za izolacijo DNK *C. psittaci* iz kužnine smo uporabili komplet reagentov QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit. DNK *C. psittaci* smo ugotavljali z metodo "nested" PCR. Pomnožene pridelke velikosti 127 baznih parov smo opazovali z elektroforezo v agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom.

Rezultati uvedene metode so pokazali, da noben izmed testiranih okrasnih golobov ni bil okužen s *C. psittaci*. Okužbo s *C. psittaci* smo nasprotno dokazali pri 4 od 7 odvzetih brisih kloake prostoživečih mestnih golobov. Pri dveh papigah, pri katerih je bila okužba s *C. psittaci* dokazana z metodo posredne in neposredne imunofluorescence, smo potrdili okužbo. Okužbe s *C. psittaci* nismo dokazali pri osebi s sumom na klamidijški konjunktivitis.

Ugotovili smo, da je metoda PCR v diagnostiki *C. psittaci* pri pticah primerna in je hkrati tudi hitra, občutljiva in specifična. Reje okrasnih golobov so pod stalnim veterinarskim nadzorom, saj se rejci z njimi udeležujejo razstav in so namenjeni tudi prodaji. S tem lahko razložimo, zakaj nismo dokazali nobenega za *C. psittaci* pozitivnega okrasnega goloba. V prihodnosti bi bilo zato z epidemiološkega stališča smiselno pregledovati in preiskovati prostoživeče, predvsem mestne golobe, ki prav tako vsakodnevno prihajajo v stik z ljudmi in lahko predstavljajo možen rezervoar *C. psittaci*.



## 7 VIRI

Andersen A.A. 1991. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with microimmunofluorescence test. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 707-711

Andersen A.A. 1996. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8: 448-450

Andersen A.A. 1997. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from north american birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9: 159-194

Andersen A.A., Tappe J.P. 1989. Genetic, immunologic, and pathologic characterization of avian chlamydial strains. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1512-1516

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski vestnik*, 55: 215-220

Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I. 1994. Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 58, 4: 686-699

Berg H.F., Maraha B., Bergmans A.M., van der Zee A., Kluytmans J.A., Peeters M.F. 2003. Extraction of *Chlamydia pneumoniae* DNA from vascular tissue for use in PCR: an evaluation of four procedures. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 2: 135-139

Betsou F., Beaumont K., Sueur J.M., Orfila J. 2003. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA from urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3: 1274-1276

Brade L., Rozalski A., Kosma P., Brade H. 2000. A monoclonal antibody recognizing the 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) trisaccharide  $\alpha\text{Kdo}(2\rightarrow4)\alpha\text{Kdo}(2\rightarrow4)\alpha\text{Kdo}$  of *Chlamydophila psittaci* 6BC lipopolysaccharide. *Journal of Endotoxin Research*, 6, 5: 361-368

Brade L., Schramek S., Schade U., Brade H. 1986. Chemical, biological, and immunochemical properties of the *Chlamydia psittaci* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 54, 2: 568-574

Brand C.J. 1989. Chlamydial infections in free living birds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1531-1535

Bush R.M., Everett K.D. 2001. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 203-220

Caldwell H.D., Hitchcock P.J. 1984. Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 44, 2: 306-314

Chopra I., Storey C., Falla T.J., Pearce J.H. 1998. Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology*, 144: 2673-2678

DeGraves F.J., Kim T., Jee J., Schlapp T., Hehnen H.R., Kaltenboeck B. 2004. Reinfection with *Chlamydophila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydophila*. *Infection and Immunity*, 72, 5: 2538-2545

Domeika M., Mardh P.A. 1993. ABC on *Chlamydia*. Uppsala, Behring Diagnostics: 80 str.

Dovč A. 1994. Klamidioza pri mačkah. *Veterinarske novice*, 20, 6: 189-191

Dovč A. 1995. Uvajanje imunofluorescenčnih metod v diagnostiko klamidioze (*Chlamydia psittaci*) ter epizootiologija pri papigah in golobih. Zbornik veterinarske fakultete, 32, 2: 257-276

Dovč A. 1998a. Klamidioza (*Chlamydia psittaci*) pri domačih in divjih pernatih živali v Sloveniji. Veterinarske novice, 24, 10: 419-422

Dovč A., Hren-Vencelj I., Mrzel I. 1998b. Specifična protitelesa proti bakteriji *Chlamydia psittaci* pri skupinah ljudi, ki so bolj izpostavljeni okužbi. V: Zbornik s programom / 2. kongres slovenskih mikrobiologov z mednarodno udeležbo. Portorož, Slovenija, 27.- 30. September 1998. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 454-457

Dovč A., Knez V., Tozon N. 1998c. Diagnostika bakterije *Chlamydia psittaci* pri mačkah. V: Zbornik s programom / 2. kongres slovenskih mikrobiologov z mednarodno udeležbo. Portorož, Slovenija, 27.- 30. September 1998. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 471-474

Dovč A., Kos U., Slavec B., Golja J. 2000. Razširjenost klamidioze (klamidofiloze) pri prostoživečih golobih (*Columba livia domestica*) v Ljubljani. Veterinarske novice, 26: 73-75

Dreses-Werringloer U., Padubrin I., Zeidler H., Kohler L. 2001. Effects of azithromycin and rifampin on *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 11: 3001-3008

Eidson M. 2002. Psittacosis/avian chlamydiosis. Journal of American Veterinary Medical Association, 221, 12: 1710-1712

Elder J., Brown C. 1999. Review of techniques for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in psittacine birds. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11, 6: 539-541

Escalante-Ochoa C., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1998. The intracellular life of *Chlamydia psittaci*: how do the bacteria interact with the host cell? FEMS Microbiology Reviews, 22, 2: 65-78

Everett K.D. 2000. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. Veterinary Microbiology, 75, 2: 109-126

Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 415-440

Everett K.D., Hatch T.P. 1995. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. Journal of Bacteriology, 177, 4: 877-882

Ferreri A.J., Guidoboni M., Ponzoni M., De Conciliis C., Dell'Oro S., Fleischhauer K., Caggiari L., Lettini A.A., Dal Cin E., Ieri R., Freschi M., Villa E., Boiocchi M., Dolcetti R. 2004. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. Journal of National Cancer Institute, 96, 8: 586-594

Friis R.R. 1972. Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. Journal of Bacteriology, 110, 2: 706-721

Frutos R., Pages M., Bellis M., Roizes G., Bergoin M. 1989. Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella*, and *Porochlamydia*. Journal of Bacteriology, 171, 8: 4511-4513

Fu Y., Baumann M., Kosma P., Brade L., Brade H. 1992. A synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart. Infection and Immunity, 60, 4: 1314-1321

Fukushi H., Hirai K. 1989. Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *Journal of Bacteriology*, 171, 5: 2850-2855

Fukushi H., Hirai K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 2: 306-308

Geens T., Desplanques A., Van Loock M., Bonner B.M., Kaleta E.F., Magnino S., Andersen A.A., Everett K.D., Vanrompay D. 2005a. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5:2456-2461

Geens T., Dewitte A., Boon N., Vanrompay D. 2005b. Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Veterinary Research*, 36: 787-797

Genekam Biotechnology AG 2004. *Chlamydia psittaci*. Principle and use: 8 str.

Girjes A.A., Hugall A., Graham D.M., McCaul T.F., Lavin M.F. 1993. Comparison of type I and type II *Chlamydia psittaci* strains infecting koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Veterinary Microbiology*, 37, 1-2: 65-83

Goellner S., Liebler-Tenorio E., Hotzel H., Saluz H.P., Sachse K. 2006. Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different in vitro models of persistent infection. *Infection and Immunity*, 74, 8: 4801-4808

Golob Z. 1994. Papige. Ljubljana, Kmečki glas: 179 str.

Grayston J.T., Kuo C.-C., Campbell L.A., Wang S.-P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 88-90

Greco G., Corrente M., Martella V. 2005. Detection of *Chlamydophila psittaci* in asymptomatic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 10: 5410-5411

Gregurić J., Cvelić-Čabrilo V., Vučemilo M., Granić J. 1992. Gradski golubovi (*Columba livia domestica*): ekološki, zdravstveni i gospodarski problem grada Zagreba. *Veterinarski Stanica*, 23: 327-331

Grleshaber N.A., Grleshaber S.S., Fischer E.R., Hackstadt T. 2006. A small RNA inhibits translation of the histone-like protein Hc1 in *Chlamydia trachomatis*. *Molecular Microbiology*, 59, 2: 541-550

Grmek M. 1995. Pasemski golobi. Ljubljana, Kmečki glas: 312 str.

Hatch T.P., Miceli M., Sublett J.E. 1986. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 165, 2: 379-385

Hatch T.P., Vance D.W.Jr., Al-Hossainy E. 1981. Attachment of *Chlamydia psittaci* to formaldehyde-fixed and unfixed L cells. *Journal of General Microbiology*, 125, 2: 273-283

Heddema E.R., Beld M.G., de Wever B., Langerak A.A., Pannekoek Y., Duim B. 2006. Development of an internally controlled real-time PCR assay for detection of *Chlamydophila psittaci* in the LightCycler 2.0 system. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 6:571-575

Heine H., Mueller-Loennies S., Brade L., Lindner B., Brade H. 2003. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E in L2 and *Chlamydophila psittaci* 6BC. *European Journal of Biochemistry*, 270: 440-450

Herrmann B., Persson H., Jensen J.-K., Joensen H.D., Klint M., Olsen B. 2006. *Chlamydophila psittaci* in Fulmars, the Faroe Islands. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 2: 330-332

Herrmann B., Winqvist O., Mattsson J.G., Kirsebom L.A 1996. Differentiation of *Chlamydia* spp. by sequence determination and restriction endonuclease cleavage of RNase P RNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 8: 1897-1902

Hewinson R.G., Griffiths P.C., Bevan B.J., Kirwan S.E.S., Field M.E., Woodward M.J., Dawson M. 1997. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 54: 155-166

Hogan R.J., Mathews S.A., Mukhopadhyay S., Summersgill J.T., Timms P. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm *Infection and Immunity*, 72, 4: 1843-1855

Ieven M., Goossens H. 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 2: 242-256

Jee J., Degraeves F.J., Kim T., Kaltenboeck B. 2004. High prevalence of natural *Chlamydophila* species infection in calves. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 12: 5664-5672

Kaleta E.F., Taday E.M. 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, 32, 5: 435-461

Kaltenboeck B., Kousoulas K.G., Storz J. 1991. Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 9:1969-1975

Kaltenboeck B., Kousoulas K.G., Storz J. 1993. Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *Journal of Bacteriology*, 175, 2: 487-502

Kaul R., Wenman W.M. 1998. Eukaryotic-like histones in *Chlamydia*. *Frontiers in Bioscience*, 3: 300-305

Kaul R., Hoang A., Yau P., Bradbury E.M., Wenman W.M. 1997. The chlamydial EUO gene encodes a histone H1-specific protease. *Journal of Bacteriology*, 179, 18: 5928-5934

Keše D. 2002. Klamidije. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 321-328

Keše D., Petrovec M., Avšič-Županc T. 1999. Posebnosti pri odvzemu in prenosu kužnin za dokaz klamidij, rikacij in erlihij. V: *Mikrobiološka analiza kužnin*. Nova Gorica, Zavod za zdravstveno varstvo: 55-65

Kirchner J.T. 1997. Psittacosis. *Postgraduate Medicine*, 102, 2: 181-194

Kingsbury D.T., Weiss E. 1968. Lack of deoxyribonucleic acid homology between species of the genus *Chlamydia*. *Journal of Bacteriology*, 96, 4: 1421-1423

Kolb J., Kankondi R., Huebschle O.J.B. 1993. Isolation of *Chlamydia* spp. from ostriches (*Struthio camelus*). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 100: 454-454

Liu B.L., Everson J.S., Fane B., Giannikopoulou P., Vretou E., Lambden P.R., Clarke I.N. 2000. Molecular characterization of a bacteriophage (Chp2) from *Chlamydia psittaci*. *Journal of Virology*, 74, 8: 3464-3469

Madico G., Quinn T.C., Boman J., Gaydos C.A. 2000. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3: 1085-1093

Mallinson E.T. 1989. Potential of voluntary caged pet bird improvement program. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1535-1537



McClarty G. 1994. Chlamydiae and the biochemistry of intracellular parasitism. Trends in Microbiology, 2, 5: 157-164

McClenaghan M., Herring A.J., Aitken I.D. 1984. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. Infection and Immunity, 45, 2: 384-389

McCoy A.J., Sandlin R.C., Aurelli A.T. 2003. In vitro and in vivo functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. Journal of Bacteriology, 185, 4: 1218-1228

McElnea C.L., Cross G.M. 1999. Methods of detection of *Chlamydia psittaci* in domesticated and wild birds. Australian Veterinary Journal, 77, 8: 516-521

Menard A., Clerc M., Subtil A., Megraud F., Bebear C., de Barbeyrac B. 2006. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. Journal of Medical Microbiology, 55: 471-473

Messmer T.O., Skelton S.K., Moroney J.F., Daugharty H., Fields B.S. 1997. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. Journal of Clinical Microbiology, 35, 8: 2043-2046

Millman K.L., Tavare S., Dean D. 2001. Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. Journal of Bacteriology, 183, 20: 5997-6008

Moulder J.W. 1966. The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses. Annual Review of Microbiology, 20: 107-130

Moulder J.W. 1969. A model for studying the biology of intracellular parasitism. *Chlamydia psittaci* and L cells (mouse fibroblasts). BioScience, 19: 875 - 881

Moulder J.W. 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiological Reviews*, 49, 3: 298-337

Moulder, J.W. 1991. Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological Reviews*, 55: 143–190

Page L.A. 1966. Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (Rickettsiales): unification of the genus *Chlamydia* Jones, Rake in Stearns 1945. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16: 223-253

Page L.A. 1968. Proposal for the recognition of two species in genus *Chlamydia*. Jones, Rake, and Stearns, 1945. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18: 51-66

Page L.A. 1975. Studies on immunity to chlamydiosis in birds, with particular reference to turkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 4: 597-600

Peake I. 1989. The polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 7: 673-676

Pearson J.E., Gustafson G.A., Senne D.A., Peterson L.A. 1989. Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1564-1567

Perez- Martinez J.A., Storz J. 1985. Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence. *Infection and Immunity*, 50, 3: 905-910

Pickett M.A., Ward M.E., Clarke I.N. 1988. High-level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Molecular Microbiology*, 2, 5: 681-685

Ritchie W.H. 1989. The USDA requirements for control of chlamydiosis in imported birds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195,11: 1541-1542

Rockey D.D., Lenart J., Stephens R.S. 2000. Genome sequencing and our understanding of *Chlamydiae*. *Infection and Immunity*, 68, 10: 5473-5479

Rund S., Lindner B., Brade H., Holst O. 2000. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Chlamydophila psittaci* strain 6BC. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5717-5726

Schachter J. 1978a. Chlamydial infections (first of three parts). *New England Journal of Medicine*, 298, 8: 428-435

Schachter, 1978b. Chlamydial infections (third of three parts). *New England Journal of Medicine*, 298, 10: 540-549

Schachter J. 1989. Chlamydial infections - past, present, future. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1501-1505

Schachter J., Caldwell H.D. 1980. Chlamydiae. *Annual Review of Microbiology*, 34: 285-309

Schmitz – Esser S., Linka N., Collingro A., Beier C.L., Neuhaus H.E., Wagner M., Horn M. 2004. ATP/ADP Translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to *Chlamydiae* and *Rickettsiae*. *Journal of Bacteriology*, 186, 3: 683-691

Schnorr K.L. 1989. Chlamydial vaccines. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 195, 11: 1548-1561

Sharon D., McLaughlin J. 1995. Attracting winter birds and bird feeding: Part 1. *Blue Bill*, 42, 3: 114-114

Sheehy N., Markey B., Gleeson M., Quinn P.J. 1996. Differentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* strains by species-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 12: 3175-3179

Smith K.A., Bradley K.K., Stobierski M.G., Tengelsen L.A. 2005. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 226, 4: 532-539

Spenser E.L. 1991. Common infectious diseases of psittacine birds seen in practice. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 21, 6: 1213-1230

Storz J., Page L.A. 1971. Taxonomy of the chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia* family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21: 332-334

Su H., Morrison R.P., Watkins N.G., Caldwell H.D. 1990. Identification and characterization of T helper cell epitopes of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Experimental Medicine*, 172: 203-212

Theegarten D., Anhenn O., Hotzel H., Wagner M., Marra A., Stamatis G., Mogilevski G., Sachse K. 2004. A comparative ultrastructural and molecular biological study on *Chlamydia psittaci* infection in alpha-1 antitrypsin deficiency and non-alpha-1 antitrypsin deficiency emphysema versus lung tissue of patients with hamartochondroma. *BMC Infectious Diseases*, 21, 4: 38

Thomas N.S., Lusher M., Storey C.C., Clarke I.N. 1997. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology*, 143: 1847-1854

Thomson N.R., Yeats C., Bell K., Holden M.T., Bentley S.D., Livingstone M., Cerdeño-Tárraga A.M., Harris B., Doggett J., Ormond D., Mungall K., Clarke K., Feltwell T., Hance Z., Sanders M., Quail M.A., Price C., Barrell B.G., Parkhill J., Longbottom D. 2006. The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Research*, 15: 629-640

Tong C.Y.W., Donnelly C., Harvey G., Sillis M. 1999. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 257-263

Tong C.Y.W., Sillis M. 1993. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 46: 313-317

Treveje R.T., Chomel B.B., Kass P.H. 1999. Evaluation of the polymerase chain reaction in comparison with other diagnostic methods for the detection of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 6: 491-496

Twomey D.F., Griffiths P.C., Horigan M.W., Hignett B.C., Martin T.P. 2006. An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease. *Veterinary Journal*, 171, 3: 574-576

Vance D.W.Jr., Hatch T.P. 1980. Surface properties of *Chlamydia psittaci*. *Infection and Immunity*, 29, 1: 175-180

Van Loock M., Vanrompay D., Herrmann B., Vander Stappen J., Volckaert G., Goddeeris B.M., Everett K.D. 2003. Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 761-770

Van Loock M., Verminnen K., Messmer T.O., Volckaert G., Goddeeris B.M., Vanrompay D. 2005. Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. *BMC Infectious Disease*, 5: 76

Vanrompay D., Andersen A.A., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1993. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and from other birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 134-137.

Vanrompay D., de Meurichy W., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1994. Pneumonia in Moorish tortoises (*Testudo graeca*) associated with avian serovar A *Chlamydia psittaci*. *Veterinary Record*, 135: 284-285

Vanrompay D., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary microbiology*, 45: 93-119

Vlahović K., Dovč A., Župančič Ž., Pavlak M., Jerčič J. 2001. Comparison of serological procedures for diagnosis of infection with *Chlamydophila* sp. in bovines. *Veterinarski arhiv*, 71, 6: 367-379

Vlahović K., Pavlak M., Župančič Ž., Jerčič J., Dovč A. 2002. Klamidioza ptica (*Chlamydophila psittaci*). *Praxis veterinaria*, 50, 3: 265-271

Vretou E., Psarrou E., Kaisar M., Vlisidou I., Salti-Montesanto, Longbottom D. 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydophila abortus*). *Infection and Immunity*, 69, 1: 607-612

Ward M.E. 1983. Chlamydial classification, development and structure. *British Medical Bulletin*, 39, 2: 109-115

Watson M.W., Lambden P.R., Clarke I.N. 1991. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 6: 1188-1193

Wichlan D.G., Hatch T.P. 1993. Identification of an early-stage gene of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Journal of Bacteriology*, 175, 10: 2936-2942

Wyllie S., Ashley R.H., Longbottom D., Herring A.J. 1998. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infection and Immunity*, 66, 11: 5202-5207

Wyrick P.B., Richmond S.J. 1989. Biology of chlamydiae. Journal of American Veterinary Medical Association, 195, 11: 1507-1512

Wyrick P.B. 2000. Intracellular survival by *Chlamydia*. Cellular Microbiology, 2: 275-282

Yang J.M., Liu H.X., Hao Y.X., He C., Zhao D.M. 2006. Development of a rapid real-time PCR assay for detection and quantification of four familiar species of *Chlamydiaceae*. Journal of Clinical Virology, 36, 1: 79-81

Yuan Y., Zhang Y.X., Manning D.S., Caldwell H.D. 1990. Multiple tandem promoters of the major outer membrane protein gene (omp1) of *Chlamydia psittaci*. Infection and Immunity, 58, 9: 2850-2855

Zeichner S.L. 1983. Isolation and characterization of macrophage phagosomes containing infectious and heat-inactivated *Chlamydia psittaci*: two phagosomes with different intracellular behaviors. Infection and Immunity, 40, 3: 956-966

Zhang L., Douglas A.L., Hatch T.P. 1998. Characterization of a *Chlamydia psittaci* DNA binding protein (EUO) synthesized during the early and middle phases of the developmental cycle. Infection and Immunity, 66, 3: 1167-1173